



สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
The Thailand Research Fund

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ

“การพัฒนาชุดตรวจสอบจุลชีววิทยาอย่างรวดเร็วเพื่อการ
เฝ้าระวังความเสี่ยงของเนื้อสุกรในกรุงเทพมหานคร”

(Rapid Microbial Test Kit Development for Risk Monitoring
of Pork in Bangkok Metropolitan)

โดย

รศ.น.สพ.ดร. ศุภชัย เนื่อนवलสุวรรณ และคณะ

มีนาคม 2560

สารบัญ

Executive summary	3
Abstract	5
บทคัดย่อ	6
วัตถุประสงค์โครงการ	8
บทที่ 1 การประเมินความเสี่ยง (Risk Assessment)	10
บทที่ 2 การประเมินการเสื่อมเนื้อมสุกร (Spoilage assessment)	33
บทที่ 3 การพัฒนาวิธีการตรวจสอบจุลินทรีย์อย่างรวดเร็วในเนื้อมสุกร (Rapid microbial test kit)	78
บทที่ 4 การใช้การตรวจสอบจุลินทรีย์อย่างรวดเร็วเพื่อการประเมินการเสื่อม (Rapid test kit for spoilage assessment)	218
บทที่ 5 การใช้การตรวจสอบจุลินทรีย์อย่างรวดเร็วเพื่อการประเมินความเสี่ยง (Rapid test kit for risk assessment)	235
บทที่ 6 ความสามารถในการประเมินความเสี่ยง (Risk assessment capacity building)	247
บทที่ 7 เอกสารอ้างอิง (References)	249
บทที่ 8 ภาคผนวก (Appendix)	254
วิธีการใช้ชุดทดสอบ (Instructions for use)	
การประเมินคุณภาพเนื้อมสุกร (pork quality assessment)	
การทำนายอายุการวางจำหน่ายเนื้อมสุกร (shelf life prediction)	

Executive summary

การบริโภคเนื้อสัตว์ที่ปลอดภัยและมีคุณภาพเป็นความมั่นคงทางอาหารของทุกประเทศ ซึ่งประเด็นความปลอดภัยในการบริโภคเนื้อสัตว์ที่มีสาเหตุจากแบคทีเรียนั้น นอกจากแบคทีเรียกลุ่มลำไส้แล้ว สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุขยังได้รายงานว่า *Staphylococcus* spp. เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) ที่สำคัญของไทย ซึ่งมีความสอดคล้องกับการพบ *Staphylococcus* spp. ปนเปื้อนในเนื้อสัตว์สูงถึงร้อยละ 56 ซึ่งสูงกว่าการปนเปื้อนในฟาร์มสุกรที่มีเพียงร้อยละ 25 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ปัญหาโรคอาหารเป็นพิษจาก *Staphylococcus aureus* จะมุ่งไปที่เนื้อสุกรที่จัดจำหน่ายไปสู่ผู้บริโภคเป็นสำคัญ

ระบบการเฝ้าระวังความเสี่ยง (Risk monitoring system) ของ *Staphylococcus aureus* ในเนื้อสุกรมีบทบาทที่สำคัญในการสะท้อนให้หน่วยงานของราชการที่มีทำหน้าที่รับผิดชอบเกี่ยวกับการแจ้งเตือนความปลอดภัยของอาหารทั้งฝ่ายปกครองและฝ่ายสาธารณสุข ได้ทราบถึงสถานภาพความเสี่ยงหรืออัตราการเจ็บป่วยที่เป็นปัจจุบันของ *Staphylococcus aureus* ที่เกิดเนื่องจากการปนเปื้อนของ *Staphylococcus aureus* ในเนื้อสุกร อย่างไรก็ตามระยะเวลาการตรวจทางห้องปฏิบัติการทำให้เกิดข้อจำกัดที่สำคัญ จึงได้มีการพัฒนาชุดตรวจสอบจุลชีววิทยาเพื่อให้สามารถทราบระดับการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์เสื่อมเนื้อสุกรได้อย่างรวดเร็ว (Rapid test kit) เพื่อการเฝ้าระวังความเสี่ยง (risk) และการเสื่อม (spoilage) ของเนื้อสุกรในกรุงเทพมหานคร

ชุดตรวจสอบเบื้องต้นที่ศึกษาในโครงการนี้มี 2 ลักษณะ คือ ชุดตรวจสอบโดยอาศัยคุณสมบัติทางกายภาพ (physical-based) และทางชีวเคมี (biochemical-based) การศึกษาความสัมพันธ์ของการตอบสนองของชุดทดสอบ (response) ต่อปริมาณจุลินทรีย์ในรูปของสารละลาย (bacterial suspension) และปริมาณจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในเนื้อสุกร (bacterial contaminated pork) พบว่าคุณสมบัติทางชีวเคมีของจุลินทรีย์มีความสัมพันธ์กับปริมาณจุลินทรีย์มากกว่าคุณสมบัติทางกายภาพ จากนั้นจึงมีการพัฒนา 2 ชุดตรวจสอบฐานชีวเคมี คือ Oxidase test และ Catalase test ผลการศึกษาพบว่า Oxidase test มีความจำเพาะและสัมพันธ์เชิงปริมาณกับ *Pseudomonas* spp. ซึ่งเป็นจุลินทรีย์เสื่อมเนื้อสัตว์แช่เย็น โดยมีการพัฒนาแบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนอง (Response Contamination model) โดยใช้สมการถดถอยเชิงเส้น (linear regression) เพื่อใช้ในการแปลงค่าการตอบสนองของ Oxidase test ที่สังเกตได้จากการเกิดสีให้เป็นระดับการปนเปื้อน *Pseudomonas* spp. ส่วน Catalase test มีความสัมพันธ์เชิงปริมาณทั้ง *Klebsiella* spp. ซึ่งเป็นจุลินทรีย์เสื่อมเนื้อสัตว์ที่เก็บแบบไม่แช่เย็น และ *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ก่อโรคด้วย โดยมีการพัฒนาแบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนองในการแปลงค่าการตอบสนองของ Catalase test ที่สังเกตได้จากปริมาณก๊าซ (gas) ให้เป็นระดับการปนเปื้อน *Klebsiella* spp. และ *Staphylococcus aureus*

เมื่อนำชุดทดสอบที่พัฒนาได้ คือ Oxidase test kit ไปใช้วัดปริมาณการปนเปื้อนของ *Pseudomonas* spp. และ Catalase test ไปใช้วัดปริมาณการปนเปื้อนของ *Klebsiella* spp. และ

ส่วนค่าเฉลี่ยความเสี่ยงจาก *Staphylococcus aureus* ในเนื้อสุกรในเขตกรุงเทพมหานคร จำนวน 325 ตัวอย่าง ในการเก็บตัวอย่างรอบที่ 1 อยู่ที่ระดับ 56-101 คน/แสนคน/ปี ต่อมาจึงใช้ Catalase test kit ที่พัฒนาได้นำมาทดสอบเพื่อการประเมินความเสี่ยงในการเก็บตัวอย่างรอบที่ 2 จำนวน 314 ตัวอย่าง โดยผลการใช้ catalase test kit มีความสอดคล้องกับการปนเปื้อนที่ได้จากห้องปฏิบัติการ ในระดับที่ยอมรับได้เช่นเดียวกัน (Accuracy factor = 1.49) โดยค่าเฉลี่ยความเสี่ยง *Staphylococcus aureus* ที่ประเมินได้จากการใช้ Catalase test สูงกว่าค่าเฉลี่ยความเสี่ยง *Staphylococcus aureus* ที่ประเมินได้จากผลทางห้องปฏิบัติการ 147-151 คน/แสนคน/ปี อย่างไรก็ตาม เมื่อมีการปรับพารามิเตอร์ ของแบบจำลอง Response contamination ใหม่ คือ *Staphylococcus aureus* ($\log \text{cfu/cm}^2$) = (Catalase activity-0.0640)/0.1878 สามารถประเมินความเสี่ยงได้เทียบเท่ากับความเสี่ยงที่ประเมินได้จากห้องปฏิบัติการ

โดยสรุปในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้สามารถพัฒนาชุดตรวจสอบอย่างรวดเร็วในการประเมินความเสี่ยงและประเมินความเสี่ยงได้ 2 ชุดตรวจสอบ คือ Oxidase test kit และ Catalase test kit โดยชุดตรวจสอบ Catalase test kit ได้มีการปรับพารามิเตอร์ให้เหมาะสมในการประเมินความเสี่ยงเนื้อสุกรจาก *Klebsiella* spp. และ ประเมินความเสี่ยงเนื้อสุกรจาก *Staphylococcus aureus* ทำให้สามารถนำไปใช้ในการเฝ้าระวังติดตามระดับการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์เสื่อมเนื้อสัตว์ที่ให้ผลการตรวจที่รวดเร็ว ชัดเจนและราคาย่อมเยา ช่วยให้เจ้าหน้าที่ของหน่วยงานรัฐบาล ผู้ประกอบการทุกขั้นตอนในการผลิตเนื้อสุกรรวมถึงผู้บริโภค สามารถทำงานร่วมกันในการจัดการด้านความปลอดภัยของเนื้อสุกรที่เขียงตลาดสด จึงเท่ากับเป็นการส่งเสริมด้านความปลอดภัยอาหารที่ได้จากปศุสัตว์ ดังนั้น เพื่อให้ประเทศไทยสามารถรักษาความมั่นคงทางอาหารไว้ จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่หน่วยงานของรัฐบาลและเอกชนที่เกี่ยวข้องตลอดห่วงโซ่อุปทานเนื้อสุกร พึงพิจารณาระบบเฝ้าระวังความเสี่ยงที่เหมาะสมและเป็นไปได้ในทางปฏิบัติ เพื่อลดปัญหาของโรคอาหารเป็นพิษดังกล่าวลงและส่งเสริมการบริโภคเนื้อสุกรที่มีคุณภาพด้วย

Abstract

Bacterial contamination in pork was responsible for the foodborne disease and spoilage. The monitoring of bacterial contamination demands a lag time of laboratory analysis. Therefore rapid test kit was developed to promptly evaluate the contamination on site. The preliminary test kits were initiated and based on physical and biochemical properties. The result indicated that Oxidase test was specific and correlated with concentration of *Pseudomonas* spp. which is a major spoilage bacterium in pork stored in refrigerator. The response contamination model was developed to convert the color response of oxidase test to be contamination level using linear regression. While catalase test was linearly correlated with *Klebsiella* spp., which is a major bacterium in pork stored without refrigerator, and *Staphylococcus aureus*, which is a foodborne pathogen. Likewise the gas response contamination models for *Klebsiella* spp. and *Staphylococcus aureus* were developed. After developed oxidase and catalase test kits were used to evaluate the concentration of *Pseudomonas* spp., *Klebsiella* spp. and *Staphylococcus aureus* in 314 pork samples from 16 traditional retail markets in 6 regions of Bangkok. The concentrations of *Pseudomonas* spp. from oxidase test kit were higher than those of *Pseudomonas* spp. from laboratory analysis. Even though for the spoilage assessment of pork, *Klebsiella* spp. concentrations from catalase test kit were 8.13-8.82 log cfu/cm² which were higher than that those from laboratory analysis at 5.63-6.06 log cfu/g. The agreement of catalase test kit and laboratory result were acceptable (Accuracy factor = 1.36). The response contamination model of *Klebsiella* spp. was reparameterized as $Klebsiella \text{ (log cfu/cm}^2\text{)} = (\text{Catalase activity} - 0.1914) / 0.0995$ to achieve the same concentration level of laboratory analysis. Average risk of *Staphylococcus aureus* from 325 pork samples in Bangkok for the first sampling round was 56-101/100,000 people at risk annually. Applying the catalase test kit as a tool for risk assessment in the second sampling round of 314 pork samples revealed an acceptable agreement with results from laboratory analysis (Accuracy factor = 1.49). The average risk per 100,000 people from laboratory result was 147-151 annually. However The response contamination model of *Staphylococcus aureus* was reparameterized as $Staphylococcus aureus \text{ (log cfu/cm}^2\text{)} = (\text{Catalase activity} - 0.0640) / 0.1878$ to obtain the same concentration level of laboratory analysis.

บทคัดย่อ

การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในเนื้อสุกรก่อให้เกิดปัญหา โรคอาหารเป็นพิษและการเสื่อมทางจุลินทรีย์ของเนื้อสุกร การเฝ้าระวังการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ต้องใช้ระยะเวลาการตรวจทางห้องปฏิบัติการทำให้เกิดข้อจำกัดที่สำคัญ จึงมีการพัฒนาชุดตรวจสอบจุลชีววิทยาเพื่อให้สามารถทราบระดับการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในเนื้อสุกรได้อย่างรวดเร็ว ชุดตรวจสอบเบื้องต้นที่ศึกษาในโครงการนี้มี 2 ลักษณะ คือ ชุดตรวจสอบโดยอาศัยคุณสมบัติทางกายภาพและทางชีวเคมี การศึกษาความสัมพันธ์ของการตอบสนองของชุดทดสอบ (response) ต่อปริมาณจุลินทรีย์ในรูปของสารละลายและปริมาณจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในเนื้อสุกร พบว่า คุณสมบัติทางชีวเคมีของจุลินทรีย์มีความสัมพันธ์กับปริมาณจุลินทรีย์มากกว่าคุณสมบัติทางกายภาพ จากนั้นจึงมีการพัฒนา 2 ชุดตรวจสอบฐานชีวเคมี คือ Oxidase test และ Catalase test ผลการศึกษา พบว่า Oxidase test มีความจำเพาะและสัมพันธ์เชิงปริมาณกับ *Pseudomonas* spp. ซึ่งเป็นจุลินทรีย์เสื่อมเนื้อสัตว์แช่เย็น โดยมีการพัฒนาแบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนอง (Response Contamination model) โดยใช้สมการถดถอยเชิงเส้น (linear regression) เพื่อใช้ในการแปลงค่าการตอบสนองของ Oxidase test ที่สังเกตได้จากการเกิดสีให้เป็นระดับการปนเปื้อน *Pseudomonas* spp. ส่วน Catalase test มีความสัมพันธ์เชิงปริมาณทั้ง *Klebsiella* spp. ซึ่งเป็นจุลินทรีย์เสื่อมเนื้อสัตว์ที่เก็บแบบไม่แช่เย็น และ *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ก่อโรคด้วย โดยมีการพัฒนาแบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนองในการแปลงค่าการตอบสนองของ Catalase test ที่สังเกตได้จากปริมาณก๊าซ (gas) ให้เป็นระดับการปนเปื้อน *Klebsiella* spp. และ *Staphylococcus aureus* เมื่อนำชุดทดสอบที่พัฒนาได้ คือ Oxidase test kit ไปใช้วัดปริมาณการปนเปื้อน *Pseudomonas* spp. และ Catalase test ไปใช้วัดปริมาณการปนเปื้อน *Klebsiella* spp. และ *Staphylococcus aureus* ในเนื้อสุกร 16 ตลาดสดทั่วกรุงเทพมหานครรวม 6 เขต จำนวน 314 ตัวอย่าง พบว่า Oxidase test kit ให้ผลการประเมินการเสื่อมเนื้อสุกรจากการปนเปื้อน *Pseudomonas* spp. สูงกว่าการปนเปื้อนที่วิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ แม้ว่าผลการประเมินการเสื่อมเนื้อสุกรจากการปนเปื้อน *Klebsiella* spp. โดยใช้ Catalase test kit พบการปนเปื้อน $8.13-8.82 \log \text{ cfu/cm}^2$ ซึ่งสูงกว่าการปนเปื้อนที่วิเคราะห์ได้ทางห้องปฏิบัติการ $\log 5.63-6.06 \log \text{ cfu/g}$ อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์ความสอดคล้อง (agreement) กับผลการปนเปื้อนที่วิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการในระดับที่ยอมรับได้ (Accuracy factor = 1.36) และ เมื่อมีการปรับพารามิเตอร์ของแบบจำลอง Response Contamination แล้วก็ทำให้แบบจำลองใหม่ คือ $Klebsiella (\log \text{ cfu/cm}^2) = (\text{Catalase activity}-0.1914)/0.0995$ สามารถประเมินการเสื่อมเนื้อสุกรจากการปนเปื้อน *Klebsiella* spp. ได้เท่ากับค่าจากห้องปฏิบัติการ ส่วนค่าเฉลี่ยความเสี่ยงจาก *Staphylococcus aureus* ในเนื้อสุกรในเขตกรุงเทพมหานครจำนวน 325 ตัวอย่าง ในการเก็บตัวอย่างรอบที่ 1 อยู่ที่ระดับ 56-101 คน/แสนคน/ปี ต่อมาจึงใช้ Catalase test kit ที่พัฒนาได้นำมาทดสอบเพื่อการประเมินความเสี่ยงในการเก็บตัวอย่างรอบที่ 2 จำนวน 314 ตัวอย่าง โดยผลการใช้ catalase test kit มีความสอดคล้องกับการปนเปื้อนที่ได้จากห้องปฏิบัติการในระดับที่ยอมรับได้เช่นเดียวกัน (Accuracy factor = 1.49) โดยค่าเฉลี่ยความเสี่ยง *Staphylococcus aureus* ที่ประเมินได้จากการใช้ Catalase test สูงกว่าค่าเฉลี่ยความเสี่ยง *Staphylococcus aureus* ที่ประเมินได้จากผลทางห้องปฏิบัติการ 147-151 คน/แสนคน/ปี อย่างไรก็ตาม เมื่อมีการปรับพารามิเตอร์ของแบบจำลอง Response contamination ใหม่ คือ $Staphylococcus aureus (\log \text{ cfu/cm}^2) = (\text{Catalase activity}-0.0640)/0.1878$ สามารถประเมินความเสี่ยงได้เทียบเท่ากับความเสี่ยงที่ประเมินได้จากห้องปฏิบัติการ

สัญญาเลขที่ SRI5820202

โครงการ “การพัฒนาชุดตรวจสอบจุลชีววิทยาอย่างรวดเร็วเพื่อการเฝ้าระวังความเสี่ยงของ
เชื้อสุกรในกรุงเทพมหานคร”

ชื่อผู้รับทุน : รศ.น.สพ.ดร. ศุภชัย เนื่อนवलสุวรรณ

ผู้ร่วมโครงการ

ชื่อ-สกุล สมภพ ฉัตรภรณ์

ตำแหน่ง ที่ปรึกษา สำนักงานสัตวแพทย์สาธารณสุข สำนักอนามัย กรุงเทพมหานคร

หน่วยงาน สำนักงานสัตวแพทย์สาธารณสุข สำนักอนามัย กรุงเทพมหานคร

ที่อยู่ ศูนย์บริการสาธารณสุข 4 ถ.ประชาสงเคราะห์ เขตดินแดง กรุงเทพฯ 10400

โทร 02 245 4271 โทรสาร 02 248 3596

E-mail csompop@yahoo.com

ชื่อ-สกุล นายวรฉัตร ตั้งสวัสดิ์

ตำแหน่ง นายสัตวแพทย์ชำนาญการพิเศษ หัวหน้ากลุ่มชันสูตรโรคสัตว์

หน่วยงาน สำนักงานสัตวแพทย์สาธารณสุข สำนักอนามัย กรุงเทพมหานคร

ที่อยู่ ศูนย์บริการสาธารณสุข 4 ถ.ประชาสงเคราะห์ เขตดินแดง กรุงเทพฯ 10400

โทร 02 245 4271 โทรสาร 02 248 3596

E-mail vorrachad@hotmail.com

ชื่อ-สกุล นายชัยยศ เสดะจันทน์

ตำแหน่ง นายสัตวแพทย์ชำนาญการพิเศษ

หัวหน้ากลุ่มควบคุมและการตรวจเนื้อสัตว์

หน่วยงาน สำนักงานสัตวแพทย์สาธารณสุข สำนักอนามัย กรุงเทพมหานคร

ที่อยู่ ซอยอาจณรงค์ แขวงคลองเตย เขตคลองเตย กรุงเทพมหานคร 10140

โทร-โทรสาร 02 249 5273 มือถือ 081 615 3869

E-mail cs_junior@hotmail.com

โครงการเริ่มต้นเมื่อวันที่ 1 เมษายน พ.ศ. 2558 โครงการสิ้นสุดเมื่อวันที่ 31 มีนาคม พ.ศ. 2560
รวมเวลาที่ทำวิจัยทั้งสิ้น 2 ปี

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. การประเมินความเสี่ยงของ *Staphylococcus aureus* ที่ปนเปื้อนในเนื้อสุกรที่จำหน่ายในเขตกรุงเทพมหานคร (quantitative microbial risk assessment)
2. การประเมินการเสื่อมของเนื้อสุกรที่จำหน่ายในเขตกรุงเทพมหานคร (spoilage assessment)
3. การพัฒนาวิธีการตรวจสอบจุลินทรีย์อย่างรวดเร็วในเนื้อสุกร (rapid microbial test kit development)
4. การใช้การตรวจสอบจุลินทรีย์อย่างรวดเร็วเพื่อประเมินการเสื่อมเนื้อสุกร (rapid test kit as spoilage assessment tool)
5. การใช้การตรวจสอบจุลินทรีย์อย่างรวดเร็วเพื่อประเมินความเสี่ยงเนื้อสุกร (rapid test kit as risk assessment tool)
6. สำนักงานสัตวแพทย์สาธารณสุขของกรุงเทพมหานคร สามารถประเมินความเสี่ยงเพื่อช่วยในการเฝ้าระวังความเสี่ยงโรคอาหารเป็นพิษจากการบริโภคเนื้อสุกรที่จำหน่ายในเขตกรุงเทพมหานคร

กิจกรรมต่างๆ เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ของการวิจัยแต่ละข้อ

วัตถุประสงค์	กิจกรรมหลัก	กิจกรรมรอง
1. การประเมินความเสี่ยง (risk assessment)	การประเมินการสัมผัส	การเก็บตัวอย่างเนื้อสุกรในเขต กทม.
		วิเคราะห์การปนเปื้อน <i>S.aureus</i> ในตัวอย่างเนื้อสุกร
	การอธิบายอันตราย	วิเคราะห์ข้อมูลตามแบบจำลองทางคณิตศาสตร์
	การอธิบายความเสี่ยง	วิเคราะห์ข้อมูลตามแบบจำลองทางคณิตศาสตร์
2. การประเมินการเสื่อมเนื้อมัน (spoilage assessment)	ระดับการปนเปื้อน spoilage bacteria	วิเคราะห์การปนเปื้อน Spoilage bacteria ในตัวอย่างเนื้อสุกร
		วิเคราะห์ข้อมูลตามแบบจำลองทางคณิตศาสตร์
		การแยก Spoilage bacteria หลัก จากตัวอย่างเนื้อสุกร เพื่อใช้ในการพัฒนา Rapid test kit
3. การพัฒนาวิธีการตรวจสอบ จุลินทรีย์อย่างรวดเร็วในเนื้อสุกร (rapid microbial test kit)	ศึกษา test kits กับ เซลล์แบคทีเรีย	คัดเลือก microbial test ที่เห็นผลการตอบสนองที่รวดเร็วและชัดเจน
		ศึกษารูปแบบ (platform) ของ microbial test ให้ใช้ได้ ในทางปฏิบัติ เช่น เลือกใช้อุปกรณ์สามัญทั่วไปแทน อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ
		ศึกษาความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์แบคทีเรียและระดับ การตอบสนองของ test kits เบื้องต้น
		ปรับการตอบสนองให้มีความสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ แบคทีเรีย
	ศึกษา test kits กับ เซลล์บนเนื้อสุกร	ศึกษาความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์แบคทีเรียและระดับ การตอบสนองของ test kits เบื้องต้น
		ปรับการตอบสนองให้มีความสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ แบคทีเรีย
4. การใช้การตรวจสอบจุลินทรีย์อย่าง รวดเร็วเพื่อการประเมินการเสื่อมเนื้อมัน	ทดสอบ test kit ภาคสนามในการ ประเมินการเสื่อม	ตรวจสอบระดับ Spoilage bacteria ในเนื้อสุกรในตลาดสดด้วย test kit
		ทวนสอบระดับ Spoilage bacteria ของ test kit โดย การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ
		การวิเคราะห์ความสอดคล้องของความเสื่อมของเนื้อสุกร จาก test kit และจากห้องปฏิบัติการ
5. การใช้การตรวจสอบจุลินทรีย์อย่าง รวดเร็วเพื่อการประเมิน ความเสี่ยงเนื้อมัน	ทดสอบ test kit ภาคสนามในการ ประเมินความเสี่ยง	ตรวจสอบระดับ <i>S.aureus</i> ในเนื้อสุกรในตลาดสดด้วย test kit
		ทวนสอบระดับ <i>S.aureus</i> ของ test kit โดยการวิเคราะห์ ทางห้องปฏิบัติการ
		เปรียบเทียบผลประเมินความเสี่ยง <i>S.aureus</i> จาก test kit และ จากห้องปฏิบัติการ
		การวิเคราะห์ความสอดคล้องของการประเมินความเสี่ยง จาก test kit และจากห้องปฏิบัติการ
6. ความสามารถในการประเมินความเสี่ยง	การฝึกอบรม	การฝึกอบรมในระดับพื้นฐานถึงระดับสามารถประเมิน ความเสี่ยงได้

บทที่ 1

การประเมินความเสี่ยง (Risk Assessment)

การประเมินความเสี่ยง (risk assessment) เป็นองค์ประกอบวิทยาศาสตร์ใจกลางของการวิเคราะห์ความเสี่ยง (risk analysis) และได้มีการพัฒนาขึ้นมา เนื่องจาก ความจำเป็นของการตัดสินใจเพื่อคุ้มครองผู้บริโภคโดยอยู่บนพื้นฐานของความไม่รู้ การประเมินความเสี่ยงอาจจะอยู่ในรูปของผลเสียที่มีต่อชีวิตและสุขภาพอันเกิดจากการสัมผัสกับอันตรายในช่วงระยะเวลาหนึ่ง แม้ว่าการจัดการความเสี่ยง (risk management) และการประเมินความเสี่ยงจะมีความสัมพันธ์กันแต่ควรจะแยกการดำเนินกิจกรรมออกจากกัน โดยที่อาศัยการสื่อสารความเสี่ยง (risk communication) ในการเชื่อมโยงระหว่าง การดำเนินการกัน กระบวนการจัดการความเสี่ยงจะมีขั้นตอนหนึ่งในการพิจารณาความจำเป็นและความ เป็นไปในการประเมินความเสี่ยง หากว่ากระบวนการจัดการความเสี่ยงซึ่งบ่งว่าจะต้องมีการประเมิน ความเสี่ยงแล้ว ผู้จัดการความเสี่ยงจะต้องประสานงานกับผู้ประเมินความเสี่ยงให้ดำเนินการประเมิน ความเสี่ยงตามวัตถุประสงค์ของผู้จัดการความเสี่ยงและสามารถตอบคำถามประเด็นความปลอดภัยของอาหาร ผู้จัดการความเสี่ยงดำเนินการกำหนดแนวทางการประเมินความเสี่ยง กำหนดกรอบระยะเวลาและจัดหา ทรัพยากรที่จำเป็นในการทำให้การประเมินความเสี่ยงสำเร็จลงได้

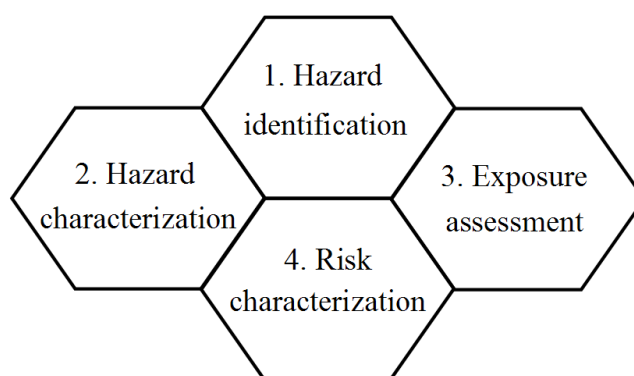
ประเทศสมาชิกขององค์การการค้าโลกมีพันธะผูกพัน (Bound) ต่อความตกลงว่าด้วยการใช้ มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืชซึ่งได้มีการกำหนดให้มีการประเมินความเสี่ยงให้มีความสอดคล้อง กับความตกลงว่าด้วยการใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืชในการพัฒนาและใช้มาตรฐานอาหาร เพื่อการค้าระหว่างประเทศ ขอบเขตของความตกลงว่าด้วยการใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช กับการประเมินความเสี่ยงต่อชีวิตและสุขภาพได้กำหนดให้ประเทศสมาชิกดำเนินการ

- สร้างความมั่นใจว่าจะนำมาตรการมาใช้เท่าที่จำเป็นในการคุ้มครองชีวิตและสุขภาพของมนุษย์
- กำหนดมาตรการบนพื้นฐานของการประเมินความเสี่ยง โดยใช้วิธีการที่พัฒนาขึ้นมาโดย องค์การระหว่างประเทศที่เกี่ยวข้องกับมาตรการนั้น
- ใช้มาตรการปฏิบัติที่แตกต่างไปจากธรรมเนียมปฏิบัติได้ก็ต่อเมื่อระดับคุ้มครองที่เหมาะสมของ ประเทศนั้นสูงกว่าและมีความสอดคล้องกับเป้าความปลอดภัยของอาหารที่สมเหตุสมผล
- ใช้หลักการความเท่าเทียมกัน แม้ว่าประเทศส่งออกใช้มาตรการที่แตกต่างกันแต่สามารถสร้าง ระดับคุ้มครองที่เหมาะสมได้ไม่แตกต่างกัน

ความตกลงว่าด้วยการใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืชได้สะท้อนให้เห็นถึงแนวคิด ว่าข้อสรุปวิทยาศาสตร์จากการประเมินความเสี่ยงต้องอยู่บนพื้นฐานของมาตรการภายใต้ความตกลงว่าด้วย การใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช และในทางกลับกันได้ส่งผลให้มีการกำหนดมาตรฐานโดยฐาน ความเสี่ยง อย่างไรก็ตาม กฎหมายที่สืบเนื่องมาจากกรณีพิพาทระหว่างประเทศยังคงมีข้อจำกัดและเปิด

โอกาสให้มีการตีความได้อีก ยกตัวอย่างเช่น การใช้ดุลพินิจถ่วงดุลระหว่างระดับความเสี่ยงและมาตรการที่ 15 ในความตกลงว่าด้วยการใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืชในกรณีระดับความเสี่ยงต่ำ และกรณีที่มีการตัดสินความเพียงพอของหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ ซึ่งจะตัดสินได้ด้วยความหนักแน่นทางวิทยาศาสตร์และคุณภาพของการประเมินความเสี่ยง

การประเมินความเสี่ยงเป็นการประเมินการเกิดขึ้นและการแพร่กระจายตัวของอันตรายในขั้นตอนต่างๆ ตั้งแต่การผลิตไปจนถึงการบริโภค ก่อนจะได้ค่าประมาณความเสี่ยง ความถูกต้องของค่าประมาณความเสี่ยงจะขึ้นอยู่กับความไม่รู้ของข้อมูล dose-response ความสำคัญของการประเมินความเสี่ยงจึงอยู่ที่ความสามารถในการจำลองหรือทำนายผลกระทบของการจัดการความเสี่ยงที่มีผลต่อค่าประมาณความเสี่ยง (risk estimate) การประเมินความเสี่ยง (ภาพที่ 1.1) ประกอบด้วย 4 ขั้นตอน ตามแนวทางของคณะกรรมการวิชาการเกณฑ์อาหารหรือ Codex Alimentarius Commission (CAC)



ภาพที่ 1.1 องค์ประกอบการประเมินความเสี่ยง (Risk assessment)

1. การระบุอันตราย (Hazard identification)

การระบุอันตรายเป็นขั้นตอนที่เป็นหัวใจของการประเมินความเสี่ยงและเป็นขั้นตอนแรกสุดของกระบวนการประเมินความเสี่ยง การระบุอันตรายอาจจะไม่จำเป็นต้องดำเนินการได้หากว่าได้มีการพัฒนาโครงร่างความเสี่ยง (Risk profile) ตั้งแต่ระยะที่ 1 ของการจัดการความเสี่ยงแล้ว สำหรับอันตรายจุลินทรีย์แล้ว โครงร่างความเสี่ยงอาจจะเป็นการระบุปัจจัยเสี่ยงที่สัมพันธ์กับสายพันธุ์ย่อยของจุลินทรีย์ก่อโรค และผู้จัดการความเสี่ยงจะเป็นผู้ตัดสินใจว่าการประเมินความเสี่ยงที่ดำเนินการต่อไปจะเน้นที่สายพันธุ์ย่อยนั้น

2. การอธิบายอันตราย (Hazard characterization)

ผู้ประเมินความเสี่ยงทำหน้าที่อธิบายธรรมชาติและระดับของผลเสียสุขภาพ (Adverse health effect) ที่มีความสัมพันธ์กับอันตรายจำเพาะนั้นๆ ถ้าเป็นไปได้ควรได้มีการสร้าง “ความสัมพันธ์การตอบสนองต่อปริมาณอันตราย” หรือ Dose-response relationship ในแต่ละระดับของปริมาณอันตรายที่สัมผัสได้จากอาหาร ณ จุดบริโภคและความเป็นไปได้ของผลเสียทางสุขภาพที่สอดคล้องกับปริมาณอันตรายที่ได้รับสัมผัส ชนิดของข้อมูลที่สามารถสร้าง “ความสัมพันธ์การตอบสนองต่อปริมาณอันตราย”

ได้ เช่น การศึกษาพิษต่อสัตว์ทดลอง การศึกษาการสัมผัสของมนุษย์ทางคลินิก ข้อมูลระบาดวิทยาจากการสืบสวนโรค

ชนิดของการตอบสนองในการอธิบายอันตราย อาจจะแบ่งออกได้ตามคำถามความเสี่ยงที่ผู้จัดการความเสี่ยงมอบหมายให้ผู้ประเมินความเสี่ยงดำเนินการ กรณีอันตรายจุลินทรีย์ อาจจะเป็นอัตราการติดเชื้อ อัตราการเจ็บป่วย อัตราการเข้ารับรักษาตัวในโรงพยาบาล และอัตราการเสียชีวิต ที่สัมพันธ์กับปริมาณจุลินทรีย์ที่ได้รับสัมผัส ถ้าหากมีการวิเคราะห์ทางเศรษฐศาสตร์ด้วย การอธิบายอันตรายควรจะมีการผนวกผลกระทบแทรกซ้อนเพิ่มเติมของโรคอาหารเป็นพิษ เช่น โรคไตวายจาก *E.coli* O157:H7 หรือ กลุ่มอาการ Guillain-Bar จาก *Campylobacter*

เป็นการประเมินความน่าจะเป็นหรือจำนวนการเจ็บป่วยต่อเนื่องจากการสัมผัสกับจุลินทรีย์ก่อโรค โดยอาศัยข้อมูลจากขั้นตอน การประเมินการสัมผัส

การตอบสนองของประชากรมนุษย์เมื่อได้รับจุลินทรีย์เข้าในร่างกายนั้น เป็นกระบวนการที่ซับซ้อนอย่างยิ่ง เนื่องจาก ประกอบด้วยปัจจัยมากมายที่เข้ามาเกี่ยวข้อง แต่อาจจะสามารถแจกแจงได้เป็น 3 องค์ประกอบหลักที่สำคัญ คือ

- องค์ประกอบทางจุลชีววิทยา (Microbiological factor)
- องค์ประกอบทางร่างกาย (Host factor)
- องค์ประกอบทางอาหารบริโภค (Food matrix factor)

3. การประเมินการสัมผัส (Exposure assessment) เป็นการประเมินโอกาสในการรับสัมผัส (exposure) กับอันตราย ซึ่งในที่นี้ ก็คือ การได้รับจุลินทรีย์ก่อโรคที่อาจจะปนเปื้อนมากับอาหารและน้ำที่บริโภคเข้าสู่ร่างกาย ดังนั้น ข้อมูลสำคัญในการประเมินการสัมผัส ก็คือ

3.1 ข้อมูลการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารและน้ำ (Prevalence & Concentration)

- ความชุก (Prevalence) การแจกแจงความน่าจะเป็นของความชุกจะใช้ Beta distribution เป็นการอาศัยหลักการกระบวนการทวินาม (Binomial process) กล่าวคือ ความชุกหรือการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในตัวอย่างที่สนใจนั้นมีความเป็นไปได้เพียง 2 กรณีเท่านั้น คือ มีการปนเปื้อนและไม่มีการปนเปื้อน ดังนั้น จึงได้นำเอาหลักการนี้มาวิเคราะห์หาระดับความชุกหรือการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในตัวอย่างหรือตัวแปรสุ่มที่สนใจ

- ความเข้มข้น (Concentration) การเลือกแบบการแจกแจงความน่าจะเป็นสำหรับความเข้มข้น (Poisson Distribution) ระดับความเข้มข้นของจุลินทรีย์ในตัวอย่างนั้น จะสอดคล้องกับแบบการแจกแจงแบบ Poisson ซึ่งมีการกำหนดค่าพารามิเตอร์ λ (อ่านว่า แลมดา) เพื่อสร้างการแจกแจงความน่าจะเป็น ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ ก็คือ ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นของจุลินทรีย์ก่อโรคในตัวอย่างที่ศึกษา

3.2 ปริมาณการบริโภคเนื้อสุกร (pork consumption)

ข้อมูลปริมาณการบริโภคมีการรายงานโดยสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติในรูปแบบของเอกสาร และแบบ search online (<http://consumption.acfs.go.th/index.php>)

3.3 แบบจำลองที่ใช้ในการประเมินการสัมผัส

ความน่าจะเป็นในการสัมผัส (P_E) เป็นการอธิบายโอกาสหรือความเป็นไปได้ที่ร่างกายจะได้รับสัมผัสจุลินทรีย์ก่อโรคน้อย 1 หน่วยก่อโรค (เซลล์แบคทีเรีย หรือ อนุภาคไวรัส) ซึ่ง P_E เป็นค่าที่เป็นตัวแทนอธิบายโอกาสการเกิดเหตุการณ์การรับสัมผัสกับจุลินทรีย์ก่อโรคเข้าสู่ร่างกายจากการบริโภคอาหารและน้ำ โดยใช้แบบจำลอง

$$P_E = P(1 - e^{-N}) \quad (1.1)$$

โดยที่

P คือ ความชุกของจุลินทรีย์ก่อโรคในเนื้อสุกร

N คือ จำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคที่ได้รับเข้าในร่างกาย

โดยที่

$$N = \text{Concentration} \times \text{Consumption} \quad (1.2)$$

โดยที่

Concentration คือ ความเข้มข้นของจุลินทรีย์ก่อโรคในเนื้อสุกร

Consumption คือ ปริมาณการบริโภคเนื้อสุกรครั้ง (serving) หรือ ต่อมื้อ (meal)

4. การอธิบายความเสี่ยง (Risk characterization) เป็นการประเมินโอกาสในการเจ็บป่วยจากการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ก่อโรค ดังนั้น ขั้นตอนนี้จึงเป็นการบูรณาการเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นในขั้นตอนที่ 3 ตามด้วย ขั้นตอนที่ 2 กล่าวคือ เป็นการพิจารณาความน่าจะเป็นต่อเนื่องของ 2 เหตุการณ์หลัก คือ ¹ เหตุการณ์ในการสัมผัสกับจุลินทรีย์ก่อโรคปริมาณหนึ่ง (dose) ตามมาด้วย ² เหตุการณ์การเกิดโรค (response) อันเกิดจากปริมาณจุลินทรีย์ที่ได้รับ ดังนั้น แบบจำลองที่ใช้ในการประเมินความเสี่ยง รวมทั้ง 2 เหตุการณ์ต่อเนื่องกัน คือ

$$P_S = P_E \times P_I(d) \quad (1.3)$$

โดยที่

P_S คือ ค่าประมาณความเสี่ยงจากการสัมผัสกับเนื้อสุกรเพียง 1 ครั้ง

P_E คือ ความน่าจะเป็นในการสัมผัสกับจุลินทรีย์อย่างน้อย 1 หน่วยก่อโรค

$P_I(d)$ คือ ค่าน่าจะเป็นในการเจ็บป่วย หรือ สัดส่วนผู้ป่วยเมื่อได้รับจุลินทรีย์ก่อโรคจำนวน d

ในสมการ (3) เป็นค่าประมาณความเสี่ยงจากการสัมผัสกับอาหารหรือน้ำเพียง 1 ครั้ง (single exposure) อย่างไรก็ตาม มีความเป็นไปได้สูงที่อาจจะมีการสัมผัสกับอาหารหรือน้ำที่มีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ก่อโรคมามากกว่า 1 ครั้ง (multiple exposure)

$$P_M = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - P_S) \quad (1.4)$$

โดยที่

P_M คือ ค่าประมาณความเสี่ยงจากการสัมผัสกับเชื้อสุกร n ครั้งในระยะเวลาที่สนใจ เช่น 1 ปี

P_S คือ ค่าประมาณความเสี่ยงจากการสัมผัสกับเชื้อสุกรเพียง 1 ครั้ง

จากนั้น จึงนำข้อมูลทั้งหมดมาจำลองเหตุการณ์จริง (Monte Carlo Simulation) ซ้ำๆ อย่างต่ำ 10,000 รอบ (iteration) โดยอาศัยโปรแกรม @Risk 4.5.3 Professional edition (Risk analysis Add-in for Microsoft Excel : Palisade Corporation) ก็จะได้การแจกแจงค่าน่าจะเป็นของความเสี่ยงของประชากรไทยต่อจุลินทรีย์ก่อโรค

1.1 การระบุอันตราย (Hazard identification)

โรคอาหารเป็นพิษจาก *Staphylococcus aureus* (Foodborne illness caused by *S.aureus*)

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม โดยอยู่รวมกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงอุ้งน พบได้ทั่วไปในอากาศและบนผิวหนังของร่างกาย เช่น บริเวณใบหน้า ใบหู มือ เป็นต้น ดังนั้นอาหารที่ใช้มือในการเตรียมจะมีโอกาสที่จะพบเชื้อนี้ได้ อาหารที่เคยมีรายงานการระบาดมักจะมีน้ำใช้ได้ต่ำ เนื่องจาก *Staphylococcus aureus* สามารถเพิ่มจำนวนได้ในอาหารที่มีน้ำใช้ได้ต่ำประมาณ 0.85 เช่น อาหารที่มีความเค็มสูง เป็นต้น ในระหว่างกระบวนการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวน *Staphylococcus aureus* จะหลั่งน้ำย่อย(enzyme) เพื่อใช้ย่อยโมเลกุลอาหารให้เล็กลง และน้ำย่อยนี้เองที่เป็นสารพิษ หรือ enterotoxin ทำให้เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษชนิด การรับพิษผ่านอาหาร (foodborne intoxication) ข้อเหมือนและข้อแตกต่างของ *Staphylococcus aureus* กับจุลินทรีย์ก่อโรคอาหารเป็นพิษอื่นๆ คือ กลุ่มแบคทีเรียลำไส้ (enteric family) และแบคทีเรียสร้างสปอร์ (spore-forming bacteria) โดยที่ลักษณะร่วมกับกลุ่มแบคทีเรียลำไส้ คือ มีความสัมพันธ์โดยตรงกับร่างกายคนและสัตว์ แต่พบ *Staphylococcus aureus* ที่ผิวหนังไม่ใช่ในลำไส้ ลักษณะร่วมกับแบคทีเรียสร้างสปอร์ คือ สร้าง extracellular enzyme (protein) ซึ่งเป็นพิษต่อมนุษย์ แต่ *Staphylococcus aureus* ไม่สร้างสปอร์ ดังนั้น จึงไม่อยู่รอดจากการปรุงอาหาร นอกจากโรคอาหารเป็นพิษแล้ว *Staphylococcus aureus* ยังเป็น เป็นสาเหตุของการติดเชื้อของแผลที่ผิวหนังและ กลุ่มอาการ toxic shock syndrome ด้วย

1.1.1 ลักษณะและการจัดแบ่ง

(characteristics and classification)

Staphylococcus aureus เป็น type species ของ Genus *Staphylococcus* มีความใกล้ชิดกับ Genus *Micrococcus* สมาชิกในกลุ่มนี้จะเป็นจุลินทรีย์ที่ทนร้อนในอากาศ เป็นกลุ่มที่ไม่เคลื่อนไหว (non-motile) ติดสีแกรมบวก (Gram positive) เป็น mesophilic bacteria ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต (aerobic) ไม่สร้างสปอร์ (non-spore former) เป็นกลุ่มที่ใช้หรือไม่ใช้ออกซิเจนในการสร้างพลังงานก็ได้ (facultative anaerobe) การแบ่งแยก *Staphylococcus aureus* จาก *Staphylococcus* ชนิดอื่นๆ โดยอาศัยการผลิต coagulase การใช้พลังงานจากน้ำตาลชนิดต่างๆ และความไวต่อ Novobiocin ส่วนความแตกต่างของแต่ละ strain ของ *Staphylococcus aureus* จัดแบ่งโดย Hajek and Marsalek มีอยู่ด้วยกัน 6 biotype โดยอาศัยคุณสมบัติ เช่น การผลิต staphylokinase และ beta-hemolysin การเกิดการจับตัวแข็ง (coagulation) ของ bovine plasma และการเจริญเติบโตใน crystal violet agar

Staphylococcus aureus ชนิดที่ก่อโรคในคนหรือมีแหล่งที่มาจากคนนั้น จะเป็น biotype A มีคุณสมบัติผลิต staphylokinase และ thermonuclease(TNase) เกิดการจับตัวแข็งของ human plasma แต่ไม่เกิดการจับตัวแข็งกับ bovine plasma สร้าง alpha-hemolysin ส่วนการสร้าง beta-hemolysin ไม่มีความแน่นอน ส่วน biotype B พบได้ในสัตว์ปีกและสุกร biotype C พบได้ในสัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดใหญ่และขนาดเล็ก biotype D พบได้ในกลุ่มกระต่าย

Staphylococcus aureus สามารถเจริญเติบโตได้ที่ความเข้มข้นเกลือสูงถึงร้อยละ 10 (น้ำหนัก/ปริมาตร) แต่แบคทีเรียอื่นเกือบจะไม่เจริญเติบโตที่ความเข้มข้นเกลือสูงกว่าร้อยละ 4 เท่านั้น ความทนเกลือเป็นคุณสมบัติที่ทำให้สามารถทนความแห้งหรือน้ำใช้ได้ในระดับต่ำ ($a_w = 0.85$) ดังนั้น *Staphylococcus aureus* จึงสามารถแข่งขันในการเจริญเติบโตในอาหารที่เค็มและแห้งได้ดี

อาหารที่เกี่ยวข้องกับการระบาด เนื้อสัตว์สุก(ผ่านความร้อน) แฮม เนื้อสัตว์ปีก อาหารทะเล ขนมอบไส้ครีม(cream-filled bakery products) เนยแข็ง นมผง อาหารที่มีโปรตีนสูงและเหลือจากการบริโภค(high-protein leftover food)

1.1.2 ระบาดวิทยา

(Epidemiology)

Staphylococcus aureus พบได้ทั่วไปบนผิวหนังและเยื่อเมือกของร่างกายของสัตว์เลือดอุ่นทั่วไปรวมถึงคนด้วย โดยทั่วไปแล้ว *Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อประจำถิ่น (normal flora) บนผิวหนังจึงพบ *Staphylococcus aureus* ได้เสมอในปริมาณไม่มากนัก อย่างไรก็ตาม *Staphylococcus aureus* จะมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นในบาดแผลที่เกิดขึ้นที่ผิวหนัง เนื่องจาก *Staphylococcus aureus* เป็นสาเหตุของฝีหนองที่ผิวหนังนั่นเอง นอกจากกรณีบาดแผลที่มีหนองอันเกิดจาก *Staphylococcus aureus* แล้ว มือที่จำเป็นต้องสัมผัสกับน้ำหรือต้องล้างมือบ่อยๆ เช่น พยาบาล ผู้ที่ทำงานในโรงเชือดไก่ ก็มีแนวโน้มที่จะมี *Staphylococcus aureus* ที่ผิวหนังหรือที่มือจำนวนมาก ผิวหนังส่วนอื่นที่พบว่ามี *Staphylococcus aureus* เช่น ช่องจมูก หน้ใบหู เป็นต้น ดังนั้น อาหารที่มีการใช้มือจับต้อง(handle) จะมีโอกาสที่จะมี *Staphylococcus aureus* ได้

Staphylococcus aureus บางชนิดมีที่มาจากตัวสัตว์เอง เช่น *Staphylococcus aureus* biotype B,C D,และ E พบว่าขนมอบ เนื้อวัว ไส้กรอกสุกร อาหารทะเล และเนื้อไก่ดิบ (10) มีอุบัติการณ์ของ *Staphylococcus aureus* ในอัตราร้อยละ 10, 16, 33, 38 และ 41-84 ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังมีการสำรวจเพิ่มเติมพบ *Staphylococcus aureus* ที่ผิวหนังของสัตว์ปีกที่แข็งแรงในระดับที่ไม่มากนัก ประมาณไม่เกิน 100 เซลล์ต่อกรัม แต่จำนวน *Staphylococcus aureus* กลับเพิ่มมากขึ้นเมื่อสำรวจ *Staphylococcus aureus* ในเนื้อไก่ที่ได้จากซากไก่ผ่านกระบวนการเชือดในโรงงาน ดังนั้น อาหารประเภทเนื้อสัตว์จะมี *Staphylococcus aureus* บางส่วนจากตัวสัตว์เองและบางส่วนจากมือคนที่จับต้อง แต่ว่าเฉพาะ *Staphylococcus aureus* ที่มาจากคนเท่านั้นที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษได้ จะสังเกตได้ว่า แหล่งที่มาสำคัญของ *Staphylococcus aureus* นั้นมิได้มาจากตัวสัตว์เอง แต่แหล่งที่มา

กลับมาจากกระบวนการผลิตหรือแปรรูปเนื้อสัตว์ในโรงงาน ทั้งนี้เหตุผลสำคัญหนึ่ง คือ *Staphylococcus aureus* มีความทนทานต่อความแห้งหรือระดับน้ำใช้ได้ต่ำมาก ประมาณ 0.85 และทนต่อคลอรีนได้ดี ทำให้ *Staphylococcus aureus* คงตัวอยู่ในสิ่งแวดล้อมและก่อให้เกิดการปนเปื้อนข้าม (cross contamination) จากอุปกรณ์ไปยังเนื้อสัตว์ได้ง่าย

สถานการณ์ที่เกิดขึ้นบ่อยๆเท่าที่ผ่านมา(classical situation) คือ การเตรียมอาหารที่มีการสัมผัสโดยตรงกับมือและไม่มีการแช่เย็นเป็นเวลานานอย่างน้อย 4 ชั่วโมง อาหารหลายชนิดเหมาะที่ *Staphylococcus aureus* จะเจริญเติบโตได้แต่ที่เจริญเติบโตได้ดีมากคือ อาหารที่มีไขมัน(เชื้อสร้าง lipase ย่อยไขมันได้) และกรณีที่อาหารมีเชื้อคู่แข่งน้อย เช่น ผลิตภัณฑ์นมที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์หรืออาหารเค็ม จุลินทรีย์ไม่เจริญเติบโตในอาหารที่เป็นกรด เช่น mayonnaise แต่สามารถเจริญเติบโตได้เมื่อมีการเจือจางกรดโดยอาหารประเภทอื่น เช่น แสมหรือพุดา การให้ความร้อนซ้ำอีกครั้งจะไม่ทำลายพิษ เพราะ enterotoxin ของ *Staphylococcus aureus* ทนต่อความร้อนมาก(extremely heat stable)

แม้ว่าผู้เตรียมอาหารที่มีเซลล์ *Staphylococcus aureus* เริ่มต้นจำนวนมากที่ผิวหนึ่งจะเป็นการเพิ่มโอกาสที่จะสร้างพิษจนถึงระดับที่ก่อโรคได้มากขึ้น แต่สำหรับผู้เตรียมอาหารที่มีเซลล์ *Staphylococcus aureus* เริ่มต้นจำนวนน้อยก็ยังสามารถปนเปื้อนจุลินทรีย์ลงในอาหารได้เช่นกัน เพียงแต่อาจจะต้องใช้เวลานานขึ้นกว่าเมื่อเทียบกับจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่มากกว่าในการสร้างพิษจนถึงระดับที่ก่อโรคได้

การระบาดของ *Staphylococcus aureus* มักจะมีจำนวนผู้ป่วยไม่มากนักประมาณไม่เกิน 10 ราย แต่มีหลายรายงานที่ระบุจำนวนผู้ป่วยจำนวนมากกว่า 100 ราย เช่น การระบาดของ *Staphylococcus aureus* ในอาหารประเภทพาสต้า(pasta) ซึ่งเกิดจากการปนเปื้อนของ *Staphylococcus aureus* ในไข่ที่แปรรูปที่อุณหภูมิ 30-40°C เนื้อหมัก(salami) เกิดจากการแปรรูปเนื้อ ณ อุณหภูมิสูงกว่าปกติทำให้ *Staphylococcus aureus* เพิ่มจำนวนก่อนที่กรดจากการหมักจะยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Staphylococcus aureus* เนยแข็ง เกิดจากการเพิ่มจำนวนของ *Staphylococcus aureus* มากกว่าแบคทีเรียแลคติกในเนย นม อาหารกระป๋องที่เป็นเนื้อ ปลา ผัก เกิดจากการปนเปื้อนในกระป๋องภายหลัง(post contamination)ผ่านความร้อน จากการจับต้องรอยตะเข็บกระป๋องด้วยมือขณะที่กระป๋องยังอุ่นอยู่

1.1.3 อาการของโรคจาก *S.aureus*

(Clinical symptoms)

ปริมาณเชื้อที่คาดว่าจะทำให้ป่วย (infective dose) ประมาณ 5×10^5 เซลล์ โดยมีระยะฟักตัวโรค (incubation period) ประมาณ 1-8 ชั่วโมง แต่ส่วนมากประมาณ 2-4 ชั่วโมง ลักษณะอาการที่พบบ่อยเป็นแบบฉับ คือ อาการคลื่นไส้ (nausea) อาเจียน (vomit) พบร่วมกับอาการปวดท้อง (stomachache) และท้องเสีย (diarrhea) อาการจะนานประมาณ 1-2 วัน อาการของโรคเกิดจากพิษ ไม่ได้เกิดจากการเพิ่มจำนวนของเซลล์แบคทีเรีย แต่จำเป็นจะต้องมีเซลล์ในอาหารจำนวนมากพอที่จะ

สร้างสารพิษ (exotoxin) ที่ทำให้เกิดโรค *Staphylococcus aureus* แม้จะมีจำนวนสูงถึง 10^9 เซลล์ ก็ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงกลิ่นรสของอาหาร

1.1.4 หลักการควบคุมและป้องกัน

(Control and prevention)

จุดเริ่มต้นของการเกิดโรคอาหารเป็นพิษจาก *Staphylococcus aureus* คือ การปนเปื้อน *Staphylococcus aureus* ในอาหาร จากนั้นก็มีการเก็บรักษาหรือแปรรูปอาหาร ณ อุณหภูมิที่ *Staphylococcus aureus* สามารถเจริญเติบโตได้ในระยะเวลาที่นานเพียงพอ ดังนั้น อุณหภูมิในการแปรรูปหรือการเก็บอาหารที่ปรุงสุกแล้วเป็นกุญแจสำคัญในการควบคุมป้องกัน อาหารที่เตรียมจากการสัมผัสกับมือโดยตรง(ไม่ได้สวมถุงมือ) ควรจะแช่เย็นอาหารนั้นที่อุณหภูมิระหว่าง $0-7^{\circ}\text{C}$ ($32-45^{\circ}\text{F}$) หรือเก็บอาหารให้ร้อนอยู่เสมอที่อุณหภูมิสูงกว่า 60°C (140°F) เพื่อเป็นการป้องกัน *Staphylococcus aureus* (mesophile) เจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนในอาหาร อาหารที่ไม่เป็นกรดที่เตรียมด้วยการสัมผัสกับมือโดยตรง(ไม่ได้สวมถุงมือ) และเก็บที่อุณหภูมิระหว่าง $10-50^{\circ}\text{C}$ ($45-145^{\circ}\text{F}$) ให้ถือว่าอาหารนั้นไม่ปลอดภัยสำหรับการบริโภค อาหารที่มี Staphylococcal enterotoxin แม้ผ่านความร้อนซ้ำก็มักจะไม่สามารถทำลายสารพิษได้หมด เนื่องจาก SE เป็นสารพิษที่ทนความร้อนได้สูง เช่น D_{120} ในน้ำนม มีค่าประมาณ 20 นาที ในขณะที่ค่า z ประมาณ 29°C การระบาดของ *Staphylococcus aureus* พบได้บ่อยในฤดูร้อน เพราะว่า อุณหภูมิและความร้อนในฤดูร้อนจะช่วยเร่งการเพิ่มจำนวนของ *Staphylococcus aureus* ในอาหาร

1.2. การอธิบายอันตราย

(Hazard characterization)

การอธิบายอันตรายเป็นขั้นตอนหนึ่งของการประเมินความเสี่ยง ซึ่งชื่อเดิมของการอธิบายอันตราย คือ การประเมินการตอบสนองต่อปริมาณจุลินทรีย์ก่อโรค หรือ Dose response assessment ปัจจุบันนี้ได้มีการปรับเปลี่ยนให้เป็นชื่อเดียวกันกับที่ใช้โดยองค์การระหว่างประเทศ เช่น WHO, FAO, และ Codex Alimentarius Commission (CAC) เป็นต้น

การตอบสนองของประชากรมนุษย์เมื่อได้รับจุลินทรีย์เข้าในร่างกายนั้น เป็นกระบวนการที่ซับซ้อน อย่างยิ่ง เนื่องจากประกอบด้วยปัจจัยมากมายที่เข้ามาเกี่ยวข้อง แต่อาจจะสามารถแจกแจงได้เป็น 3 องค์ประกอบหลักที่สำคัญ คือ

1. องค์ประกอบทางร่างกาย (Host factor)
2. องค์ประกอบทางจุลินทรีย์ก่อโรค (Microbiological factor)
3. องค์ประกอบสื่อบริโภคน (Food matrix factor)

ในการศึกษาถึงผลการตอบสนอง (Response) ต่อจุลินทรีย์ก่อโรค จำเป็นต้องพิจารณาร่วมกันทั้ง 3 องค์ประกอบไปพร้อม ๆ กัน ต่อจากนั้นเพื่อที่จะพัฒนาให้เป็นการประเมินความเสี่ยงเชิงปริมาณ (Quantitative microbial risk assessment : QMRA) จำเป็นจะต้องมีการประเมินออกมาเป็นตัวเลขที่ชัดเจน จึงได้มีการนำเอาปริมาณจุลินทรีย์ก่อโรค (Dose) ที่ก่อเกิดความเจ็บป่วย (Response) ในระดับต่าง ๆ มาหาความสัมพันธ์กันเป็นจำนวนที่มากพอ ก็สามารถจะเชื่อมต่อเป็นเส้นโค้ง (Curve) และสร้างเป็นแบบจำลองการตอบสนองต่อเชื้อ (Dose response model) ขึ้นจากข้อมูลที่ได้จากการระบาดทั่วที่มีทั้งหมด

1.2.1 องค์ประกอบทางร่างกาย

(Host factor)

จากผลการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการสรุปปัจจัยเด่นหลากหลายข้อ อันเป็นสิ่งชี้วัดการตอบสนองต่อการติดเชื้อ อย่างไรก็ตาม โดยธรรมชาติของการศึกษาเหล่านี้ มีอาจจะพิจารณาครอบคลุมทุกปัจจัยได้ครบถ้วนและอาจจะ ทำให้เกิดอคติ (bias) ในการสรุปปัจจัยสำคัญต่าง ๆ

ในที่นี้ จะขอรวบรวมเอาปัจจัยเท่าที่ได้มีการกล่าวถึงในวารสารวิทยาศาสตร์ ซึ่งจะครอบคลุมทั้งที่สำคัญและที่เชื่อว่ามีผลเกี่ยวข้องเข้าไว้ด้วยกันเป็นกลุ่ม ๆ โดยที่คณะผู้วิจัยจะขอแจกแจงรายละเอียดเฉพาะหัวข้อที่สำคัญที่มีผลโดยตรงต่อการประเมินความเสี่ยงในการศึกษาครั้งนี้ ปัจจัยที่สำคัญของร่างกายในการทำให้เกิดอาการท้องร่วงแบบเฉียบพลันจากการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรค มี 3 กลุ่มใหญ่ ประกอบด้วย

1. ประชากรและเศรษฐกิจสังคม (Demographic and socioeconomic factors) ได้แก่ อายุ เพศ ชนชาติ เชื้อชาติ ภาวะโภชนาการ สังคม เศรษฐกิจ สิ่งแวดล้อม การเดินทางภายในและระหว่างประเทศ กลุ่มอายุที่มีพฤติกรรมการติดเชื้อโดยทั่วไปมี 2 กลุ่ม คือ เด็กและคนชรา
2. พันธุกรรม (Genetic factors) ยีนที่มีความสัมพันธ์และเกี่ยวข้องกับโรค

3. สุขภาพ (Health factors) ประกอบด้วย สภาวะภูมิคุ้มกัน การติดเชื้อร่วม โรคหรือความเจ็บป่วย ที่เป็นอยู่ ยาที่ใช้ การตั้งท้อง เป็นต้น

นอกจาก 3 ปัจจัยที่กล่าวมาแล้วนั้น ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเป็นตัวจักรสำคัญในการกำหนดการตอบสนองของร่างกายต่อจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งผลลัพธ์ของการตอบสนองอาจจะเป็นเพียงมีการติดเชื้อ (infection) หรือ รุนแรงขึ้นจนแสดงอาการหรือความเจ็บป่วย (clinical illness)

1.2.2 องค์ประกอบทางจุลินทรีย์ก่อโรค

(Microorganism factor)

ผลกระทบต่อสุขภาพพื้นฐานของการได้รับจุลินทรีย์ก่อโรคที่มีอาหารเป็นสื่อ คือ อาการของอาหารเป็นพิษ เรียกว่า gastroenteritis ซึ่งลักษณะบางอย่างในเชิงโครงสร้าง (Structure) และรหัสพันธุกรรม (DNA) ที่ทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคสามารถก่อโรคได้ อาจจะเป็นเรียกว่าเป็น องค์ประกอบก่อโรครุนแรง (Virulence factors) เช่น ความสามารถในการเกาะกับผนังเยื่อลำไส้ (Adherence) ความสามารถในการรุกรานผนังเยื่อลำไส้ (Invasion) สารพิษที่ผนังเซลล์แบคทีเรีย lipopolysaccharide (LPS) หรือ Exotoxin ทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคสามารถดำรงชีวิตได้ในสิ่งแวดล้อมและรอดชีวิตผ่าน (survive) ระบบภูมิคุ้มกันทางกายภาพและทางเคมีในตัวของผู้ป่วยได้ด้วย

โดยปกติแล้วร่างกายของประชากรกลุ่มเสี่ยง (Susceptible population) จะมีระบบภูมิคุ้มกัน (immune system) โครงสร้างทางกายวิภาค (anatomical) และสรีระ (physiological) หลายอย่าง ที่ป้องกันการรุกรานของจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดต่าง ๆ

เมื่อจุลินทรีย์ก่อโรคเข้าสู่ร่างกายต้องพบการเปลี่ยนแปลงหลายอย่างเช่น อุณหภูมิ ความเข้มข้นของสาร (osmolarity) ระดับออกซิเจน (oxidation reduction potential) ระดับธาตุเหล็ก ความเป็นกรดต่าง (pH) สารอาหารอินทรีย์และอนินทรีย์ เป็นต้น นอกจากนี้ จุลินทรีย์ก่อโรคเมื่ออยู่ในทางเดินอาหารต้องพบกับการบีบตัวของทางเดินอาหาร (peristalsis) การโบกพัดของเส้นใยที่ผิวของเซลล์เยื่อบุผิว (epithelial surface) ภายในทางเดินอาหาร และระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาว เป็นต้น

จุลินทรีย์ก่อโรคมีความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับร่างกายได้อย่างดี โดยอาศัยการวิวัฒนาการ (evolution) และการคัดเลือกจากธรรมชาติ (natural selection) สร้างลักษณะปรับตัว (adaptive characteristics) เพื่อให้สามารถดำรงชีวิตและเพิ่มจำนวนได้ในร่างกาย แรกเริ่มเมื่อจุลินทรีย์ก่อโรคผ่านเข้าสู่ทางเดินอาหาร ต้องทนกับระดับความเป็นกรดที่ค่อนข้างรุนแรงในกระเพาะ เมื่อผ่านสู่ลำไส้ที่มีการบีบตัวและระบบภูมิคุ้มกัน ในลำไส้ คือ Payer's patches ต้องจะสามารถเกาะกับเยื่อผนังลำไส้ ลักษณะโดยรวมที่สามารถทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคยึดติด (adhesion) และผ่านเข้าสู่เซลล์เยื่อผนังลำไส้เพื่อเพิ่มจำนวน (colonization) รวมเรียกว่า bacterial virulence factors เช่น specific fimbria, chromosome-coded bacterial surface adhesins, haemagglutinin เป็นต้น

จุลินทรีย์ก่อโรคยังมีลักษณะอื่นที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพ (pathology) ในร่างกายได้ คือ สารพิษภายใน (endotoxin) หรือ Lipopolysaccharide (LPS) และสารพิษภายนอก (exotoxin) เช่น cytotoxin และ enterotoxin ทำให้ร่างกายสูญเสียอาหารและทำลายได้ ไส้เดอโรฟอร์ (siderophores)

ที่จุลินทรีย์ก่อโรคใช้ดึงดูดเซลล์จากร่างกายเพื่อนำไปใช้ในการเจริญเติบโต พันธุกรรมก่อโรค (virulence plasmid) ช่วยให้จุลินทรีย์ ก่อโรครุกเข้าสู่ระบบภายในร่างกายและเพิ่มจำนวนตัวเองในร่างกายของร่างกาย

1.2.3 องค์ประกอบสื่อบริโภค

(Food matrix factor)

ปัจจัยเรื่องอาหารเป็นปัจจัยที่มีความสัมพันธ์โดยตรงกับร่างกายและจุลินทรีย์ก่อโรค จุลินทรีย์ก่อโรคจะต้องผ่านระบบป้องกันตัวของร่างกายด่านแรก คือ ความเป็นกรดที่สูงในกระเพาะอาหาร ซึ่งอาจจะต่ำถึงระดับ pH 2 ดังนั้น ภาวะร่างกายของกลุ่มที่เสี่ยงต่อจุลินทรีย์ก่อโรคจะเพิ่มขึ้นเมื่อระดับความเป็นกรดในกระเพาะอาหารลดลง เช่น ยาลดกรดในกระเพาะอาหาร โรคมะเร็ง ภาวะเบาหวาน และอายุมากขึ้น นอกจากนี้ ปัจจัยที่ตัวอาหาร ได้แก่ ปริมาณอาหารที่บริโภค ระดับไขมัน ระบบป้องกันการเปลี่ยน pH (buffering capacity) ธรรมชาติของการมีเชื้อในอาหารมีอยู่นั้น ๆ

ปริมาณอาหารที่บริโภคอาจจะเป็นเพียงตัวกำหนดโอกาสการได้รับจุลินทรีย์ก่อโรคแบบหายาบ ๆ เท่านั้น เนื่องจากจุลินทรีย์ก่อโรคมิได้กระจายเท่ากันตลอดทั่วอาหาร (non-homogeneous) ดังนั้น อาจจะพอตั้งข้อสังเกตได้ว่าปริมาณอาหารที่บริโภคจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับโอกาสการติดเชื้อ นอกจากนี้ แบคทีเรียมีแนวโน้มว่าจะรวมกลุ่มกันเป็นก้อน (bacterial agglomeration) ทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคชั้นในได้รับการปกป้องจากกรด ในกระเพาะอาหารได้ สิ่งแวดล้อมขนาดเล็ก (microenvironment) ที่จุลินทรีย์ก่อโรคเกาะอยู่กับอาหารเป็นตัวกำหนดความอยู่รอดของจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น อาหารที่มีส่วนประกอบของไขมัน บริเวณที่เป็นไขมันจะเอื้อต่อการอยู่รอดของจุลินทรีย์ก่อโรคผ่านความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร ได้ดีกว่า อย่างไรก็ตาม บางการศึกษาได้ข้อสรุปที่ค้านกับผลการศึกษาค้างนี้ เช่น ในอาหารนมและไข่ขาว เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ช่วยลดโอกาสการได้รับจุลินทรีย์ก่อโรคในทางกลับกันแอลกอฮอล์อาจจะช่วยกระตุ้นการหลั่งกรดในกระเพาะได้ด้วย

1.2.4 แบบจำลองการตอบสนองต่อปริมาณ *S.aureus*

(Dose-response model *S.aureus*)

โดยทั่วไปแล้ว การอธิบายอันตรายจะอาศัยแบบจำลอง dose-response ซึ่งเป็นสมการในการคำนวณโดยคำนวณหาโอกาสในการเจ็บป่วยจากปริมาณจุลินทรีย์ก่อโรคที่ได้รับ อย่างไรก็ตาม ยังไม่มี dose-response model จำเพาะต่อ *Staphylococcus aureus*

การเจ็บป่วยที่เกิดขึ้นเป็นผลที่เกิดจากการได้รับ Enterotoxin เรียกว่า การเกิดโรคจากสารพิษ (Intoxication) ซึ่งปริมาณสารพิษที่ได้รับจะมีความสัมพันธ์กับโอกาสในการเจ็บป่วย กล่าวคือ การเจ็บป่วยจะเกิดขึ้นเมื่อร่างกายได้รับสารพิษในปริมาณขั้นต่ำ (threshold level) ซึ่งมีรายงานระดับขั้นต่ำของสารพิษจาก *Staphylococcus aureus* ชนิด A (Staphylococcal enterotoxin A : SEA) ประมาณ 20 ng/serving (Kim et al., 2009) 94 ng/serving (Heidinger et al., 2009) หรือ 100 ng/serving (Soejima et al., 2006)

การศึกษาล่าสุดมีการนำเสนอ dose-response model สำหรับการเจ็บป่วยจากการได้รับ *Staphylococcus aureus* จากเนยแข็ง เป็นแบบจำลองชนิด Exponential (Lee et al., 2015)

2.1 แบบจำลองที่ใช้ในการอธิบายอันตราย (Model for hazard characterization)

แบบจำลองที่ใช้ในการอธิบายอันตรายจากการบริโภคเนื้อสุกร คือ แบบจำลอง exponential ที่ได้จากการประเมินความเสี่ยงเชิงปริมาณของ *Staphylococcus aureus* ที่ปนเปื้อนในเนยแข็ง (Lee et al., 2015)

$$P_I = 1 - e^{-rN} \quad (1.1)$$

โดยที่

P_I หมายถึง ความน่าจะเป็นในการเจ็บป่วยจาก *Staphylococcus aureus* จำนวน N เซลล์

r หมายถึง พารามิเตอร์ในการกำหนดรูปร่างแบบจำลอง exponential = 7.64×10^{-12}

N หมายถึง จำนวน *Staphylococcus aureus* ที่ได้รับเข้าสู่ร่างกาย (cfu/day)

แม้ว่าค่า r ตามเอกสารอ้างอิงจะเป็น 7.64×10^{-8} แต่เมื่อได้ทดสอบแบบจำลองนี้แล้ว ด้วยค่า $r = 7.64 \times 10^{-8}$ พบว่า อัตราการเจ็บป่วย/แสนคน/ปี อยู่ในระดับแสนคน และเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานการเจ็บป่วยของโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) โดยกรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2556 พบว่า *S.aureus* เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ ร้อยละ 14.55 โดยอัตราการเจ็บป่วยด้วยโรคอาหารเป็นพิษทุกสาเหตุรวมกัน ประมาณ 204.07 คน/แสนคน/ปี ดังนั้น เมื่อคำนวณตามสัดส่วนแล้ว อัตราการเจ็บป่วยจาก *S.aureus* = 29.69 คน/แสนคน/ปี ($204.07 \times 14.55\%$) เท่านั้น (AESR, 2013) ดังนั้น จึงมีการปรับค่า r ให้ลดลง 10,000 เท่า เพื่อให้สอดคล้องกับความเป็นจริงของการรายงานโดยกรมควบคุมโรค ดังนั้น ในการศึกษาค้างนี้จะใช้ $r = 7.64 \times 10^{-12}$ ในการคำนวณความน่าจะเป็นในการเจ็บป่วยจาก *Staphylococcus aureus*

แม้ว่าการอธิบายอันตรายในกรณีของ intoxication จากสารพิษที่ SA สร้างสะสมไว้ในอาหารจะต้องมีปริมาณความเข้มข้นขั้นต่ำ (threshold) ซึ่งสอดคล้องกับมาตรฐานของสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช) ที่กำหนดมาตรฐานการปนเปื้อนของ SA ไม่เกิน 100 cfu/g (2 log cfu/g)

อย่างไรก็ตาม ในกรณีที่ระดับการปนเปื้อนมีปริมาณสูงกว่าระดับความเข้มข้นขั้นต่ำ (threshold) ดังนั้น แบบจำลอง dose response ที่ใช้ในที่นี้จึงปราศจากผลกระทบในการประเมินความเสี่ยงในกรณีที่ระดับการปนเปื้อนเนื้อสุกรต่ำกว่าระดับความเข้มข้นขั้นต่ำ (threshold)

1.3 การประเมินการสัมผัส (Exposure assessment)

การประเมินการสัมผัส (Exposure assessment) เป็นการประเมินโอกาสในการรับสัมผัส (exposure) กับอันตราย ซึ่งในที่นี้ ก็คือ การได้รับจุลินทรีย์ก่อโรคที่อาจจะปนเปื้อนมากับอาหารที่บริโภคเข้าสู่ร่างกาย ดังนั้น ข้อมูลสำคัญในการประเมินการสัมผัส ก็คือ

1. ข้อมูลการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารและน้ำ (Prevalence & Concentration)

- ความชุก (Prevalence) การแจกแจงความน่าจะเป็นของความชุกจะใช้ Beta distribution เป็นการอาศัยหลักการกระบวนการทวินาม (Binomial process) กล่าวคือ ความชุกหรือการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในตัวอย่างที่สนใจนั้นมีความเป็นไปได้เพียง 2 กรณีเท่านั้น คือ มีการปนเปื้อนและไม่มีการปนเปื้อน ดังนั้น จึงได้นำเอาหลักการนี้มาวิเคราะห์หาระดับความชุกหรือการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในตัวอย่างหรือตัวแปรสุ่มที่สนใจ

- ความเข้มข้น (Concentration) การเลือกแบบการแจกแจงความน่าจะเป็นสำหรับความเข้มข้น (Poisson Distribution) ระดับความเข้มข้นของจุลินทรีย์ในตัวอย่างนั้น จะสอดคล้องกับแบบการแจกแจงแบบ Poisson ซึ่งมีการกำหนดค่าพารามิเตอร์ λ (อ่านว่า แลมดา) เพื่อสร้างการแจกแจงความน่าจะเป็น ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ ก็คือ ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นของจุลินทรีย์ก่อโรคในตัวอย่างที่ศึกษา

- การตรวจวิเคราะห์ *Staphylococcus aureus* ทางห้องปฏิบัติการใช้วิธีการที่แนะนำโดย USDA จาก Bacteriological analytical manual (BAM)

2. ปริมาณการบริโภคเนื้อสุกร (pork consumption)

ปริมาณการบริโภค จะสืบค้นจาก ฐานข้อมูลปริมาณอาหารที่คนไทยบริโภค (Database of Food Consumption of Thai People) โดย สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช) ในรูปของเอกสาร และแบบ search online (<http://consumption.acfs.go.th/index.php>) โดยเลือกปริมาณการบริโภค เฉพาะกลุ่ม Eater only ที่ลำดับร้อยละ 97.5 (percentile) โดยมีค่าเฉลี่ยของกลุ่มอายุมากกว่า 3 ปี ดังตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 ปริมาณการบริโภคของคนไทยสำหรับกลุ่ม Eater only ที่ลำดับร้อยละ 97.5 (percentile) รายงานเป็นค่าเฉลี่ยของกลุ่มอายุมากกว่า 3 ปี

อาหาร	กรัม/คน/วัน
เนื้อสุกร	90
เนื้อโคและควาย	60
เนื้อไก่	45

อย่างไรก็ตาม เนื่องจากข้อมูลการบริโภคที่ได้รับเป็นค่าลำดับร้อยละ 97.5 (percentile) ซึ่งเป็นลักษณะข้อมูลที่มีความสอดคล้องกับการประเมินความเสี่ยงเชิงปริมาณและความน่าจะเป็น กล่าวคือ ข้อมูลดังกล่าวสามารถนำมาสร้างการแจกแจงความน่าจะเป็น (probability distribution) ได้ โดย

กำหนดให้เป็นการแจกแจงชนิดปกติ (normal distribution) ซึ่งสามารถกำหนดใน spreadsheet สำหรับการคำนวณคณิตศาสตร์ ร่วมกับการใช้โปรแกรมการจำลองเหตุการณ์ทำให้สามารถกำหนดปริมาณการบริโภคเชิงปริมาณและความน่าจะเป็นได้ เป็น =NormalAlt(97.5%, 90, "sigma", 1, Truncate(0,)) หมายความว่า ปริมาณการบริโภคมีการแจกแจงความน่าจะเป็นชนิดปกติ โดยมีค่าค่าลำดับร้อยละ 97.5 (percentile) สำหรับผลิตภัณฑ์สุกร 90 กรัม/คน/วัน โดยมีสมมุติฐานว่า ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation หรือ sigma) มีค่าเท่ากับ 1 และกำหนดให้ค่าต่ำสุด (Truncate) ที่เป็นไปได้ในการบริโภค คือ 0 กรัม (หากไม่กำหนดค่าต่ำสุดแล้ว การสุ่มค่าของปริมาณการบริโภคในการจำลองเหตุการณ์ก็อาจจะมีการสุ่มค่าที่เป็นลบได้ ซึ่งเป็นค่าที่ไม่สามารถเกิดขึ้นได้จริง) ซึ่งจะทำให้ค่าเฉลี่ย (expected value) มีค่าลดลงจาก 90 กรัม/คน/วัน เป็น 88 กรัม/คน/วัน

1.3.1 แบบจำลองที่ใช้ในการประเมินการสัมผัส

(model for exposure assessment)

ความน่าจะเป็นในการสัมผัส (P_E) เป็นการอธิบายโอกาสหรือความเป็นไปได้ที่ร่างกายจะได้รับสัมผัสสารพิษขั้นต่ำที่ก่อให้เกิดโรคได้ ซึ่ง P_E เป็นค่าที่เป็นตัวแทนอธิบายโอกาสการเกิดเหตุการณ์การรับสัมผัสกับจุลินทรีย์ก่อโรคเข้าสู่ร่างกายจากการบริโภคอาหารและน้ำ โดยใช้แบบจำลอง

$$P_E = P(1 - e^{-N}) \quad (1.1)$$

โดยที่

P_E หมายถึง ความน่าจะเป็นในการสัมผัส *Staphylococcus aureus* อย่างน้อย 1 หน่วยก่อโรค

P หมายถึง ความชุกของ *Staphylococcus aureus* ในเนื้อสุกร (%)

N หมายถึง จำนวน *Staphylococcus aureus* ที่ได้รับเข้าสู่ร่างกาย (cfu/day)

โดยที่

$$N = \text{Concentration} \times \text{Consumption} \quad (1.2)$$

โดยที่

Concentration คือ ปริมาณ *Staphylococcus aureus* ในเนื้อสุกร (cfu/g)

Consumption คือ ปริมาณการบริโภคเนื้อสุกรต่อวัน (g/day)

1.3.2 การเก็บตัวอย่าง

(Pork sampling)

พื้นที่กรุงเทพมหานครมีแบ่งส่วนราชการกรุงเทพมหานครเป็น 6 กลุ่มเขตพื้นที่ (ภาพที่ 1.2) ดังนี้

1. กลุ่มเขตพื้นที่ กรุงเทพมหานครกลาง (Central Bangkok : C) ประกอบด้วย
เขตพระนคร เขตสัมพันธวงศ์ เขตห้วยขวาง เขตดินแดง
2. กลุ่มเขตพื้นที่ กรุงเทพมหานครออก (East Bangkok : E) ประกอบด้วย
เขตบางกะปิ เขตสะพานสูง เขตบึงกุ่ม เขตคันนายาว เขตลาดกระบัง

เขตมีนบุรี เขตหนองจอก เขตคลองสามวา

3. กลุ่มเขตพื้นที่ กรุงเทพมหานครเหนือ (North Bangkok : N) ประกอบด้วย
เขตจตุจักร เขตบางซื่อ เขตลาดพร้าว เขตหลักสี่
เขตดอนเมือง เขตสายไหม เขตบางเขน
4. กลุ่มเขตพื้นที่ กรุงเทพมหานครใต้ (South Bangkok : S) ประกอบด้วย
เขตปทุมวัน เขตบางรัก เขตสาทร เขตบางคอแหลม
เขตยานนาวา เขตคลองเตย เขตวัฒนา เขตพระโขนง
เขตสวนหลวง เขตบางนา เขตประเวศ
5. กลุ่มเขตพื้นที่ ธนบุรีเหนือ (Upper thonburi : U) ประกอบด้วย
เขตธนบุรี เขตคลองสาน เขตจอมทอง เขตบางกอกใหญ่
เขตบางกอกน้อย เขตบางพลัด เขตตลิ่งชัน เขตทวีวัฒนา
6. กลุ่มเขตพื้นที่ ธนบุรีใต้ (Lower thonburi : L) ประกอบด้วย
เขตภาษีเจริญ เขตบางแค เขตหนองแขม เขตบางขุนเทียน
เขตบางบอน เขตราษฎร์บูรณะ เขตทุ่งครุ



ภาพที่ 1.2 แผนผังการแบ่งพื้นที่ในการเก็บตัวอย่างในส่วนราชการกรุงเทพมหานคร

วัตถุประสงค์ของช่วงการเก็บตัวอย่างที่ 1 คือ เพื่อให้ได้ค่าประมาณความเสี่ยงระดับพื้นฐาน (background risk level) และ เพื่อการแยก *S.aureus* และ Spoilage bacteria ในการศึกษาในขั้นตอนการพัฒนา rapid test โดยจำนวนตัวอย่างที่เก็บและตรวจวิเคราะห์ตามความหนาแน่นของประชากร (population base) และเขตพื้นที่ (geographical base) รวมทั้งสิ้น 322 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1.2)

ตารางที่ 1.2 จำนวนตัวอย่างที่เก็บได้แบ่งตามความหนาแน่นประชากรและตามเขตพื้นที่

กลุ่มเขตพื้นที่	จำนวนชุมชน	สัดส่วนชุมชน	จำนวนตัวอย่าง	ตลาดที่			
				1	2	3	4
1. กรุงเทพมหานคร (C)	220	11%	48	28	20		
2. กรุงเทพมหานคร (E)	459	23%	70	12	10	48	
3. กรุงเทพมหานคร (N)	420	21%	48	8	4	36	
4. กรุงเทพมหานคร (S)	297	15%	57	41	16		
5. กรุงเทพมหานคร (U)	321	16%	54	6	18	30	
6. กรุงเทพมหานคร (L)	290	14%	48	22	10	8	8
รวม	2007	100%	325				

การเก็บตัวอย่างเนื้อสุกร

เก็บเนื้อสุกรประมาณ 500 กรัม/ตัวอย่าง โดยเก็บเฉพาะเนื้อแดงล้วน ไม่ติดหนัง ไม่ติดมัน ไม่ติดพังผืด ใส่เนื้อสุกรในถุงพลาสติกหรือถุงซิปล็อค “ใหม่” และ “ปลอดเชื้อ” เท่านั้น แล้วผูกปิดปากถุงให้แน่นหนา บรรจุใส่ถุงพลาสติกชั้นที่ 2 แล้วผูกปิดปากถุงให้แน่นหนา เพื่อป้องกันการไหลรั่วซึมของตัวอย่างจากถุงชั้นที่ 1 ด้านใน

เก็บรักษาตัวอย่างเนื้อสุกรโดยการแช่เย็นระหว่าง 2-8 องศาเซลเซียส (เช่น น้ำแข็งผสมเกลือ) บรรจุในกล่องโฟมหรือกระติกที่มีน้ำแข็ง เพื่อป้องกันการไหลรั่วซึมของของเหลวในกรณีที่เกิดภาชนะแตก นำส่งตัวอย่างให้ถึงห้องปฏิบัติการภายใน 24 ชั่วโมงเพื่อการวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ต่อไป

1.3.3 การตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ทางห้องปฏิบัติการ

(Microbiological analysis)

1. จุลินทรีย์ก่อโรค

○ *Staphylococcus aureus* : Bacteriological analytical manual (BAM) โดย

องค์การอาหารและยา สหรัฐอเมริกา (US. FDA.) วิธีวิเคราะห์โดยย่อ ดังนี้

- ชั่งตัวอย่างเนื้อสุกรน้ำหนัก 25 กรัม เจือจางจนถึง dilution ที่ 10^{-8} เนื่องจากเนื้อสุกรมีระดับการปนเปื้อนค่อนข้างมาก

- ดึงสารละลายตัวอย่าง 0.1 มล. จากแต่ละ dilution เพื่อนำมา spread ลงบน Baird-Parker egg yolk medium + tellulite บ่มเพาะนาน 45-48 ชั่วโมง ที่ 35°C
- เลือกนับโคโลนีของ *Staphylococcus aureus* ที่เป็นแบบฉบับ คือ มีลักษณะกลม ผิวเรียบ โค้งนูน (convex) ชุ่มน้ำ (moist) ขนาดประมาณเส้นผ่านจุดศูนย์กลางระหว่าง 2-3 มม. สีเทาถึงดำเข้ม gray to jet-black ขอบสีอ่อนจาง ล้อมรอบด้วย opaque zone และขอบนอกเป็น clear zone จาก plate ที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 20-200 โคโลนี เพื่อเลี่ยงการทับซ้อนกันของโคโลนี

O การทำ Coagulase test

- เลือกโคโลนีที่เป็นแบบฉบับของ *S. aureus* นำมาผสมกับ 0.2-0.3 มล. ของ BHI broth เป็นสารละลาย บ่มเพาะนาน 18-24 ชั่วโมง ที่ 35°C
- Inoculate สารละลายใน Tryptic Soy agar (TSA) บ่มเพาะนาน 18-24 ชั่วโมง ที่ 35°C ใช้สำหรับการทดสอบ Catalase test ต่อไป
- เติม 0.5 มล. ของ coagulase plasma ลงในสารละลาย BHI บ่มเพาะที่ 35°C สังเกตการแข็งตัว (clot) ของ plasma เป็นระยะๆ นาน 4-6 ชั่วโมง
- เฉพาะ isolate ที่แข็งตัวภายใน 4 ชั่วโมงแรก จัดว่าเป็น SA

O การทำ Catalase test (slide method)

- ใช้ loop แตะเอา colony ที่เพาะได้จาก plate ป้ายลงบน slide แก้ว ระวังไม่ให้ติดอาหารเลี้ยงเชื้อมาด้วย
- ใช้ Pasteur pipette หยด 3% H₂O₂ ลงบนเชื้อ (โดยไม่ต้องผสมกัน)
- สังเกตการเกิดฟอง (ออกซิเจน) ถือว่าให้ผลบวก (positive)
- SA จะให้ผลบวกต่อ Catalase test

1.3.4 ผลการประเมินการสัมผัส *S.aureus* ในตัวอย่างเนื้อสุกร

(Result of exposure assessment of *S.aureus* in pork)

การรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ (concentration) ของการปนเปื้อน *S.aureus* ในผลิตภัณฑ์สุกรทางห้องปฏิบัติการ เป็นการรายงานค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของตัวอย่างผลิตภัณฑ์สุกรทั้งหมด จำแนกรายตลาดสดและกลุ่มเขตพื้นที่ของกรุงเทพมหานคร โดยจะใช้ค่าเฉลี่ยเรขาคณิต (geometric mean) เนื่องจาก

- ก. ค่าความเข้มข้นของจุลินทรีย์ที่วิเคราะห์เชิงปริมาณโดยวิธี standard plate count (SPC) จะมีการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นในลักษณะเป็นเลขยกกำลัง (exponential)
- ข. หากมีระดับการปนเปื้อนบางตัวอย่างที่แตกต่างจากตัวอย่างอื่นในกลุ่ม เช่น ระดับการปนเปื้อนสูงกว่า หรือ ต่ำกว่าตัวอย่างอื่นในกลุ่ม การคำนวณเป็นค่าเฉลี่ยเลขคณิต (arithmetic mean) จะทำให้ได้ค่าเฉลี่ยที่กระโดดหรือดึงออกจากกลุ่มไปมาก
- ค. ดังนั้น ค่าเฉลี่ยเลขคณิต (arithmetic mean) จึงไม่เหมาะสมและไม่เป็นตัวแทนที่ดีของกลุ่มตัวอย่างที่วิเคราะห์

ผลการปนเปื้อนของ *S.aureus* ในเนื้อสุกรแจกแจงตามกลุ่มเขตพื้นที่และตลาดสด ดังแสดงในตารางที่ 1.3

ตารางที่ 1.3 การปนเปื้อน *S.aureus* ในผลิตภัณฑ์สุกรจากตลาดสดจำแนกตามกลุ่มเขตพื้นที่

กลุ่มเขต พื้นที่	ความชุก (ร้อยละ)				ค่าเฉลี่ยความเข้มข้น (log cfu/g)			
	ตลาด 1	ตลาด 2	ตลาด 3	ตลาด 4	ตลาด 1	ตลาด 2	ตลาด 3	ตลาด 4
กรุงเทพกลาง	27	59	-	-	3.80	4.00	-	-
กรุงเทพออก	21	33	30	-	5.39	3.00	3.70	-
กรุงเทพเหนือ	40	67	47	-	3.67	3.38	3.67	-
กรุงเทพใต้	43	68	-	-	3.42	4.73	-	-
ธนบุรีเหนือ	38	15	19	-	4.41	4.15	3.42	-
ธนบุรีใต้	58	8	30	50	3.50	0	4.19	3.61

หมายเหตุ มาตรฐานการปนเปื้อน *S.aureus* ในเนื้อสุกร ไม่เกิน 100 cfu/g หรือ 2 log cfu/g¹

¹ มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ มกอช. 6000-2547 (Thai agricultural commodity and food standard : TACFS 6000-2004) เรื่อง เนื้อสุกร ประกาศในราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศทั่วไป เล่มที่ 121 ตอนพิเศษ 120 ง วันที่ 22 ตุลาคม พ.ศ.2547

ความน่าจะเป็นในการสัมผัส (probability of exposure) สำหรับ *S.aureus* อย่างน้อย 1 เซลล์ ในผลิตภัณฑ์สุกร และความน่าจะเป็นในการเจ็บป่วยจากการได้รับ *S.aureus* จากการบริโภคผลิตภัณฑ์สุกร จากตลาดสดแจกแจงตามกลุ่มเขตพื้นที่และตลาดสด ดังแสดงในตารางที่ 1.4 ตามลำดับ

ตารางที่ 1.4 ความน่าจะเป็นในการสัมผัส (probability of exposure) *S.aureus* ในผลิตภัณฑ์สุกร และความน่าจะเป็นในการเจ็บป่วยจากการได้รับ *S.aureus* จากการบริโภคผลิตภัณฑ์สุกร

กลุ่มเขต พื้นที่	ความน่าจะเป็นในการสัมผัส (P_E)				ความน่าจะเป็นในการเจ็บป่วย (P_I)			
	ตลาด 1	ตลาด 2	ตลาด 3	ตลาด 4	ตลาด 1	ตลาด 2	ตลาด 3	ตลาด 4
กรุงเทพมหานคร	0.27	0.59	-	-	4.3×10^{-6}	6.8×10^{-6}	-	-
กรุงเทพมหานคร	0.21	0.33	0.30	-	1.7×10^{-4}	6.9×10^{-7}	3.5×10^{-6}	-
กรุงเทพมหานคร	0.40	0.67	0.47	-	3.2×10^{-6}	1.6×10^{-6}	3.2×10^{-6}	-
กรุงเทพมหานคร	0.43	0.68	-	-	1.8×10^{-6}	3.7×10^{-5}	-	-
ชลบุรีเหนือ	0.38	0.15	0.19	-	1.7×10^{-5}	9.7×10^{-6}	1.8×10^{-6}	-
ชลบุรีใต้	0.58	0.8	0.30	0.50	2.2×10^{-6}	$< 1 \times 10^{-6}$	1.1×10^{-5}	2.8×10^{-6}

1.4 การอธิบายความเสี่ยง

(Risk characterization)

การอธิบายความเสี่ยง (Risk characterization) เป็นการประเมินโอกาสในการเจ็บป่วยจากการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ก่อโรค ดังนั้น ขั้นตอนนี้จึงเป็นการบูรณาการเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นในขั้นตอนที่ 3 ตามด้วย ขั้นตอนที่ 2 กล่าวคือ เป็นการพิจารณาความน่าจะเป็นต่อเนื่องของ 2 เหตุการณ์หลัก คือ ¹ เหตุการณ์ในการสัมผัสกับจุลินทรีย์ก่อโรคปริมาณหนึ่ง (dose) ตามมาด้วย ² เหตุการณ์การเกิดโรค (response) อันเกิดจากปริมาณจุลินทรีย์ที่ได้รับ ดังนั้น แบบจำลองที่ใช้ในการประเมินความเสี่ยง รวมทั้ง 2 เหตุการณ์ต่อเนื่องกัน คือ

$$P_S = P_E \times P_I \quad (1.3)$$

โดยที่

P_S คือ ค่าประมาณความเสี่ยงจากการสัมผัสกับเชื้อสุกร/วัน

P_E คือ ความน่าจะเป็นในการสัมผัส *Staphylococcus aureus* อย่างน้อย 1 หน่วยก่อโรค

P_I คือ ความน่าจะเป็นในการเจ็บป่วยจาก *Staphylococcus aureus* จำนวน N หน่วยก่อโรค

ค่าประมาณความเสี่ยงที่ได้จาก สมการ (1.4) เป็นค่าประมาณความเสี่ยงจากการสัมผัส *Staphylococcus aureus* ต่อวัน (single exposure) เพื่อเป็นประโยชน์ในการเปรียบเทียบกับอัตราการเจ็บป่วยตามรายงานของกรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข จึงจะคำนวณเป็นอัตราการเจ็บป่วย/แสนคน/ปี โดยการวิเคราะห์เป็น multiple exposure รายปี (365 ครั้ง) แล้วคูณด้วยจำนวนประชากร 100,000 คน

$$P_M = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - P_S) \quad (1.4)$$

โดยที่

P_M คือ ค่าประมาณความเสี่ยงจากการสัมผัสกับเชื้อสุกร/ปี (365 วัน)

P_S คือ ค่าประมาณความเสี่ยงจากการสัมผัสกับเชื้อสุกร/วัน

$$Risk\ rate = P_M \times 100,000 \quad (1.5)$$

โดยที่

Risk rate หมายถึง อัตราการเจ็บป่วย/แสนคน/ปี

P_M คือ ค่าประมาณความเสี่ยงจากการสัมผัสกับเชื้อสุกร/ปี (365 วัน)

จากนั้น จึงนำข้อมูลทั้งหมดมาจำลองเหตุการณ์จริง (Monte Carlo Simulation) ซ้ำๆ อย่างต่ำ 10,000 รอบ (iteration) โดยอาศัยโปรแกรม @Risk 4.5.3 Professional edition (Risk analysis Add-in for Microsoft Excel : Palisade Corporation) ก็จะได้การแจกแจงความน่าจะเป็นของอัตราการเจ็บป่วย/แสนคน/ปี จาก *Staphylococcus aureus* ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์สุกร

ค่าประมาณความเสี่ยง *S.aureus* ในตัวอย่างเนื้อสุกร

ค่าประมาณความเสี่ยงจาก *S.aureus* ในตัวอย่างเนื้อสุกร รายงานเป็น 3 ส่วน คือ ความเสี่ยงในการเจ็บป่วยจากการบริโภคผลิตภัณฑ์สุกรที่ปนเปื้อนด้วย *S.aureus* ต่อวัน (Daily risk) ความเสี่ยงในการเจ็บป่วยจากการบริโภคผลิตภัณฑ์สุกรที่ปนเปื้อนด้วย *S.aureus* ต่อปี (Annual risk) และอัตราการเจ็บป่วยจากการบริโภคผลิตภัณฑ์สุกรที่ปนเปื้อนด้วย *S.aureus* ต่อแสนคนต่อปี (Annual risk rate) แจกแจงตามกลุ่มเขตพื้นที่และตลาดสด ดังแสดงในตารางที่ 1.5-1.7 ตามลำดับ

ตารางที่ 1.5 ความเสี่ยงในการเจ็บป่วยจากการบริโภคผลิตภัณฑ์สุกรที่ปนเปื้อนด้วย *S.aureus* ต่อวัน

กลุ่มเขต	Daily risk			
	พื้นที่	ตลาด 1	ตลาด 2	ตลาด 3
กรุงเทพกลาง	1.2×10^{-6}	4.0×10^{-6}	-	-
กรุงเทพออก	3.6×10^{-5}	2.3×10^{-7}	1.0×10^{-6}	-
กรุงเทพเหนือ	1.3×10^{-6}	1.1×10^{-6}	1.5×10^{-6}	-
กรุงเทพใต้	7.7×10^{-7}	2.5×10^{-5}	-	-
ธนบุรีเหนือ	6.6×10^{-6}	1.5×10^{-6}	3.4×10^{-7}	-
ธนบุรีใต้	1.3×10^{-6}	$< \times 10^{-6}$	3.2×10^{-6}	1.4×10^{-6}

ตารางที่ 1.6 ความเสี่ยงในการเจ็บป่วยจากการบริโภคผลิตภัณฑ์สุกรที่ปนเปื้อนด้วย *S.aureus* ต่อปี

กลุ่มเขต	Annual risk			
	พื้นที่	ตลาด 1	ตลาด 2	ตลาด 3
กรุงเทพกลาง	4.2×10^{-4}	1.5×10^{-3}	-	-
กรุงเทพออก	1.3×10^{-2}	8.3×10^{-5}	3.8×10^{-4}	-
กรุงเทพเหนือ	4.6×10^{-4}	4.0×10^{-4}	5.5×10^{-4}	-
กรุงเทพใต้	2.8×10^{-4}	9.1×10^{-3}	-	-
ธนบุรีเหนือ	2.4×10^{-3}	5.3×10^{-4}	1.2×10^{-4}	-
ธนบุรีใต้	4.6×10^{-4}	$< \times 10^{-4}$	1.2×10^{-3}	5.1×10^{-4}

ตารางที่ 1.7 อัตราการเจ็บป่วยจากการบริโภคผลิตภัณฑ์สุกรที่ปนเปื้อนด้วย *S.aureus* ต่อแสนคนต่อปี
(Annual risk rate)

กลุ่มเขตพื้นที่	ตลาดที่	ค่าต่ำสุด	5 th percentile	ค่าเฉลี่ย	95 th percentile	ค่าสูงสุด
กรุงเทพมหานคร	1	7	23	42	63	93
	2	50	104	147	188	226
กรุงเทพมหานคร	1	27	415	1,313	2,488	4,227
	2	0	3	8	14	21
	3	14	25	38	52	72
กรุงเทพมหานคร	1	4	20	47	75	104
	2	4	20	40	55	59
	3	21	40	55	70	92
กรุงเทพมหานคร	1	12	20	28	36	47
	2	386	667	909	1,123	1,284
ธนบุรีเหนือ	1	11	84	239	418	595
	2	1	16	53	106	188
	3	1	6	12	20	36
ธนบุรีใต้	1	14	33	46	59	70
	2	< 1*	< 1*	< 1*	< 1*	< 1*
	3	4	37	116	215	327
	4	8	25	51	76	96

* ค่าที่ได้เป็นเลขทศนิยมที่น้อยกว่า 1 ซึ่งไม่สามารถรายงานเป็นจำนวนนับของผู้ป่วยได้

=====

บทที่ 2

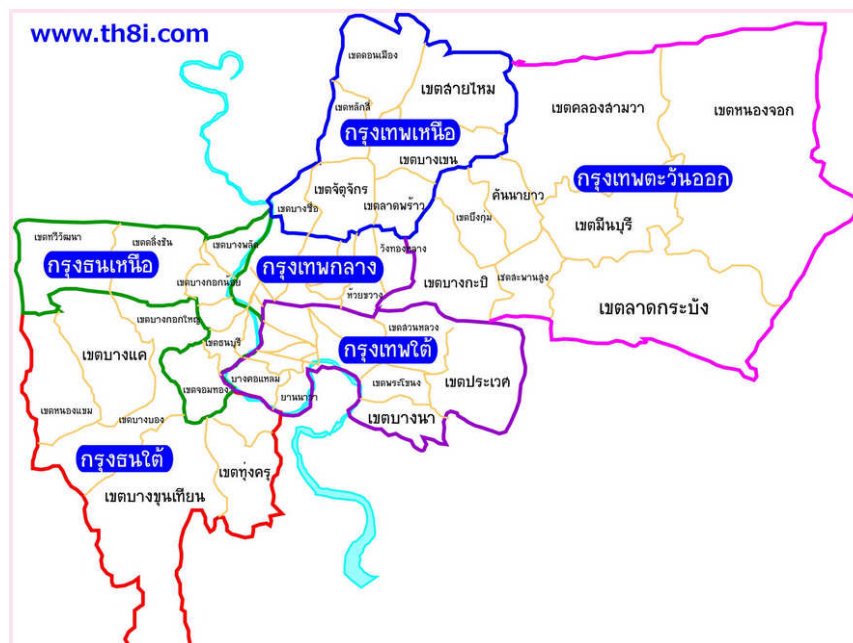
การประเมินการเสื่อมเนื้อมสุกร (Spoilage assessment)

2.1 ระดับการปนเปื้อน Spoilage bacteria ในเนื้อสุกร (Spoilage level in pork)

2.1.1 การเก็บตัวอย่าง (Pork sampling)

พื้นที่กรุงเทพมหานครมีแบ่งส่วนราชการกรุงเทพมหานครเป็น 6 กลุ่มเขตพื้นที่ (ภาพที่ 2.1) ดังนี้

1. กลุ่มเขตพื้นที่ กรุงเทพมหานครกลาง (Central Bangkok : C) ประกอบด้วย
เขตพระนคร เขตสัมพันธวงศ์ เขตห้วยขวาง เขตดินแดง
2. กลุ่มเขตพื้นที่ กรุงเทพออก (East Bangkok : E) ประกอบด้วย
เขตบางกะปิ เขตสะพานสูง เขตบึงกุ่ม เขตคันนายาว เขตลาดกระบัง
เขตมีนบุรี เขตหนองจอก เขตคลองสามวา
3. กลุ่มเขตพื้นที่ กรุงเทพเหนือ (North Bangkok : N) ประกอบด้วย
เขตจตุจักร เขตบางซื่อ เขตลาดพร้าว เขตหลักสี่
เขตดอนเมือง เขตสายไหม เขตบางเขน
4. กลุ่มเขตพื้นที่ กรุงเทพใต้ (South Bangkok : S) ประกอบด้วย
เขตปทุมวัน เขตบางรัก เขตสาทร เขตบางคอแหลม
เขตยานนาวา เขตคลองเตย เขตวัฒนา เขตพระโขนง
เขตสวนหลวง เขตบางนา เขตประเวศ
5. กลุ่มเขตพื้นที่ ธนบุรีเหนือ (Upper thonburi : U) ประกอบด้วย
เขตธนบุรี เขตคลองสาน เขตจอมทอง เขตบางกอกใหญ่
เขตบางกอกน้อย เขตบางพลัด เขตตลิ่งชัน เขตทวีวัฒนา
6. กลุ่มเขตพื้นที่ ธนบุรีใต้ (Lower thonburi : L) ประกอบด้วย
เขตภาษีเจริญ เขตบางแค เขตหนองแขม เขตบางขุนเทียน
เขตบางบอน เขตราษฎร์บูรณะ เขตทุ่งครุ



ภาพที่ 2.1 แผนผังการแบ่งพื้นที่ในการเก็บตัวอย่างในส่วนราชการกรุงเทพมหานคร

2.1.2 การคัดเลือกจุลินทรีย์เสื่อมเพื่อวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ (Choosing spoilage bacteria for laboratory analysis)

การคัดเลือกจุลินทรีย์เสื่อมที่วิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการนั้น อาศัยสภาวะในการเก็บรักษาเนื้อสุกร ณ จุดจำหน่ายที่เป็นตลาดสดเป็นหลัก โดยพิจารณาปัจจัยทางกายภาพ คือ อุณหภูมิในการเก็บรักษา (storage temperatures) (ร่วมกับปัจจัยการมี/ไม่มีออกซิเจน) โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ

1. อุณหภูมิแช่เย็น (refrigerated temperature)

ช่วงอุณหภูมิแช่เย็น อยู่ระหว่าง $0-10^{\circ}\text{C}$ ในสภาวะมีออกซิเจน โดยแบคทีเรียเสื่อมที่มีบทบาทสำคัญ คือ *Pseudomonas* spp. กล่าวคือ *P. fragi* และ *P. fluorescens* เป็นแบคทีเรียเสื่อมหลักที่ปนเปื้อนเนื้อสัตว์ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิเย็นแบบมีอากาศ (aerobic spoilage of chilled meat) ทั้งนี้เนื่องจาก คุณสมบัติในการใช้น้ำตาลกลูโคส ซึ่งการใช้น้ำตาลในแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโตจะไม่ก่อให้เกิดกลิ่น อย่างไรก็ตามเมื่อน้ำตาลกลูโคสหมดหรือไม่เพียงพอ ก็จะเริ่มใช้โปรตีนในเนื้อสัตว์เป็นแหล่งอาหารและพลังงาน จนก่อให้เกิดปัญหาของรสและกลิ่น (putrid odors and flavors) โดย pH ที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 5.5-5.8

2. อุณหภูมิอากาศ (ambient temperature)

ช่วงอุณหภูมิอากาศ เป็นช่วงอุณหภูมิที่สูงกว่าอุณหภูมิแช่เย็น (สูงกว่า 10°C) เป็นอุณหภูมิในกรณีที่วางขายและรอจำหน่ายเนื้อสุกรในตลาดสด ซึ่งแบคทีเรียที่อยู่รอดและ/หรือเจริญเติบโตได้ทั้งมี/ไม่มีออกซิเจน คือ กลุ่ม *Enterobacteriaceae* โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Klebsiella* spp. ซึ่งเป็น mesophilic ที่พบได้มากในการผลิตเนื้อสุกร โดยพบความชุกสูงสุดของ *Klebsiella* spp. ได้ตั้งแต่ผิวหนังสุกรที่โรงเชือดสุกรไปจนถึงเนื้อสุกรในตลาดสดและตลาดทันสมัย ร้อยละ 60, ร้อยละ 60 และ ร้อยละ 40 ตามลำดับ

ในขณะที่ความเข้มข้นสูงสุดของ *Klebsiella* spp. ที่ผิวหนังสุกรที่โรงเชือดสุกรไปจนถึงเนื้อสุกรในตลาดสดและตลาดพื้นสมัยอยู่ในระดับต่ำเพียง 0.8 mpn/ตารางเซนติเมตร 8.1 mpn/กรัม และ 5.21 mpn/กรัม ตามลำดับ (Harintharanon et al., 2014)

2.1.3 การวิเคราะห์จุลินทรีย์เสื่อมทางห้องปฏิบัติการ (Laboratory analyzing spoilage bacteria)

1. *Pseudomonas fluorescens*

- ชั่งเนื้อสุกร 25 กรัมนำมาผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันกับ Buffered peptone water (BPW) ปริมาตร 225 ml ให้ได้การเจือจางลง 10 เท่า แล้วทำ serial 10-fold dilution ด้วย BPW อีกขั้นต่ำ 8 dilutions
- นำสารละลายของแต่ละ dilution ปริมาตร 0.1 ml มาเพาะเชื้อด้วยวิธี spread plate ลงบน *Pseudomonas* CFC selective agar (SR0103) บ่มเพาะที่ 25°C นาน 48 ชม.
- นับจำนวน colony ที่เรืองแสง (fluorescent) ภายใต้แสง UV A ความยาวคลื่น 500 nm และยืนยันชนิดแบคทีเรียโดยวิธีการทางชีวเคมี (Vitek® II)

2. *Klebsiella* spp.

- ชั่งเนื้อสุกร 25 กรัมนำมาผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันกับ Buffered peptone water (BPW) ปริมาตร 225 ml ให้ได้การเจือจางลง 10 เท่า แล้วทำ serial 10-fold dilution ด้วย BPW อีกขั้นต่ำ 8 dilutions
- นำสารละลายของแต่ละ dilution ปริมาตร 0.1 ml มาเพาะเชื้อด้วยวิธี spread plate ลงบน MacConkey Agar บ่มเพาะที่ 37°C นาน 24 ชั่วโมง
- นับจำนวน colony ที่มีลักษณะนูน มั่น เยิ้ม สีชมพู บนอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นหลังสีชมพู
- เลือกโคโลนีไปทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ motility test
- บันทึกผลเฉพาะ colony ที่เป็น non-motile
- ยืนยันชนิดแบคทีเรียโดยวิธีการทางชีวเคมี (Vitek® II)

2.1.4 การเสื่อมหรือการเน่าเสียของเนื้อสัตว์ (Meat spoilage)

เนื้อสัตว์เน่าเสียได้ง่าย (perishable) เนื่องจากสารอาหารปริมาณมากที่ผิวหน้าเนื้อสัตว์ กอปรกับการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียจัดว่าเป็นการเปลี่ยนแปลงทางจุลชีววิทยา เมื่อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในเนื้อสัตว์ที่เก็บรักษาแบบมีอากาศ (aerobic) โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียเสื่อมเนื้อสัตว์ในกลุ่ม *Pseudomonas* spp. ที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งพลังงานอันดับแรกจนหมดอย่างรวดเร็ว

จากนั้น *Pseudomonas* spp. จึงเริ่มมีการใช้สารอาหารกลุ่มโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ *Pseudomonas* spp. จึงต้องผลิตน้ำย่อยหรือเอนไซม์ เช่น Protease ออกมา เพื่อย่อยโมเลกุลโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ ให้มีขนาดเล็กลงเพียงพอที่แบคทีเรียจะนำไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตได้ สารจากปฏิกิริยาการย่อยสลายสารอาหาร (metabolites) โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีน จะได้สารระเหย (volatile compounds) เช่น dimethylsulfide, hydrogen sulfide (H_2S) หรือ ammonia (NH_3) เป็นต้น สารระเหยเหล่านี้เป็นสาเหตุของกลิ่นเหม็นจากเนื้อสัตว์ที่เริ่มเน่าเสีย

ต่อมาเมื่อแบคทีเรียเสื่อมเนื้อสัตว์เพิ่มจำนวนมากขึ้น จะเริ่มสร้าง glycocalyx ซึ่งเป็น polysaccharide ที่มีลักษณะเป็นเมือกเหนียวลื่น (slime) ที่ผิวหน้าของเนื้อสัตว์ โดยการสะสมผลผลิตการเสื่อมต่างๆ (spoilage products) เหล่านี้ จากกระบวนการเปลี่ยนแปลงเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียทั้งหมดนี้ ทำให้เนื้อสุกหรือเน่าเสียจนไม่เหมาะสมสำหรับการบริโภค (Blackburn, 2006)

นอกจากนี้ยังมีกลุ่ม *Enterobacteriaceae* ซึ่งเป็น mesophilic ที่พบได้มากในการผลิตเนื้อสุก คือ *Klebsiella* spp. โดยพบความชุกสูงสุดของ *Klebsiella* spp. ได้ตั้งแต่ผิวหนังสุกที่โรงเชือดสุกไปจนถึงเนื้อสุกในตลาดสดและตลาดทันสมัย ร้อยละ 60, ร้อยละ 60 และ ร้อยละ 40 ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้นสูงสุดของ *Klebsiella* spp. ที่ผิวหนังสุกที่โรงเชือดสุกไปจนถึงเนื้อสุกในตลาดสดและตลาดทันสมัยอยู่ในระดับต่ำเพียง 0.8 mpn/ตารางเซนติเมตร 8.1 mpn/กรัม และ 5.21 mpn/กรัม ตามลำดับ (Harintharanon et al., 2014)

ผลผลิตการเสื่อมของเนื้อสัตว์

(Spoilage products of meat)

ผลิตผลการเสื่อมที่เกิดจากการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียในเนื้อสัตว์ แบ่งได้ 3 กลุ่มใหญ่ คือ

1. สารจากปฏิกิริยา (metabolites)

โดยทั่วไป หมายถึง สารประกอบที่เป็นผลที่ได้จากปฏิกิริยาเคมี ในที่นี้หมายถึงผลผลิตที่แบคทีเรียเสื่อมเนื้อสัตว์สร้างหรือผลิตออกมาจากการใช้สารอาหารเพื่อการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียในเนื้อสัตว์ มีอยู่หลายชนิด เช่น

ก. สารระเหย (volatile compounds) ส่วนมากจะเป็นสารที่ได้จากการย่อยโมเลกุลโปรตีนให้มีขนาดเล็กลง เช่น

- dimethyl sulfide : *Pseudomonas* spp.
- hydrogen sulfide (H_2S) : *Shewanella putrefaciens*
- trimethyl amine (TMA) : *Shewanella putrefaciens*
- ammonia (NH_3) : *Shewanella putrefaciens*

ข. สารสี (pigments) เช่น

- sulfmyoglobin สารสีเขียวที่เกิดจากการรวมตัวกันของ hydrogen sulfide (H_2S) และ myoglobin (haemoglobin ในกล้ามเนื้อ)

- siderophore สารเรืองแสง (fluorescent) ที่ผลิตโดยแบคทีเรียเพื่อทำหน้าที่ดึงดูดธาตุเหล็ก ซึ่งจำเป็นในการเจริญเติบโตของ *Pseudomonas fluorescens*

ค. เมือก (slime) เป็นสารประกอบ polysaccharide เรียกว่า glycocalyx ซึ่งอาจจะพัฒนาต่อเนื่องต่อไปเป็น biofilm คลุมผิวเนื้อสัตว์ได้ในที่สุด

2. น้ำย่อย (enzymes)

ก. protease

ข. lipase

3. สารพิษ (toxin)

โดยทั่วไปแล้ว แบคทีเรียเสื่อมเนื้อสัตว์ส่วนใหญ่จะไม่ก่อโรค อย่างไรก็ตาม *Staphylococcus aureus* นอกจากจะผลิต protease ที่เสื่อมเนื้อสัตว์ได้แล้ว (Gundogan et al., 2010) ยังผลิตกลุ่มสารพิษ เรียกว่า Staphylococcal enterotoxins (SEs) ซึ่งปัจจุบันสามารถแยก SEs ได้ตั้งแต่ชนิด A (SEA) ไปถึงชนิด U (SE/U) รวมประมาณเกือบ 20 ชนิด (Thomas et al., 2007) โดยมากแล้ว *Staphylococcus aureus* ชนิดที่ผลิต SEA, SEB, SEC, SED และ SEE จะมีการศึกษาหรือรายงานพบปนเปื้อนในอาหาร

4. การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (microbial growth)

เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงหรือการสังเคราะห์สารประกอบต่างๆ เช่น metabolites หรือ enzymes ในเนื้อสัตว์ เป็นผลลัพธ์ที่เกิดจากการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ดังนั้นระดับความเสื่อมของเนื้อสัตว์จึงมีความสัมพันธ์โดยตรงกับจำนวนแบคทีเรียเสื่อมที่ตรวจนับได้ในเนื้อสัตว์ด้วย

แม้ว่าในเนื้อสัตว์จะมีการปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียหลายชนิดในเวลาเดียวกัน รวมเรียกว่า total viable count (TVC) อย่างไรก็ตาม โดยมากแล้วจะมีแบคทีเรียเสื่อมจำเพาะ หรือ specific spoilage organism (SSO) ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมที่สุดในการเพิ่มจำนวนในเนื้อสัตว์ภายใต้สภาวะการณ์หนึ่งๆ ของเนื้อสัตว์ ซึ่งประกอบด้วย :-

- ปัจจัยภายในเนื้อสัตว์ (intrinsic factors)
- ปัจจัยภายนอกเนื้อสัตว์ (extrinsic factors)
- ปัจจัยแฝง (implicit factors) เช่น ปฏิสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียด้วยกัน โดยมีข้อสังเกตว่า แบคทีเรียในกลุ่ม *Enterobacteriaceae* จะได้รับผลกระทบจากการเจริญเติบโตของแบคทีเรียอื่นมากกว่ากลุ่ม *Pseudomonas* spp.
- ปัจจัยการแปรรูปเนื้อสัตว์ (processing factors) ทั้งทางกายภาพและทางเคมี เช่น การทำให้แห้ง การผ่านความร้อน การปรุงแต่งเนื้อสัตว์โดยการเติมสารเคมี

เมื่อพิจารณาภาพการเปลี่ยนแปลงทั้ง 3 กลุ่มโดยรวมแล้ว จะเห็นได้ว่าการเปลี่ยนแปลงที่เป็นปฐมเหตุ คือ การเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย ก่อให้เกิดการสร้าง metabolite และการปล่อย enzymes เพื่อย่อยสลายอาหารโมเลกุลใหญ่ อย่างไรก็ตามยังมีรายงานการศึกษาว่า ระดับการสร้าง metabolite หรือ enzyme อาจจะไม่มีความสัมพันธ์อย่างชัดเจนกับปริมาณแบคทีเรียที่เพิ่มจำนวนใน

เนื้อสัตว์ ดังนั้นผลผลิตการเสื่อมที่เป็นการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียเสื่อมเนื้อสัตว์จึงเป็นดัชนี (index) ที่สำคัญในการตัดสินใจการเสื่อมหรือสิ้นสุดอายุการวางขาย (shelf life) เนื้อสัตว์

ความเข้มข้นของจุลินทรีย์กับผลผลิตการเสื่อม

(Contamination level and Spoilage products)

การสะสมผลผลิตการเสื่อมจะมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียเสื่อมและส่งผลต่ออายุการวางขาย (ตารางที่ 2.1)

กล่าวคือ แบคทีเรียเสื่อมเนื้อสัตว์ที่มีอัตราการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในเนื้อสุกรที่ไม่เก็บรักษาในอุณหภูมิต่ำกว่า $7-10^{\circ}\text{C}$ จะทำให้มีการสะสมผลผลิตของการเสื่อมอย่างรวดเร็วเช่นเดียวกัน ส่งผลให้ปริมาณการสะสมผลผลิตของการเสื่อมเกินกว่าระดับการเสื่อมขั้นต่ำในระยะเวลาสั้น ทำให้อายุการวางขายสั้นลงตามไปด้วย และในทางกลับกัน หากเก็บรักษาเนื้อสุกรในอุณหภูมิต่ำกว่า $7-10^{\circ}\text{C}$ แบคทีเรียเสื่อมเนื้อสัตว์เพิ่มจำนวนด้วยอัตราการเจริญเติบโตที่ช้า จึงสะสมผลผลิตของการเสื่อมน้อยกว่าระดับการเสื่อมขั้นต่ำ ทำให้เนื้อสุกรมีอายุการวางขายที่ยาวนานออกไปกว่าเนื้อสุกรที่ไม่เก็บรักษาในอุณหภูมิต่ำกว่า $7-10^{\circ}\text{C}$

ตารางที่ 2.1 ความเข้มข้นของจุลินทรีย์ที่สัมพันธ์กับผลผลิตการเสื่อมของแบคทีเรียในเนื้อสัตว์

แบคทีเรีย	(log cfu/cm ²)	ผลผลิตการเสื่อม
<i>S.aureus</i>	6.5	สารพิษ SEA ^a (Staphylococcal enterotoxin A)
<i>Pseudomonas</i> spp.	7	เมือก (slime) หรือ กลิ่นคล้ายผลิตภัณฑ์นม (dairy/buttery/fatty/cheesy odor)
	8	กลิ่นคล้ายผลไม้ (fruity / sickly sweet odor)
	9	กลิ่นเน่า (putrid)

^aFujikawa and Morozumi, 2006

การปนเปื้อนของแบคทีเรียเสื่อมในเนื้อสัตว์

(Contamination of meat spoilage bacteria)

แบคทีเรียเสื่อม (spoilage bacteria) ที่พบบ่อยในเนื้อสัตว์ที่เก็บในช่วงอุณหภูมิที่แช่เย็นและที่อุณหภูมิห้องมีทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ ปัจจัยที่ทำให้พบแบคทีเรียเสื่อมที่แตกต่างกัน คือ อุณหภูมิและอากาศ (ออกซิเจน) ในการเก็บรักษาเนื้อสัตว์ ดังนี้

1. สภาวะที่มีอากาศ (aerobic condition) มักพบแบคทีเรียเสื่อมเนื้อสัตว์ชนิดแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) แบ่งตามอุณหภูมิการเก็บรักษา คือ

ก. อุณหภูมิห้อง (room temperature) มักจะเป็นสมาชิกในกลุ่ม *Pseudomonas* spp. เช่น *P.fluorescens*, *P.fragi*, *P.lundensis* หรือ *P.putida* เป็นต้น (Blackburn, 2006)

ข. แช่เย็น (refrigerated temperature) มักจะเป็น *Moraxella*, *Psychrobacter* หรือ *Acinetobacter* เป็นต้น

2. สภาพที่ไม่มีอากาศ (anaerobic condition) มักพบแบคทีเรียเสื่อมเนื้อสัตว์ชนิดแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive) เช่น micrococci และ สมาชิกกลุ่ม lactic acid bacteria เช่น *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* หรือ *Weissella* (Blackburn, 2006)
3. สภาพที่มีและ/หรือไม่มีอากาศ มักพบแบคทีเรียกลุ่ม *Enterobacteriaceae* ซึ่งเป็น mesophilic bacteria ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะอุณหภูมิห้องหรือลักษณะของเยี่ยงตลาดสด เช่น *Klebsiella* spp. เป็นต้น

แบคทีเรียเสื่อมกลุ่ม *Pseudomonas* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ต้องอาศัยอากาศ (aerobic) ในการหายใจ (respiration) เพื่อใช้ในการสร้างพลังงาน ส่วนมากดำรงชีวิตแบบอิสระ (free living) บางส่วนเป็นแบคทีเรียก่อโรคในพืช บางส่วนเป็นแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์แบบฉวยโอกาส

แบคทีเรียเสื่อม *Pseudomonas* spp. จำนวนมากเป็น psychrotroph ที่เจริญเติบโตเร็ว ดังนั้นจึงมีช่วงอุณหภูมิที่กว้างในการเสื่อมเนื้อสัตว์ คือ เนื้อสัตว์ที่เก็บในตู้เย็นถึงเนื้อสัตว์ที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง เช่น *P.fluorescens* และ *P.fragi* ทั้งสองจุลินทรีย์นี้เสื่อมอาหารประเภทเนื้อ นมและผลิตภัณฑ์นม *P.fluorescens* ทำให้เกิด green rot จากการย่อยสลายโปรตีน ส่วน *P.fragi* ทำให้เกิด fruity spoilage เพราะผลผลิตการเสื่อมเป็น ester ที่ได้จากการย่อยสลายไขมันในเนื้อสัตว์ ดังนั้น *Pseudomonas* spp. จึงสามารถได้สารอาหารได้หลากหลายชนิดในเนื้อสัตว์ รวมถึงน้ำตาลด้วย ทำให้ *Pseudomonas* spp. เพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วกว่าแบคทีเรียเสื่อมชนิดอื่น นอกจากนี้ *Pseudomonas* spp. ยังสามารถทน pH ที่เป็นกรดในเนื้อสัตว์ได้ต่ำถึง pH 5.5 แต่ต้องการน้ำมากในระดับ a_w 0.97 แหล่งที่มาของ *Pseudomonas* spp. พบได้เป็นปกติในดินและน้ำ เมื่อมีการปนเปื้อน

ลักษณะเฉพาะของการเสื่อมของ *Pseudomonas* คือ มักในอาหารที่มีน้ำตาลน้อย กรดน้อย เก็บรักษาแบบแช่เย็น ในสภาพที่มีอากาศ (ไม่มีสิ่งกีดขวางที่ห้ามการผ่านของอากาศ) เช่น เนื้อสัตว์ ผลิตภัณฑ์นมไม่หมัก (non-fermented dairy product) ไข่ ปลา และผักบางชนิด บางครั้งการเสื่อมจะสร้างกลิ่นเหม็นจากการย่อยสลายโปรตีนและไขมัน

แบคทีเรียที่มีรายงานพบปนเปื้อนในเนื้อสุกร

(Bacterial contamination in pork)

1. แบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ (foodborne disease bacteria) แบ่งได้เป็น 2 กลไกการก่อโรค คือ
 - ก. Infection : โรคอาหารเป็นพิษจากการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารจนก่อให้เกิดการติดเชื้อ เช่น *Salmonella* หรือ *Campylobacter* ซึ่งเป็นแบคทีเรีย *Enterobacteriaceae* ชนิดที่ไม่ทนความร้อน ดังนั้นการปรุงหรือการกินอาหารที่สุกด้วยความร้อนอย่างทั่วถึงจะสามารถควบคุมปัญหาจากกลไก infection นี้ได้ อย่างไรก็ตามปัญหาของ infection ยังอาจจะเกิดจากการปนเปื้อนข้าม (cross contamination) ได้ด้วย

ข. Intoxication : โรคอาหารเป็นพิษจากสารพิษ (toxin) ที่ผลิตขึ้นในขณะที่แบคทีเรียเพิ่มจำนวนในอาหาร เช่น *Staphylococcus aureus* เป็นต้น แม้ว่าจะเป็นแบคทีเรียที่ไม่ทนความร้อน แต่สารพิษที่ *Staphylococcus aureus* สร้างขึ้นในอาหารกลับทนทานต่อความร้อนได้ดี ดังนั้นแม้ว่าความร้อนในการปรุงเนื้อสัตว์ให้สุกจะสามารถทำลายแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษได้ แต่สารพิษที่ทนความร้อนได้จะยังก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ จึงก่อให้เกิดปัญหาโรคอาหารเป็นพิษจากเนื้อสัตว์ได้มากกว่ากลไก infection (Nuanualsuwan, 2006)

2. แบคทีเรียเสื่อมเนื้อสัตว์ (meat spoilage bacteria) มีหลายกลุ่ม เช่น

ก. กลุ่ม *Pseudomonas* spp. เป็นสาเหตุหลักของการเสื่อมเนื้อสัตว์มากที่สุด เพราะเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วจากสารอาหารกลุ่มคาร์โบไฮเดรต ตามมาด้วยสารอาหารกลุ่มโปรตีนในเนื้อสัตว์ จนก่อให้เกิดกลิ่นผิดปกติ (off-odor) หรือ เมือก (slime) เช่น *P. fragi* และ *P. fluorescens* เป็นต้น

ข. *Shewanella putrefaciens* พบมากในเนื้อสุกรที่มีลักษณะ dark firm dry (DFD)

ค. กลุ่ม *Enterobacteriaceae* ที่มีบทบาทในการเสื่อมเนื้อสัตว์ เช่น *Klebsiella*, *Serratia liquifaciens* และ *Hafnia alvei* เป็นต้น

ง. *Staphylococcus aureus* นอกจากบทบาทการก่อโรคดีที่กล่าวมาแล้ว ยังมีบทบาทในการเสื่อมเนื้อสัตว์ได้อีกด้วย (Gundogan et al., 2010)

2.1.5 ผลการปนเปื้อนจุลินทรีย์เสื่อมเนื้อสุกร

(Result of spoilage level in pork)

การรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ (concentration) ของการปนเปื้อนจุลินทรีย์เสื่อม คือ *Pseudomonas fluorescens* และ *Klebsiella* spp. ในเนื้อสุกรทางห้องปฏิบัติการ เป็นการรายงานค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของตัวอย่างเนื้อสุกรทั้งหมดจำแนกรายตลาดสดและกลุ่มเขตพื้นที่ของกรุงเทพมหานคร โดยจะใช้ค่าเฉลี่ยเรขาคณิต (geometric mean) เนื่องจาก เหตุผลดังต่อไปนี้

ก. ค่าความเข้มข้นของจุลินทรีย์ที่วิเคราะห์เชิงปริมาณโดยวิธี Direct Plate Count จะมีการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นในลักษณะเป็นเลขยกกำลัง (exponential)

ข. หากมีระดับการปนเปื้อนบางตัวอย่างที่แตกต่างจากตัวอย่างอื่นในกลุ่ม เช่น ระดับการปนเปื้อนสูงกว่า หรือ ต่ำกว่าตัวอย่างอื่นในกลุ่ม หากใช้ค่าเฉลี่ยเลขคณิต (arithmetic mean) ก็จะทำให้ได้ค่าเฉลี่ยที่กระโดดหรือดึงออกจากตัวอย่างอื่นในกลุ่มไปมาก ดังนั้นการคำนวณเป็นค่าเฉลี่ยเลขคณิต (arithmetic mean) จึงไม่เหมาะสมและไม่เป็นตัวแทนที่ดีของกลุ่มตัวอย่างที่วิเคราะห์

การรายงานความเข้มข้นของการปนเปื้อนทั้ง *Pseudomonas fluorescens* และ *Klebsiella* spp. ในเนื้อสุกรทางห้องปฏิบัติการ ประกอบด้วย 2 parameters คือ

1. μ (average) โดยมากจะเป็น mean มีหน่วยเป็น log cfu/g ซึ่งในที่นี้คำนวณโดยใช้ค่าเฉลี่ยเรขาคณิต (Geometric mean) ของระดับการปนเปื้อนเฉพาะที่ให้ผลบวก (positive samples) เนื่องจาก
2. σ (Standard deviation : SD) มีหน่วยเป็น log cfu/g เช่นเดียวกัน แต่ในบางกรณีอาจจะไม่สามารถคำนวณ SD ได้ เนื่องจาก มีเพียงตัวอย่างเดียวที่ให้ผลบวก

ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของการปนเปื้อนทั้ง *Pseudomonas fluorescens* และ *Klebsiella* spp. ในเนื้อสุกรทางห้องปฏิบัติการ ดังแสดงในตารางที่ 2.2 และ ภาพที่ 2.2 ตามลำดับ และ ตารางที่ 2.3 และ ภาพที่ 2.3 ตามลำดับ

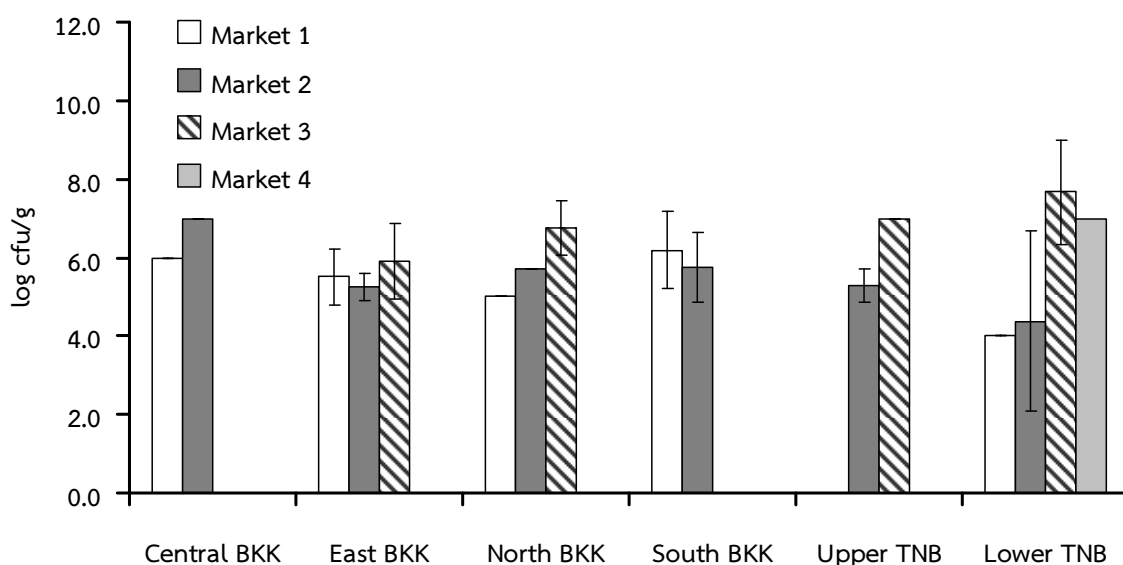
ตารางที่ 2.2 ความเข้มข้นการปนเปื้อน *Pseudomonas fluorescens* ในกลุ่มเขตพื้นที่กรุงเทพมหานคร

กลุ่มเขตพื้นที่	ความเข้มข้นการปนเปื้อน (log cfu/g $\pm$ SD.)			
	ตลาดที่ 1	ตลาดที่ 2	ตลาดที่ 3	ตลาดที่ 4
กรุงเทพกลาง	6.00 $\pm$ 0	7.00 $\pm$ 0	N/A*	N/A
กรุงเทพออก	5.50 $\pm$ 0.71	5.24 $\pm$ 0.34	5.89 $\pm$ 0.96	N/A
กรุงเทพเหนือ	5.00 $\pm$ 0	5.70 $\pm$ 0	6.76 $\pm$ 0.69	N/A
กรุงเทพใต้	6.19 $\pm$ 1.00	5.74 $\pm$ 0.89	N/A	N/A
ธนบุรีเหนือ	N/D**	5.30 $\pm$ 0.43	7.00 $\pm$ 0	N/A
ธนบุรีใต้	4.00 $\pm$ 0	4.37 $\pm$ 2.29	7.66 $\pm$ 1.33	7.00 $\pm$ 0

* not applicable ไม่มีการเก็บตัวอย่าง

** not detectable ตรวจไม่พบการปนเปื้อน

Concentration of *Pseudomonas fluorescens* in pork in Bangkok

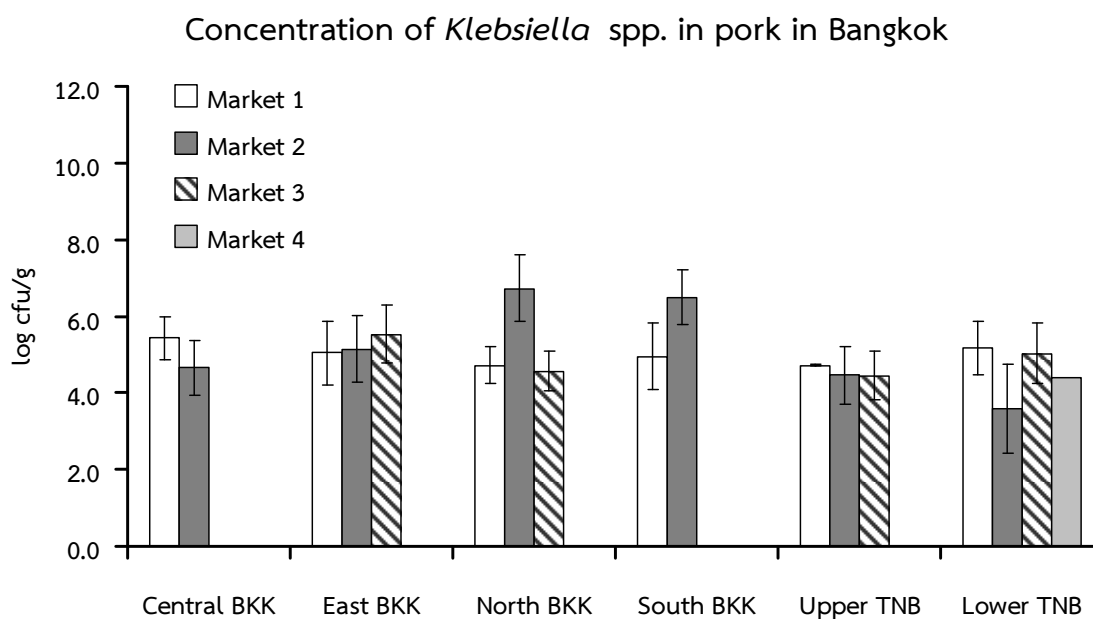


ภาพที่ 2.2 ความเข้มข้นของ *Pseudomonas fluorescens* ในเนื้อสุกรในเขตพื้นที่กรุงเทพ

ตารางที่ 2.3 ความเข้มข้นการปนเปื้อน *Klebsiella* spp. ในกลุ่มเขตพื้นที่กรุงเทพมหานคร

กลุ่มเขตพื้นที่	ความเข้มข้นการปนเปื้อน (log cfu/g $\pm$ SD.)			
	ตลาดที่ 1	ตลาดที่ 2	ตลาดที่ 3	ตลาดที่ 4
กรุงเทพกลาง	5.43 $\pm$ 0.57	4.65 $\pm$ 0.70	N/A*	N/A
กรุงเทพออก	5.05 $\pm$ 0.82	5.14 $\pm$ 0.87	5.54 $\pm$ 0.76	N/A
กรุงเทพเหนือ	4.71 $\pm$ 0.48	6.72 $\pm$ 0.86	4.56 $\pm$ 0.52	N/A
กรุงเทพใต้	4.95 $\pm$ 0.87	6.49 $\pm$ 0.72	N/A	N/A
ธนบุรีเหนือ	4.72 $\pm$ 0.03	4.46 $\pm$ 0.74	4.46 $\pm$ 0.62	N/A
ธนบุรีใต้	5.17 $\pm$ 0.68	3.59 $\pm$ 1.14	5.03 $\pm$ 0.78	4.38 $\pm$ 0.43

* not applicable ไม่มีการเก็บตัวอย่าง



ภาพที่ 2.3 ความเข้มข้นของ *Klebsiella* spp. ในเนื้อสุกรในเขตพื้นที่กรุงเทพ

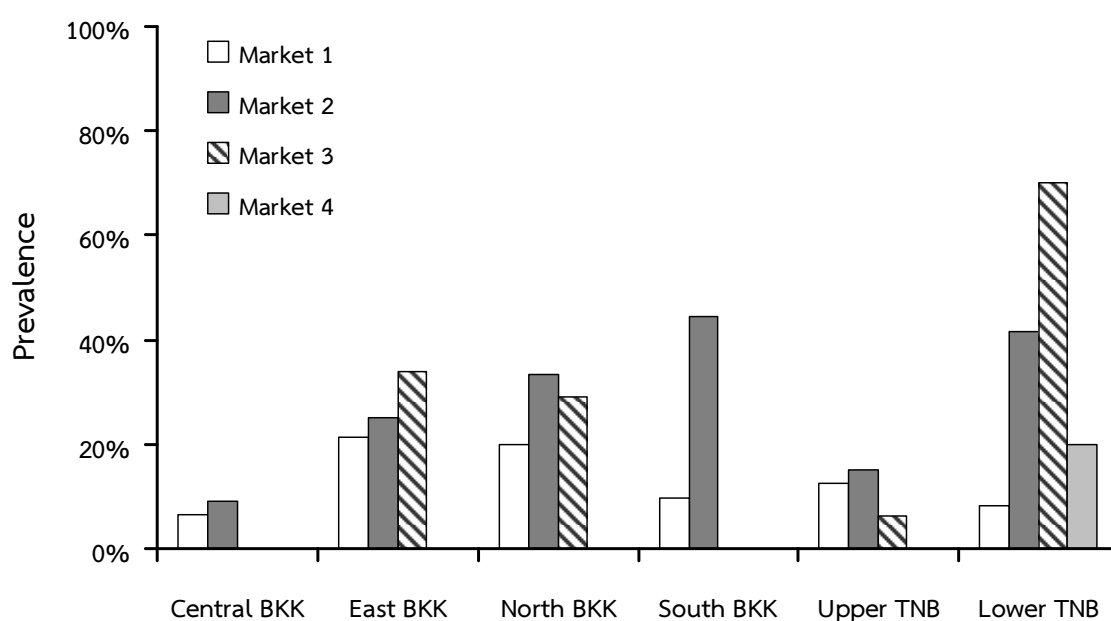
ผลการวิเคราะห์ความชุกของการปนเปื้อนทั้ง *Pseudomonas fluorescens* และ *Klebsiella* spp. ในเนื้อสุกรทางห้องปฏิบัติการ ดังแสดงในตารางที่ 2.4 และ ภาพที่ 2.4 ตามลำดับ และ ตารางที่ 2.5 และ ภาพที่ 2.5 ตามลำดับ

ตารางที่ 2.5 ความชุกการปนเปื้อน *Pseudomonas fluorescens* ในกลุ่มเขตพื้นที่กรุงเทพมหานคร

กลุ่มเขตพื้นที่	ความชุก (ร้อยละ) การปนเปื้อน <i>Pseudomonas fluorescens</i> ในเนื้อสุกร			
	ตลาดที่ 1	ตลาดที่ 2	ตลาดที่ 3	ตลาดที่ 4
กรุงเทพกลาง	7	9	N/A*	N/A
กรุงเทพออก	21	25	34	N/A
กรุงเทพเหนือ	20	33	29	N/A
กรุงเทพใต้	10	44	N/A	N/A
ธนบุรีเหนือ	13	15	6	N/A
ธนบุรีใต้	8	42	70	20

* not applicable ไม่มีการเก็บตัวอย่าง

Prevalence of *Pseudomonas fluorescens* in pork in Bangkok

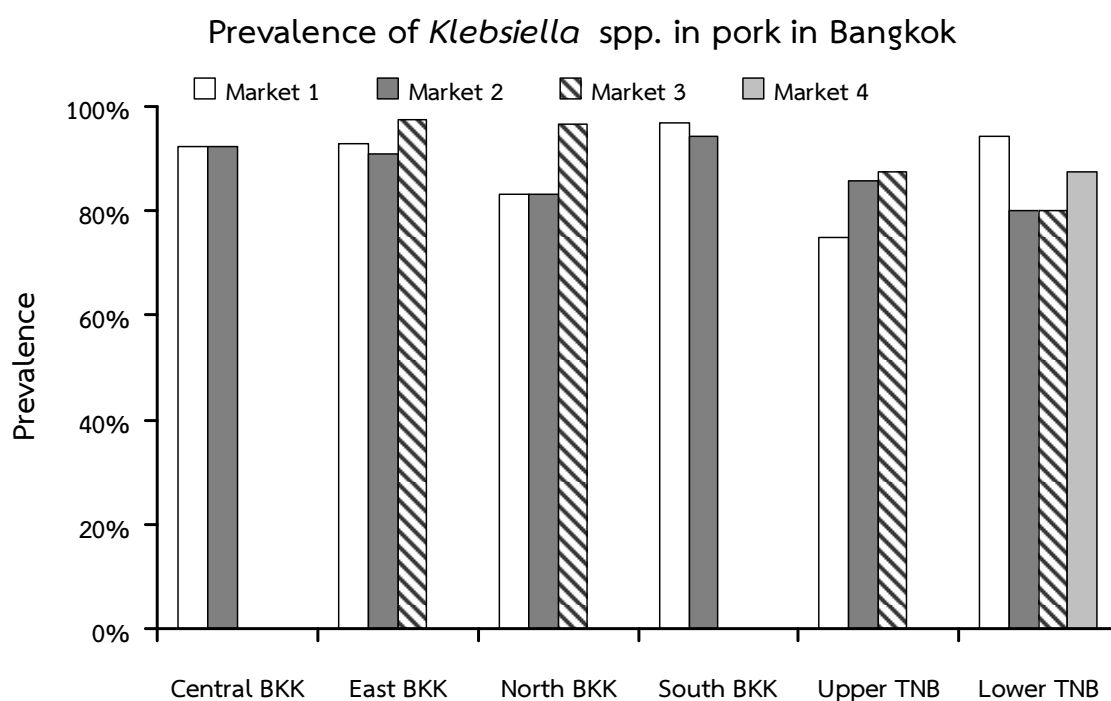


ภาพที่ 2.5 ความชุกของ *Pseudomonas fluorescens* ในเนื้อสุกรในเขตพื้นที่กรุงเทพ

ตารางที่ 2.6 ความชุกการปนเปื้อน *Klebsiella* spp. ในกลุ่มเขตพื้นที่กรุงเทพมหานคร

กลุ่มเขตพื้นที่	ความชุก (ร้อยละ) การปนเปื้อน <i>Klebsiella</i> spp. ในเนื้อสุกร			
	ตลาดที่ 1	ตลาดที่ 2	ตลาดที่ 3	ตลาดที่ 4
กรุงเทพกลาง	92	92	N/A*	N/A
กรุงเทพออก	93	91	98	N/A
กรุงเทพเหนือ	83	83	97	N/A
กรุงเทพใต้	97	94	N/A	N/A
ธนบุรีเหนือ	75	86	88	N/A
ธนบุรีใต้	94	80	80	88

* not applicable ไม่มีการเก็บตัวอย่าง



ภาพที่ 2.6 ความชุกของ *Klebsiella* spp. ในเนื้อสุกรในเขตพื้นที่กรุงเทพ

2.1.6 สรุปภาพรวมระดับการปนเปื้อน spoilage bacteria ในเนื้อสุกร (Summary of spoilage bacteria level in pork)

การปนเปื้อนของแบคทีเรียเสื่อม *Pseudomonas fluorescens* และ *Klebsiella* spp.

1. ความเข้มข้นของ *Pseudomonas fluorescens* และ *Klebsiella* spp. รวมทุกตลาดสดในทุกกลุ่มเขตพื้นที่กรุงเทพมหานครไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p\text{-value} > 0.024$)
2. ความชุกชุมทุกตลาดสดในทุกกลุ่มเขตพื้นที่กรุงเทพมหานครของ *Pseudomonas fluorescens* น้อยกว่าความชุกของ *Klebsiella* spp. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} < 0.01$)
3. ความเข้มข้นและความชุกของ *Pseudomonas fluorescens* และ *Klebsiella* spp. รวมทุกตลาดสดในทุกกลุ่มเขตพื้นที่กรุงเทพมหานคร พบว่า มีสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (correlation coefficient) ในระดับต่ำ ร้อยละ 24.13 และ 27.35 ตามลำดับ เท่านั้น

ดังนั้น จะสังเกตได้ว่า *Klebsiella* spp. เป็นแบคทีเรียเสื่อมหลักของเนื้อสุกรที่จำหน่ายในตลาดสดในกรุงเทพ เนื่องจาก มีภาพรวมของการปนเปื้อนกระจายทั่วทุกเขตพื้นที่ในกรุงเทพ ซึ่งสอดคล้องกับอุณหภูมิการเก็บรักษาในการขาย ณ อุณหภูมิห้อง

อย่างไรก็ตาม แม้ว่า *Pseudomonas fluorescens* จะมีความชุกหรือการกระจายตัวที่ต่ำกว่า *Klebsiella* spp. เนื่องจาก *Pseudomonas fluorescens* เป็นแบคทีเรียเสื่อมหลักในเนื้อสุกรที่เก็บรักษาในที่เย็น และเนื่องจาก ทั้งความเข้มข้นในการปนเปื้อนที่ไม่แตกต่างกันของแบคทีเรียเสื่อมทั้ง 2 ชนิด ดังนั้น การพิจารณาการเสื่อมของเนื้อสุกรอาจจะเลือกใช้ *Pseudomonas fluorescens* เป็นตัวแทนความเข้มข้นของการปนเปื้อน *Klebsiella* spp. ในเนื้อสุกรที่เก็บรักษา ณ อุณหภูมิห้องได้ในกรณีที่ สามารถแยก *Pseudomonas fluorescens* ได้จากตัวอย่างเนื้อสุกร

2.2 การแจกแจงความน่าจะเป็นการเสื่อมของเนื้อสุกร (Probability distribution of pork spoilage)

การเสื่อมของเนื้อสุกร (pork spoilage) เป็นปรากฏการณ์ที่มีการปนเปื้อนแบคทีเรียเสื่อม (spoilage bacteria) เช่น *Pseudomonas* spp. ก่อปรกับการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียเสื่อมอันเนื่องมาจากการเก็บรักษาที่ไม่เหมาะสม (inappropriate storage) ในระหว่างที่แบคทีเรียเสื่อมเพิ่มจำนวนในเนื้อสุกร ก็จะมีสร้างผลผลิตการเสื่อม (spoilage products) ทำให้เนื้อสุกรมีลักษณะทางกายภาพอันไม่พึงประสงค์หรือไม่เหมาะสมต่อการบริโภค (not fit for human consumption)

แนวทางในการประเมินการเสื่อมของเนื้อสุกร ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก คือ

1. การเก็บตัวอย่างเนื้อสุกร (sampling)
2. การวิเคราะห์ปริมาณหรือความเข้มข้นของแบคทีเรียเสื่อมในเนื้อสุกร (contamination levels)
3. การคัดสรร (determination) การแจกแจงความน่าจะเป็น (probability distribution) ในการอธิบาย (describe) หรือเพื่อใช้เป็นตัวแทน (representative) ของความเข้มข้นของแบคทีเรียเสื่อมในเนื้อสุกร ในการประเมินการเสื่อมของเนื้อสุกร

การเลือกการแจกแจงความน่าจะเป็น (probability distribution) เพื่อเป็นตัวแทน (representative) ของตัวแปร (variable) ในที่นี้ก็คือ ความเข้มข้นของแบคทีเรียเสื่อมในเนื้อสุกร (contamination level) พิจารณาจาก 3 เกณฑ์สำคัญ (OIE, 2004) คือ

1. แหล่งที่มาของข้อมูล (source of data) แบ่งได้เป็น 2 แหล่ง คือ
 - การสังเกตทดลอง (empirical data) เช่น ข้อมูลที่ได้จากการเก็บตัวอย่างและส่งวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ (sampling and measurement) การสำรวจ (survey) และการเก็บข้อมูล (observation) เป็นต้น
 - ความคิดเห็นผู้เชี่ยวชาญ (expert opinion) ในกรณีที่ไม่สามารถทำการศึกษาทดลองได้โดยตรง เนื่องจาก ข้อจำกัดต่างๆ เช่น จรรยาบรรณ ศีลธรรม งบประมาณ เวลา การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ เป็นต้น ดังนั้น จึงต้องอาศัยแหล่งข้อมูลจากผู้ที่มีความเชี่ยวชาญในด้านนั้นๆ โดยตรง และหากแม้ว่าไม่มีหรือไม่สามารถหาผู้เชี่ยวชาญโดยตรงได้ ก็อาจจำเป็นต้องพึ่งผู้เชี่ยวชาญในศาสตร์หรือสาขาข้างเคียงทดแทน ซึ่งในกรณีเหล่านี้จะทำให้การแจกแจงความน่าจะเป็นจากความคิดเห็นผู้เชี่ยวชาญนั้นมีความหลากหลาย (variability) และความไม่รู้ (uncertainty) สูงกว่า การแจกแจงความน่าจะเป็นที่ได้จากการศึกษาทดลอง

2. ปริมาณข้อมูล (amount of data) แบ่งได้เป็น 2 ระดับ คือ
 - ปริมาณข้อมูลมาก (abundant data) โดยทั่วไปจะได้จากแหล่งข้อมูลที่มาจากการสังเกตทดลอง จึงได้ข้อมูลที่มีจำนวนมากเพียงพอ
 - ปริมาณข้อมูลน้อย (few data) โดยทั่วไปจะได้จากแหล่งข้อมูลที่มาจากการความคิดเห็นผู้เชี่ยวชาญ จึงมีจำนวนข้อมูลที่น้อยกว่า
3. การเป็นตัวแทน (representativeness) แบ่งได้เป็น 2 ลักษณะ คือ
 - ข้อมูลตรง (direct) โดยทั่วไปจะได้จากแหล่งข้อมูลที่มาจากการสังเกตทดลอง จึงได้ข้อมูลที่เป็นตัวแทนได้โดยตรง
 - ข้อมูลทดแทน (surrogate) โดยทั่วไปจะได้จากแหล่งข้อมูลที่มาจากการความคิดเห็นผู้เชี่ยวชาญ หรือเป็นข้อมูลของจุลินทรีย์หรือสัตว์ชนิดอื่นทดแทน ดังนั้นจึงได้ข้อมูลที่ไม่เป็นตัวแทนที่ดี (non-representative) ทำให้มีความหลากหลาย (variability) และความไม่รู้ (uncertainty) สูงกว่า การแจกแจงความน่าจะเป็นที่ได้จากข้อมูลทางตรง

เทคนิคในการพัฒนาสร้าง (development) การแจกแจงความน่าจะเป็น (OIE, 2004)

ประกอบด้วย

1. การหาการแจกแจงกับข้อมูล (fitting distribution to data) โดยมากแล้วข้อมูลที่ได้อีกมักจะมาจากการสังเกตทดลอง (empirical data) โดยการแจกแจงความน่าจะเป็นทางสถิติที่ใช้ในการหาข้อมูลแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ
 - ก. Parametric distribution เป็นการแจกแจงความน่าจะเป็นที่กำหนดโดย parameter ของการแจกแจงนั้น เช่น การแจกแจง normal หรือ uniform เป็นต้น
 - ข. Non-parametric distribution เป็นการแจกแจงความน่าจะเป็นที่ไม่มีการกำหนด parameter ของการแจกแจงนั้น เช่น การแจกแจง histogram หรือ discrete เป็นต้น
2. การเลือกการแจกแจงแบบนามธรรม (subjective) โดยอาศัยข้อมูลความคิดเห็นผู้เชี่ยวชาญ
3. การใช้ทฤษฎี Bayes' เป็นแนวทางที่ใช้ 2 เทคนิค คือ การหาการแจกแจงกับข้อมูลการสังเกตทดลอง ร่วมกับ การเลือกการแจกแจงแบบนามธรรม เข้าด้วยกัน

ดังนั้นเมื่อพิจารณา 3 เกณฑ์ของการเลือกร่วมกับเทคนิคในการพัฒนาสร้างการแจกแจงความน่าจะเป็นแล้ว ทำให้สามารถจำแนกการแจกแจงความน่าจะเป็นได้ 4 แนวทาง (ภาพที่ 2.7) คือ

1. **ข้อมูลปริมาณมากและเป็นตัวแทน (abundant representative data)** จะใช้เทคนิคการพัฒนาสร้างการแจกแจงความน่าจะเป็นโดย
 - การหาการแจกแจงความน่าจะเป็นได้ทั้ง parametric และ non-parametric distributions
 - การแจกแจงความน่าจะเป็น มุ่งอธิบายความหลากหลาย (variability) ของความเข้มข้นของแบคทีเรียเสื่อมในเนื้อสุกร จึงเรียกว่า การแจกแจงความน่าจะเป็นระดับแรก (first order distribution)

2. ข้อมูลปริมาณน้อยและเป็นตัวแทน (few representative data) จะใช้เทคนิคการพัฒนา
สร้างการแจกแจงความน่าจะเป็นโดย
 - การหาการแจกแจงความน่าจะเป็นได้ทั้ง parametric และ non-parametric distributions
 - การแจกแจงความน่าจะเป็นแบบซ้อน 2 ชั้น คือ การแจกแจงความน่าจะเป็นซ้อน
การแจกแจงความน่าจะเป็นอีกชั้นหนึ่ง โดย“การแจกแจงความน่าจะเป็นระดับ
แรก” เป็นการอธิบายความไม่รู้ (uncertainty) ของ parameter ของการแจกแจง
ความน่าจะเป็นระดับสอง ซึ่งความน่าจะเป็นระดับสองมุ่งอธิบายความหลากหลาย
(variability) ของความเข้มข้นของแบบที่เรียลเชื่อมโยงในเนื้อสุกร จึงได้เป็นการแจกแจง
ความน่าจะเป็นระดับสอง (second order distribution)
3. ข้อมูลปริมาณน้อยและไม่เป็นตัวแทน (few non-representative data) จะใช้เทคนิค
การพัฒนาสร้างการแจกแจงความน่าจะเป็นโดยการใช้การเลือกการแจกแจงแบบนามธรรม
(subjective) โดยอาศัยข้อมูลความคิดเห็นผู้เชี่ยวชาญเป็นหลัก
4. ข้อมูลปริมาณมากและไม่เป็นตัวแทน (abundant non-representative data) จะใช้
เทคนิคการพัฒนาสร้างการแจกแจงความน่าจะเป็นแบบผสมโดยดัดแปลงจากการแจกแจง
แบบนามธรรม (subjective) โดยอาศัยข้อมูลความคิดเห็นผู้เชี่ยวชาญเป็นหลัก

ปริมาณข้อมูล
(amount of data)

	มาก (abundant)	น้อย (few)
Representative	Parametric distribution Non-parametric distribution	Classical statistics Bootstrap simulation Bayesian inference
Non-representative	Expert opinion	Bayesian inference

ภาพที่ 2.7 การจำแนกการแจกแจงความน่าจะเป็นตาม¹ปริมาณข้อมูล และ ²การเป็นตัวแทนของข้อมูล

2.2.1 ข้อมูลปริมาณมากและเป็นตัวแทน (Abundant representative data)

ในกรณีที่ข้อมูลที่ได้มีปริมาณมากและเป็นตัวแทนของตัวแปรที่สนใจ การเลือกการแจกแจงความน่าจะเป็นเพื่ออธิบายความหลากหลาย (variability) ของตัวแปรนั้น จะใช้วิธีการเลือกค่า parameter ที่เหมาะสมของการแจกแจงความน่าจะเป็นโดยการหาการแจกแจงความน่าจะเป็นได้ ซึ่งอาจจะเป็น parametric หรือ non-parametric distributions ก็ได้ (OIE, 2004)

การแจกแจง parametric (parametric distribution)

ข้อมูลที่มีปริมาณมากสามารถเลือกการแจกแจงชนิด parametric ซึ่งโดยทั่วไปจะเป็นการแจกแจงทฤษฎี (theoretical distribution) (เช่น การแจกแจง Normal หรือ การแจกแจง Poisson เป็นต้น) เนื่องจาก โปรแกรมในการจำลองเหตุการณ์จริง (Simulation software) มีการแจกแจงทฤษฎีอยู่แล้ว ดังนั้น โปรแกรมเหล่านี้ก็มักจะหาข้อมูลกับแบบจำลองทฤษฎีได้ด้วย

กระนั้นก็ตาม การเลือกการแจกแจงทฤษฎีจำเป็นต้องใช้ความระมัดระวัง ก็จะได้การแจกแจงที่ไม่เหมาะสม ในการอธิบายความหลากหลายของตัวแปรที่สนใจได้ เช่น ความเข้มข้นของแบคทีเรียเสื่อมในเนื้อสุกร หมายความว่า ค่าที่เป็นไปได้ (possible) จากการแจกแจงความน่าจะเป็น อาจจะไม่ใช่ว่าค่าที่มีความเป็นไปได้ทางชีววิทยา (biologically plausible) เช่น การเลือกการแจกแจง Normal ในการอธิบายความหลากหลายของตัวแปรที่สนใจได้ เช่น ความเข้มข้นของแบคทีเรียเสื่อมในเนื้อสุกร ต้องระมัดระวัง เนื่องจาก การแจกแจง Normal กำหนด parameter เฉพาะ ค่า mean และ ค่า standard deviation เท่านั้น กอปรกับธรรมชาติของการปนเปื้อนจุลินทรีย์ก็มีลักษณะที่เป็น Normal ด้วย ทำให้การเลือกใช้การแจกแจง Normal เป็นที่นิยมใช้มาก ข้อควรระวังอย่างยิ่ง คือ พิสัย (range) ของการแจกแจง Normal ครอบคลุมค่าระหว่าง $-\infty$ และ $+\infty$ ดังนั้นในระหว่างการจำลองเหตุการณ์จริง โปรแกรมอาจจะสุ่ม (random) ค่าจากการแจกแจงความน่าจะเป็นที่ค่าลบ (negative value) แม้ว่าจะเป็นไปได้ในทางคณิตศาสตร์ตามพื้นฐานของการแจกแจงความน่าจะเป็น Normal แต่กลับไม่ใช่ค่าที่มีความเป็นไปได้ทางชีววิทยา (biologically plausible) ดังนั้น จึงต้องเลือกใช้ด้วยความระมัดระวัง ทางออกที่เป็นไปได้ เช่น การกำหนดให้ค่าที่เป็นไปได้ (possible values) เป็นค่าบวกเท่านั้น หรือ การดัดแปลงค่าความเข้มข้นให้เป็นเลขยกกำลัง (logarithmic scale) จากนั้นจึงหาข้อมูลที่เป็นเลขยกกำลังด้วยการแจกแจง Normal ก็จะกลายเป็นการแจกแจง Log Normal แทน ซึ่งแม้ว่าค่าที่เป็นไปได้ในมาตราเลขยกกำลังจะเป็นค่าลบ (negative value) แต่เมื่อแปลง (transform) ค่าลบตามมาตราเลขยกกำลังเป็นค่าตามมาตราปกติ ก็จะไม่ใช้ค่าลบแต่จะได้ค่าทศนิยม (decimal) แทน (OIE, 2004)

สถิติความพอดีของการทาบ (Goodness-of-fit statistics)

ความพอดีของการทาบข้อมูลกับการแจกแจงความน่าจะเป็น เรียกว่า goodness-of-fit (gof) เป็นระดับความมากน้อยของความสอดคล้อง (match) ของการแจกแจงความน่าจะเป็นทฤษฎีกับข้อมูลที่ได้จากการสังเกตทดลอง (empirical data) โดยอาศัยเทคนิค Maximum likelihood estimators (MLE) ซึ่ง MLE จะเป็น parameter ของการแจกแจงทฤษฎีที่จะให้ค่าที่เป็นไปได้ที่สอดคล้องกับค่าที่ได้จากการสังเกตทดลองได้ดีที่สุด โดยอาศัยสถิติความพอดีของการทาบ (goodness-of-fit statistic) ที่ทำหน้าที่ในการเปรียบเทียบความสอดคล้องของค่าที่ได้จากการแจกแจงทฤษฎีกับค่าที่ได้จากการสังเกตทดลอง สถิติความพอดีของการทาบที่ใช้ในการตัดสินใจเลือกการแจกแจงความน่าจะเป็น เช่น

1. Chi-squared test

- เป็นสถิติความพอดีของการทาบ ที่มีความยืดหยุ่น (flexible) เพราะ สามารถใช้ทดสอบได้กับทุกการแจกแจงความน่าจะเป็น
- ข้อจำกัดสำคัญ คือ สถิตินี้ต้องจัดข้อมูลที่ได้จากการสังเกตทดลองเป็นกลุ่มๆ ดังนั้นจึงต้องการข้อมูลขั้นต่ำ 25 ค่าขึ้นไป นอกจากนี้ การแจกแจงข้อมูลเป็นกลุ่มยังจะทำให้ลักษณะพื้นฐานของข้อมูลหายไปอีกด้วย

2. Kolmogorov-Smirnov (KS) test

- เป็นสถิติความพอดีของการทาบที่ไม่จัดระเบียบข้อมูลเป็นกลุ่ม ซึ่งเป็นการลดข้อจำกัดของ Chi-squared test
- เป็นสถิติความพอดีของการทาบ ที่เปรียบเทียบความสอดคล้องของการแจกแจงความน่าจะเป็นทฤษฎีกับข้อมูลที่ได้จากการสังเกตทดลองในรูปแบบของการแจกแจงสะสม (cumulative distribution function : CDF) โดยการวิเคราะห์หาความแตกต่างที่มากที่สุด (maximum discrepancy) ระหว่างการแจกแจงความน่าจะเป็นทฤษฎีและการแจกแจงความน่าจะเป็นของข้อมูลการสังเกตทดลอง โดยละเอียดความสอดคล้อง (match) จากการทาบ (fit) ของการแจกแจงในส่วนอื่นๆ ที่เหลือ
- ข้อจำกัดสำคัญ คือ การมุ่งเน้นทดสอบหาความแตกต่างที่มากที่สุด มากกว่า การมุ่งเน้นทดสอบความสอดคล้อง (match) จากการทาบการแจกแจงรวมทั้งหมด ทำให้การแจกแจงความน่าจะเป็นทฤษฎีที่ผ่าน Kolmogorov-Smirnov (KS) test แต่อาจจะไม่ได้รับการแจกแจงความน่าจะเป็นทฤษฎีที่เป็นตัวแทนที่ดีที่สุดของข้อมูลที่ได้จากการสังเกตทดลองได้ เนื่องจาก อาจจะได้การแจกแจงทฤษฎีที่มี maximum discrepancy น้อยที่สุด แต่อาจจะเป็นการแจกแจงทฤษฎีที่ไม่มีความสอดคล้อง (match) โดยรวมที่ดีที่สุดก็เป็นได้

3. Anderson-Darling (AD) test

- เป็นสถิติความพอดีของการทาบที่แก้ไขข้อจำกัดของทั้ง Chi-squared test คือ ไม่จัดระเบียบข้อมูลเป็นกลุ่ม และ ข้อจำกัดของ Kolmogorov-Smirnov test คือ ไม่มุ่งเพียงการหาความแตกต่างที่มากที่สุด (maximum discrepancy) เท่านั้น
- เป็นสถิติความพอดีของการทาบ ที่เปรียบเทียบความสอดคล้องของการแจกแจงความน่าจะเป็นทฤษฎีกับข้อมูลที่ได้จากการสังเกตทดลองในรูปแบบของการแจกแจงสะสม

(cumulative distribution function : CDF) โดยการวิเคราะห์หาความแตกต่าง (discrepancy) โดยรวมทั้งหมดระหว่างการแจกแจงความน่าจะเป็นทฤษฎีและการแจกแจงความน่าจะเป็นของข้อมูลการสังเกตทดลอง

การ plot ความน่าจะเป็น

(Probability plotting)

การ plot ความน่าจะเป็นนี้เป็นเทคนิคในการคำนวณดัดแปลง (transform) ข้อมูลที่ได้จากการสังเกตทดลอง (empirical) โดยใช้วิธีคณิตศาสตร์และสถิติให้มีค่าที่สอดคล้องกับการแจกแจงทฤษฎี จากนั้นจึงสร้าง graph แล้วใช้สายตาพิจารณาระดับความสอดคล้องกัน (match) ของการแจกแจงทฤษฎีและข้อมูลการสังเกตทดลอง

หากข้อมูลที่ได้จากการสังเกตทดลองและการแจกแจงทฤษฎีมีความสอดคล้องกันมาก ก็จะได้ภาพของ probability plot ที่มีลักษณะที่เป็นเส้นตรง (straight line) ที่เป็นพื้นปลาแนลน้อย และในทางตรงกันข้าม หากมีความสอดคล้องกันน้อยกว่า ก็จะได้ภาพของ probability plot ที่มีลักษณะที่เป็นเส้นตรงแบบพื้นปลาแมกกว่า ดังนั้น การ plot ความน่าจะเป็นจึงเป็นเทคนิคที่เป็นนามธรรม (subjective) เพราะอาศัยความรู้สึกมากกว่าตัวเลขในการตัดสินใจเลือกการแจกแจงความน่าจะเป็น

การแจกแจง non-parametric

(non-parametric distribution)

เทคนิคการเลือกการแจกแจงชนิด non-parametric เพื่อใช้สำหรับการอธิบายความหลากหลายสำหรับแหล่งข้อมูลที่ได้จากความคิดเห็นผู้เชี่ยวชาญ (expert opinion) ซึ่งเทคนิคนี้มีจุดเด่นหรือข้อได้เปรียบหลายประการอันเป็นธรรมชาติของการแจกแจง non-parametric คือ การปราศจากข้อสมมุติฐาน ข้อกำหนดพื้นฐาน รวมถึงทฤษฎีที่เป็นเงื่อนไขของการแจกแจง parametric ดังนั้น การแจกแจงชนิด non-parametric จึงมีลักษณะที่ใช้สามัญสำนึก (intuitive) และใช้ง่ายกว่าการแจกแจงชนิด parametric นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้จากการสังเกตทดลองทั้งชนิดต่อเนื่อง (continuous data) และชนิดไม่ต่อเนื่อง (discrete data) ก็สามารถใช้การแจกแจง non-parametric ได้ด้วย(OIE, 2004)

ข้อมูลต่อเนื่อง

(continuous data)

ข้อมูลต่อเนื่องที่จัดระเบียบแบบช่วงความถี่ (histogram) หรือ แบบสะสม (cumulative) สามารถดัดแปลงเป็น การแจกแจง non-parametric ชนิดช่วงความถี่ (histogram) หรือชนิดสะสม ได้

○ *Histogram(minimum,maximum, $\{p_i\}$)*

○ *Cumul(minimum,maximum, $\{x_i\},\{p_i\}$)*

ข้อมูลไม่ต่อเนื่อง

(discrete data)

การแจกแจงไม่ต่อเนื่อง (discrete distribution) ใช้ได้กับข้อมูลที่มีจำนวนน้อย (small data) โดยนำจุดข้อมูล (data point, x_i) แต่ละจุดข้อมูลมากำหนดเป็นค่าต่างๆ ของการแจกแจงไม่ต่อเนื่อง (discrete distribution)

การแจกแจงไม่ต่อเนื่องยังสามารถใช้ได้กับข้อมูลที่มีจำนวนมากได้ โดยนำข้อมูลมาเรียงเรียงช่วงความถี่ (histogram) หรืออาจจะใช้การแจกแจง non-parametric ชนิดช่วงความถี่ (histogram) หรือ ชนิดสะสม ได้

- *Duniform* ($\{x_i\}$)
- *Discrete* ($\{x_i\}, \{p_i\}$)
- *Histogram* (*minimum, maximum, $\{p_i\}$*)
- *Cumul* (*minimum, maximum, $\{x_i\}, \{p_i\}$*)
- *General* (*minimum, maximum, $\{x_i\}, \{p_i\}$*)

2.2.2 ข้อมูลปริมาณน้อยและเป็นตัวแทน (Few representative data)

กรณีที่ข้อมูลมีปริมาณน้อย ดังนั้น จะเกิดความไม่รู้ (uncertainty) ในการกำหนดค่า parameter ของการแจกแจงความน่าจะเป็น และเนื่องจากข้อมูลที่ได้มีความเป็นตัวแทนที่ดี ดังนั้น จึงอธิบายความไม่รู้ของ parameter ของการแจกแจงความน่าจะเป็น ด้วยการแจกแจงชักตัวอย่าง (sampling distribution)

โดยการแจกแจงชักตัวอย่างนี้เอง จะเป็นการแจกแจงชั้นแรก (first order distribution) ซึ่งทำหน้าที่ในการอธิบายความไม่รู้ของ parameter ของการแจกแจงความน่าจะเป็นหลัก (เช่น ความเข้มข้นของแบคทีเรียเสื้อมในเนื้อสุกร) ดังนั้น จึงกลายเป็นการแจกแจงของการแจกแจงซ้อนกัน เรียกว่า การแจกแจงชั้นสอง (second order distribution)

ช่วงความเชื่อมั่น (confidence interval) ของการแจกแจงความน่าจะเป็นที่เป็นการแจกแจงชั้นแรก (การแจกแจงชักตัวอย่าง) นั้นถูกกำหนดโดยค่า mean และ ค่า standard deviation ของการแจกแจงชั้นแรก ซึ่งการกำหนดการแจกแจงชั้นแรกสามารถทำได้ 3 วิธีการ (OIE, 2004) คือ

1. วิธี Classical statistics
2. วิธี Bootstrap simulation
3. วิธี Bayesian inference

วิธี Classical statistics

วิธี classical statistics จะใช้ได้ได้ เมื่อมีการกำหนดการแจกแจงความน่าจะเป็นของข้อมูลที่ต้องการศึกษาวิเคราะห์เป็นแบบ binomial หรือ normal

กรณีการแจกแจงความน่าจะเป็นของข้อมูลเป็น Normal

- การแจกแจงความน่าจะเป็นหลัก (เช่น ความเข้มข้นของแบคทีเรียเสื้อมในเนื้อสุกร) เป็นแบบ Normal
- การแจกแจงความน่าจะเป็นชั้นแรก หรือ การแจกแจง (sampling distribution) หรือ การแจกแจงของ parameter ของการแจกแจงความน่าจะเป็นหลัก จะมีลักษณะ
 - = ค่า mean ของการแจกแจงชักตัวอย่าง (sampling distribution) จะเป็นการแจกแจงแบบ Student's t ดังนั้น ความไม่รู้ (uncertainty) ของค่าเฉลี่ยของประชากร (population mean) จะเป็นสมการ (2.1)

$$\mu = Student (n-1) \left(\frac{s}{\sqrt{n}} \right) + \bar{x} \quad (2.1)$$

กำหนดให้

- $Student_{(n-1)}$: การแจกแจง Student's t ที่มี degree of freedom เป็น $n-1$
- n : ขนาดตัวอย่าง (sample size)
- $\bar{x}$ และ s : sample mean และ sample standard deviation

- กรณีที่ขนาดตัวอย่างมากกว่า 30 พบว่า การแจกแจง *Student's t* จะมีการแจกแจงลู่เข้าหา (convergent) การแจกแจงแบบ Normal ดังนั้น ความไม่รู้ (uncertainty) ของค่าเฉลี่ยของประชากร (population mean) จะเป็นสมการ (2.2)

$$\mu = Normal \left(\bar{x}, \frac{s}{\sqrt{n}} \right) \quad (2.2)$$

= ค่า standard deviation ของการแจกแจงชักตัวอย่าง (sampling distribution) จะเป็น การแจกแจงแบบ Chi-squared ดังสมการ (2.3)

$$\sigma = \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{Chi-squared_{(n-1)}}} \quad (2.3)$$

กำหนดให้

- *Chi-squared*_(n-1) : การแจกแจง *Chi-squared* มี degree of freedom เป็น (n-1)
- *n* : ขนาดตัวอย่าง (sample size)
- *s* : sample standard deviation

การแจกแจงความน่าจะเป็นขั้นแรก (first order distribution) หรือ การแจกแจงชักตัวอย่าง (sampling distribution) หรือ การแจกแจงของ parameter ของการแจกแจงความน่าจะเป็นหลัก มีหน้าที่ในการอธิบายความไม่รู้ (uncertainty) ในการประมาณค่า population mean (μ) และ population standard deviation (σ) เนื่องจาก ทั้ง μ และ σ ทำหน้าที่เป็น parameter ของการแจกแจงความน่าจะเป็นหลัก (เช่น ความเข้มข้นของแบคทีเรียเสื่อมในเนื้อสุกร) ในกรณีตัวอย่างนี้ เป็นการแจกแจงความน่าจะเป็นแบบ Normal จึงกลายเป็นการแจกแจงขั้นสอง (second order distribution) ดังสมการ (2.4)

$$\underline{\underline{X}} = Normal (\underline{\mu}, \underline{\sigma}) \quad (2.4)$$

กำหนดให้

- ตัวแปรที่ขีดเส้นใต้ 1 เส้น เป็น ตัวแปรสุ่มขั้นแรก (first-order random variable)
- ตัวแปรที่ขีดเส้นใต้ 2 เส้น เป็น ตัวแปรสุ่มขั้นสอง (second-order random variable)

ดังนั้น เมื่อแทนค่า first-order random variable ลงในการแจกแจงความน่าจะเป็นหลัก จะได้ ดังสมการ (2.5)

$$\underline{\underline{X}} = Normal \left(\underline{Student (n-1) \left(\frac{s}{\sqrt{n}} \right) + \bar{x}}, \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{Chi-squared_{(n-1)}}} \right) \quad (2.5)$$

ซึ่งจะสังเกตได้อย่างชัดเจนว่า สมการ (5) เป็นการแจกแจงความน่าจะเป็นขั้นสอง (second order distribution) คือ การแจกแจงความน่าจะเป็นสุ่ม *Student's t* และ *Chi-squared* ที่เป็นการแจกแจงขั้นแรก ซ่อนอยู่ภายในการแจกแจงความน่าจะเป็นหลัก Normal อีกชั้นหนึ่ง

ตัวอย่าง การปนเปื้อน *Pseudomonas fluorescens* ในเนื้อสุกร โดยวิธี classical statistics

คำถาม ต้องการประมาณ (estimate) ค่า average ที่เป็นตัวแทนความเข้มข้น *P.fluorescens* ที่ปนเปื้อนในเนื้อสุกรในกลุ่มเขตพื้นที่กรุงเทพมหานคร ในรูปของการแจกแจงความน่าจะเป็น (probability distribution) แต่มีข้อมูลความเข้มข้น *P.fluorescens* เพียง 10 ตัวอย่างเนื้อสุกรที่สุ่มได้จากตลาดสดในกลุ่มเขตพื้นที่กรุงเทพมหานคร

คำตอบ ในกรณีนี้ พบว่า แหล่งข้อมูลที่ได้เป็นข้อมูลจากการสังเกตทดลอง (empirical data) จากพื้นที่เป้าหมายจึงจัดว่าเป็นตัวแทนที่ดี (representative) และ ตั้งข้อสมมุติฐานว่า การแจกแจงความเข้มข้นของ *P.fluorescens* ที่ปนเปื้อนในเนื้อสุกรในกลุ่มเขตพื้นที่กรุงเทพมหานครเป็น Normal (ตารางที่ 2.7)

ตารางที่ 2.7 แบบจำลอง spreadsheet ในการหา sampling distribution ของ population mean และ standard deviation โดยใช้ข้อมูลความเข้มข้น *P.fluorescens* ที่ปนเปื้อนในเนื้อสุกรจากตลาดสดในกลุ่มเขตพื้นที่กลาง

	A	B
1	ตัวอย่างเนื้อสุกรจากตลาดสดในกลุ่มเขตพื้นที่ กรุงเทพมหานคร	ความเข้มข้น <i>P.fluorescens</i> (cfu/g)
2	1	56
3	2	54
4	3	52
5	4	50
6	5	48
7	6	47
8	7	47
9	8	46
10	9	44
11	10	41
12	Sample mean ($\bar{x}$)	AVERAGE (B2:B11) = 48.5
13	Sample standard deviation (s)	STDEV (B2:B11) = 4.85
14	Sampling distribution ของ population mean (μ)	Student(10-1)*[B13/SQRT(10-1)]+B12
15	Sampling distribution ของ population standard deviation (σ)	SQRT[(10-1)*B13^2/Chisq(10-1)]

ค่า average ที่เป็นตัวแทนความเข้มข้น *P.fluorescens* ที่ปนเปื้อนในเนื้อสุกรในกลุ่มเขตพื้นที่กรุงเทพมหานคร ในรูปของการแจกแจงความน่าจะเป็น (probability distribution) ใช้สัญลักษณ์ $\underline{X}$ โดยใช้ข้อมูลความเข้มข้น *P.fluorescens* 10 ตัวอย่างเนื้อสุกรที่สุ่มได้จากตลาดสดในกลุ่มเขตพื้นที่กรุงเทพมหานคร ทำได้โดยการแทนค่าที่ได้จากตารางที่ 7 ลงใน second order distribution จะได้ดังสมการ (2.6)

$$\underline{X} = Normal \left(\text{Student}(10-1) \left(\frac{4.85}{\sqrt{10}} \right) + 48.5, \sqrt{\frac{(10-1)s^2}{\text{Chi-squared}(10-1)}} \right) \quad (2.6)$$

วิธี Bootstrap simulation

วิธี bootstrap simulation ใช้ในการจำลองเหตุการณ์ เพื่อให้ได้ผลลัพธ์เป็นข้อมูล เพื่อใช้ในการกำหนดการแจกแจงชักตัวอย่าง (sampling distribution) ที่ใช้ในการอธิบาย uncertainty ของ parameters เช่น population mean หรือ population standard deviation

โดยทั่วไป จะเริ่มต้นด้วยการกำหนดการแจกแจงชักตัวอย่าง (sampling distribution) ของข้อมูลที่มีซึ่งมีจำนวน n ตัวอย่าง จากนั้นจึงสุ่ม n ตัวอย่างจากการแจกแจงชักตัวอย่างที่กำหนดไว้ตอนแรก แบบคืนกลับ (replacement) แล้วจึงคำนวณ parameter ของตัวแปรที่สนใจ (เช่น ความเข้มข้นของแบคทีเรียเสื้อมในเนื้อสุกร) จากนั้นจึงดำเนินการวนรอบซ้ำ (iteration) ของการสุ่ม n ตัวอย่างแบบคืนกลับ ตามด้วยการคำนวณ parameter ของตัวแปรที่สนใจจำนวนหลายๆ รอบ โดยผลการคำนวณในแต่ละรอบนั้น จะถูกนำมารวมกันเพื่อสร้างการแจกแจงชักตัวอย่าง (sampling distribution) ของ parameter ของตัวแปรที่สนใจ

วิธี Bootstrap simulation สามารถแบ่งได้เป็น 2 แบบ ตามชนิดของการแจกแจงชักตัวอย่าง (sampling distribution) ของข้อมูลที่มีอยู่ คือ

- non-parametric bootstrap simulation
- parametric bootstrap simulation

Non-parametric bootstrap simulation

วิธี non-parametric bootstrap simulation เป็นวิธีที่ยืดหยุ่น เนื่องจาก

- ไม่ต้องกำหนดสมมุติฐานของการแจกแจงชักตัวอย่าง (sampling distribution)
- การแจกแจงชักตัวอย่าง (sampling distribution) สามารถเลือกใช้ได้จาก
 - = ข้อมูลจริงที่มีอยู่ (actual empirical data)
 - = การสุ่มซ้ำ (resample) จากข้อมูลจริงที่มีอยู่
 - = การหาบข้อมูลจริงที่มีอยู่ด้วยการแจกแจงแบบสะสม (cumulative distribution)

ตัวอย่าง การปนเปื้อน *Pseudomonas fluorescens* ในเนื้อสุกร โดยวิธี non-parametric bootstrap

คำถาม ต้องการประมาณ (estimate) ค่า average ที่เป็นตัวแทนความเข้มข้น *P.fluorescens* ที่ปนเปื้อนในเนื้อสุกรในกลุ่มเขตพื้นที่กรุงเทพมหานครกลาง ในรูปของการแจกแจงความน่าจะเป็น (probability distribution) แต่มีข้อมูลความเข้มข้น *P.fluorescens* เพียง 10 ตัวอย่างเนื้อสุกรที่สุ่มได้จากตลาดสดในกลุ่มเขตพื้นที่กรุงเทพมหานครกลาง

คำตอบ ในกรณีนี้ พบว่า แหล่งข้อมูลที่ได้เป็นข้อมูลจากการสังเกตทดลอง (empirical data) จากพื้นที่เป้าหมายจึงจัดว่าเป็นตัวแทนที่ดี (representative) ใช้จุดข้อมูล (data point) ในการสร้างการแจกแจงซ้ำตัวอย่าง

- ชนิด discrete uniform หรือ

- ชนิด cumulative

จากนั้นจึงสุ่ม n ตัวอย่าง (samples) แบบคืนกลับ (replacement) จำนวน n รอบ (iterations) ในที่นี้ คือ การสุ่ม 10 ตัวอย่าง จำนวน 10 รอบ ดังนั้นจะได้ bootstrap replicate จำนวนทั้งสิ้น 100 ค่า จากนั้นจึงคำนวณ mean และ standard deviation จาก bootstrap replicate ทั้ง 100 ค่านี้ (ตารางที่ 2.8)

ตารางที่ 2.8 Non-parametric bootstrap simulation model ที่ใช้ discrete uniform เป็นการแจกแจงซ้ำตัวอย่าง ซึ่งเมื่อจำลองเหตุการณ์จริงจากการแจกแจงซ้ำตัวอย่างก็จะได้ผลลัพธ์เป็นข้อมูล เพื่อใช้ในการกำหนดการแจกแจงซ้ำตัวอย่าง (sampling distribution) ที่ใช้ในการอธิบาย uncertainty ของ parameters (population mean: μ และ population standard deviation: σ)

	A	B
1	ความเข้มข้น <i>P.fluorescens</i> (cfu/g)	Non-parametric function
2	56	Duniform (A2:A11)
3	54	Duniform (A2:A11)
4	52	Duniform (A2:A11)
5	50	Duniform (A2:A11)
6	48	Duniform (A2:A11)
7	47	Duniform (A2:A11)
8	47	Duniform (A2:A11)
9	46	Duniform (A2:A11)
10	44	Duniform (A2:A11)
11	41	Duniform (A2:A11)
12	Replicate mean = AVERAGE (B2:B11)	
13	Replicate standard deviation = STDEV (B2:B11)	

ความเข้มข้น *P.fluorescens* ที่ปนเปื้อนในเนื้อสุกรในกลุ่มเขตพื้นที่กรุงเทพมหานคร ในรูปของการแจกแจงความน่าจะเป็น (probability distribution) โดยใช้ Non-parametric bootstrap simulation model ที่ใช้ discrete uniform เป็นการแจกแจงชักตัวอย่าง ซึ่งเมื่อจำลองเหตุการณ์จริงจากการแจกแจงชักตัวอย่างก็จะได้ผลลัพธ์เป็นข้อมูล เพื่อใช้ในการกำหนดการแจกแจงชักตัวอย่าง (sampling distribution) ที่ใช้ในการอธิบาย uncertainty ของ parameters (population mean: μ และ population standard deviation: σ)

ใช้สัญลักษณ์ $\underline{X}$ โดยใช้ข้อมูลความเข้มข้น *P.fluorescens* 10 ตัวอย่างเนื้อสุกรที่สุ่มได้จากตลาดสดในกลุ่มเขตพื้นที่กรุงเทพมหานคร ทำได้โดยการแทนค่าที่ได้จากตารางที่ 2.8 ลงใน second order distribution จะได้สมการ 2.7

$$\underline{X} = \text{Normal} \left(\text{Replicate } \mu = \text{AVERAGE} (B2 : B11) , \text{Replicate } \sigma = \text{STDEV} (B2 : B11) \right) \quad (2.7)$$

ตารางที่ 2.9 Non-parametric bootstrap simulation model ที่หาบ (fit) กับข้อมูลที่มีอยู่โดยใช้การแจกแจงสะสม (cumulative distribution) เป็นการแจกแจงชักตัวอย่าง ซึ่งเมื่อจำลองเหตุการณ์จริงจากการแจกแจงชักตัวอย่างก็จะได้ผลลัพธ์เป็นข้อมูล เพื่อใช้ในการกำหนดการแจกแจงชักตัวอย่าง (sampling distribution) ที่ใช้ในการอธิบาย uncertainty ของ parameters (population mean: μ และ population standard deviation: σ) โดย cumulative percentile = $\frac{i}{(n+1)}$ และ i คือ ลำดับตัวอย่าง

ความเข้มข้น *P.fluorescens* จากน้อยไปมาก n คือ ขนาดตัวอย่าง (sample size)

	A	B	C
1	ความเข้มข้น <i>P.fluorescens</i> (cfu/g)	Cumulative percentile	Non-parametric function
2	41	$\frac{1}{(10+1)} = 9\%$	Cumul (41,56,A2:A11,B2:B11)
3	44	$\frac{2}{(10+1)} = 18\%$	Cumul (41,56,A2:A11,B2:B11)
4	46	$\frac{3}{(10+1)} = 27\%$	Cumul (41,56,A2:A11,B2:B11)
5	47	$\frac{4}{(10+1)} = 36\%$	Cumul (41,56,A2:A11,B2:B11)
6	47	$\frac{5}{(10+1)} = 45\%$	Cumul (41,56,A2:A11,B2:B11)
7	48	$\frac{6}{(10+1)} = 55\%$	Cumul (41,56,A2:A11,B2:B11)
8	50	$\frac{7}{(10+1)} = 64\%$	Cumul (41,56,A2:A11,B2:B11)
9	52	$\frac{8}{(10+1)} = 73\%$	Cumul (41,56,A2:A11,B2:B11)
10	54	$\frac{9}{(10+1)} = 82\%$	Cumul (41,56,A2:A11,B2:B11)
11	56	$\frac{10}{(10+1)} = 91\%$	Cumul (41,56,A2:A11,B2:B11)
12	Replicate mean =	AVERAGE (C2:C11)	
13	Replicate standard deviation =	STDEV (C2:C11)	

ความเข้มข้น *P.fluorescens* ที่ปนเปื้อนในเนื้อสุกรในกลุ่มเขตพื้นที่กรุงเทพมหานคร ในรูปของการแจกแจงความน่าจะเป็น (probability distribution) โดยใช้ Non-parametric bootstrap simulation model ที่หาบ (fit) กับข้อมูลที่มีอยู่โดยใช้การแจกแจงสะสม (cumulative distribution) เป็นการแจกแจงชักตัวอย่าง ซึ่งเมื่อจำลองเหตุการณ์จริงจากการแจกแจงชักตัวอย่างก็จะได้ผลลัพธ์เป็นข้อมูล เพื่อใช้ในการกำหนดการแจกแจงชักตัวอย่าง (sampling distribution) ที่ใช้ในการอธิบาย uncertainty ของ parameters (population mean: μ และ population standard deviation: σ)

ใช้สัญลักษณ์ $\underline{X}$ โดยใช้ข้อมูลความเข้มข้น *P.fluorescens* 10 ตัวอย่างเนื้อสุกรที่สุ่มได้จากตลาดสดในกลุ่มเขตพื้นที่กรุงเทพมหานคร ทำได้โดยการแทนค่าที่ได้จากตารางที่ 2.9 ลงใน second order distribution จะได้สมการ (2.8)

$$\underline{X} = \text{Normal} \left(\text{Replicate } \mu = \text{AVERAGE} (C2 : C11) , \text{Replicate } \sigma = \text{STDEV} (C2 : C11) \right) (2.8)$$

Parametric bootstrap simulation

วิธี parametric bootstrap simulation

- การแจกแจงชักตัวอย่าง (sampling distribution) มีหรือเชื่อว่ามีลักษณะเป็นการแจกแจงทฤษฎี (theoretical distribution)

- การแจกแจงชักตัวอย่าง (sampling distribution) สามารถเลือกใช้ได้จาก

= การแจกแจง Normal

= การแจกแจง Poisson

= การแจกแจง Exponential

= การแจกแจง Binomial

ตารางที่ 2.10 Parametric bootstrap simulation model ที่ใช้การแจกแจง Normal เป็นการแจกแจงชักตัวอย่าง (sampling distribution) เพื่อจำลองเหตุการณ์จริง (simulation) แล้วได้ผลลัพธ์เป็นข้อมูลในการกำหนดการแจกแจงชักตัวอย่างที่ใช้ในการอธิบาย uncertainty ของ parameters (population mean : μ และ population standard deviation : σ)

	A	B
1	ความเข้มข้น <i>P.fluorescens</i> (cfu/g)	Parametric function
2	56	Normal (\$B\$12,\$B\$13)
3	54	Normal (\$B\$12,\$B\$13)
4	52	Normal (\$B\$12,\$B\$13)
5	50	Normal (\$B\$12,\$B\$13)
6	48	Normal (\$B\$12,\$B\$13)
7	47	Normal (\$B\$12,\$B\$13)
8	47	Normal (\$B\$12,\$B\$13)
9	46	Normal (\$B\$12,\$B\$13)
10	44	Normal (\$B\$12,\$B\$13)
11	41	Normal (\$B\$12,\$B\$13)
12	AVERAGE (B2:B11)	
13	STDEV (B2:B11)	
14	Replicate mean =	AVERAGE (C2:C11)
15	Replicate standard deviation =	STDEV (C2:C11)

ความเข้มข้น *P.fluorescens* ที่ปนเปื้อนในเนื้อสุกรในกลุ่มเขตพื้นที่กรุงเทพมหานครกลาง ในรูปของการแจกแจงความน่าจะเป็น (probability distribution) โดยใช้ Parametric bootstrap simulation model ที่ใช้การแจกแจง Normal เป็นการแจกแจงชักตัวอย่าง (sampling distribution) เพื่อจำลองเหตุการณ์จริง (simulation) แล้วได้ผลลัพธ์เป็นข้อมูลในการกำหนดการแจกแจงชักตัวอย่างที่ใช้ในการอธิบาย uncertainty ของ parameters (population mean : μ และ population standard deviation : σ)

ใช้สัญลักษณ์ $\underline{X}$ โดยใช้ข้อมูลความเข้มข้น *P.fluorescens* 10 ตัวอย่างเนื้อสุกรที่สุ่มได้จากตลาดสดในกลุ่มเขตพื้นที่กรุงเทพมหานครกลาง ทำได้โดยการแทนค่าที่ได้จากตารางที่ 2.10 ลงใน second order distribution จะได้สมการ (2.9)

$$\underline{X} = \text{Normal} \left(\text{Replicate } \mu = \text{AVERAGE} (C2 : C11) , \text{Replicate } \sigma = \text{STDEV} (C2 : C11) \right) (2.9)$$

2.2.3 ข้อมูลปริมาณน้อยและไม่เป็นตัวแทน (Few non-representative data)

ในกรณีที่ไม่มีข้อมูลเลย (absence of data) ข้อมูลจำนวนน้อยมาก (scarce) ข้อมูลไม่เป็นตัวแทน (non-representative) ให้พิจารณาเลือกใช้ความคิดเห็นผู้เชี่ยวชาญ (expert opinion) ข้อระวังที่ควรให้ความใส่ใจ คือ แหล่งของอคติ (source of bias) ความขัดแย้งกันของกลุ่มผู้เชี่ยวชาญ การจับประเด็นความคิดเห็นผู้เชี่ยวชาญ และการเลือกการแจกแจงที่เหมาะสม (OIE, 2004)

อคติ

(bias)

พฤติกรรมหลากหลายของมนุษย์สามารถนำไปสู่อคติของการตัดสินใจ (judgment) ในการประมาณค่า parameter ของการแจกแจง หรือ การเลือกการแจกแจงความน่าจะเป็นที่เหมาะสม เช่น

- ผู้เชี่ยวชาญมีแนวโน้มที่จะให้น้ำหนักกับ
 - = ข้อมูลที่นึกขึ้นได้
 - = ข้อมูลที่มีจำนวนน้อยและไม่เป็นตัวแทน แต่เป็นข้อมูลที่ผู้เชี่ยวชาญคุ้นเคยมากกว่า
- ผู้เชี่ยวชาญมีลักษณะที่
 - = มั่นใจมากเกินไป (overconfident)
 - = ประมาณความไม่รู้ (uncertainty) แคบเกินไป
 - = ไม่เปิดรับข้อมูลใหม่
 - = ให้ความคิดเห็นที่สอดคล้องกับผลงานหรือลักษณะงานของตน
 - = แสดงความรอบรู้ (knowledgeable) โดยกำหนดความไม่รู้แคบเกินไป
 - = แสดงความเห็นที่มีน้ำหนักน้อยอย่างต่อเนื่องเพื่อแสดงความสม่ำเสมอของความเห็น

ความขัดแย้งกันของกลุ่มผู้เชี่ยวชาญ

(Expert disagreement)

ในกรณีที่เกิดความขัดแย้งกันของกลุ่มผู้เชี่ยวชาญ แนวทางที่ดีที่สุด คือ การแยกพิจารณาผล (implication) จากความคิดเห็นของผู้เชี่ยวชาญเป็นรายบุคคล เพื่อให้สามารถสังเกตความแตกต่างและสามารถสรุปผลที่มีความเป็นไปได้มากกว่า (more likely) เมื่อผลสรุปที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญให้สรุปว่า ผลจากความคิดเห็นของกลุ่มผู้เชี่ยวชาญมีแก่นสาระเดียวกัน (robust) แม้ว่าจะมีความขัดแย้งกันของกลุ่มผู้เชี่ยวชาญ ในทางตรงกันข้าม แม้ว่าจะไม่มีความขัดแย้งกันของกลุ่มผู้เชี่ยวชาญ แต่กลับให้ผลการอนุมาน (inference) ที่แตกต่างกัน ควรพิจารณาตัดสินตามผู้เชี่ยวชาญที่มีความถูกต้องและความชัดเจน (authoritative) มากกว่า

การจับประเด็นความคิดเห็นผู้เชี่ยวชาญ

(Eliciting expert opinion)

การวิจัยทางจิตวิทยาได้แสดงให้เห็นว่า การตัดสินใจเลือกการแจกแจงความน่าจะเป็นที่เป็นนามธรรม (subjective probability judgment) อย่างถูกต้องนั้น ไม่สามารถจะเกิดขึ้นจากการถามเพียงอย่างเดียว วิธีการในการจัดประเด็นต้องอาศัยทั้ง การให้เหตุผล (reasoning) การใช้กุศโลบาย (heuristic) ซึ่งบ่อยครั้งมักจะก่อให้เกิดอคติในการตัดสินใจเลือกค่าประมาณ

วิธีการลดผลกระทบของอคติในการจัดประเด็นความคิดเห็นผู้เชี่ยวชาญ คือ การขอความคิดเห็นผู้เชี่ยวชาญในรูปแบบที่เป็น workshop ที่จัดขึ้นประมาณ 2-3 วัน โดยการรวบรวมผู้เชี่ยวชาญแต่ละคนให้ตอบแบบสอบถามรายบุคคลภายในห้อง นำคำตอบที่ไม่ระบุผู้เชี่ยวชาญรายบุคคลมาอภิปราย จะช่วยลดอคติลงได้ นำคำตอบทั้งหมดมาวิเคราะห์และนำเสนอตามด้วยการอภิปรายซ้ำ จากนั้นขอให้ผู้เชี่ยวชาญตอบแบบสอบถามซ้ำอีกครั้งภายใต้สภาพการเดิมในวันรุ่งขึ้น ทั้งนี้เพื่อให้ผู้เชี่ยวชาญมีเวลาเพียงพอในการใคร่ครวญประเด็นต่างๆ ที่ถูกหยิบยกขึ้นมาอภิปราย จึงเป็นการเปิดโอกาสให้ผู้เชี่ยวชาญได้ปรับแก้คำตอบในแบบสอบถาม

การเลือกการแจกแจงที่มีความเหมาะสมในการจำลองความคิดเห็นผู้เชี่ยวชาญ

(choosing an appropriate distribution to model expert opinion)

ตัวเลือกของการแจกแจงที่เหมาะสมจะขึ้นอยู่กับธรรมชาติของปัญหา ชนิดและจำนวนข้อมูลและความยากง่ายในการกำหนดเลือก parameter ตัวอย่างการแจกแจงความน่าจะเป็นที่แนะนำให้ใช้ในการจำลองความคิดเห็นผู้เชี่ยวชาญ ดังตารางที่ 2.11

ตารางที่ 2.11 ตัวอย่างการแจกแจงความน่าจะเป็นในการจำลองความคิดเห็นผู้เชี่ยวชาญ

การแจกแจง	Parameter ของการแจกแจง
Cumulative	$(minimum, maximum, \{x_i\}, \{p_i\})$
Discrete	$(\{x_i\}, \{p_i\})$
General	$(minimum, maximum, \{x_i\}, \{p_i\})$
PERT	(minimum, most likely, maximum)
Triangular	(minimum, most likely, maximum)
Uniform	(minimum, maximum)

2.2.4 ข้อมูลปริมาณมากและไม่เป็นตัวแทน (Abundant non-representative data)

วิธี Bayesian inference

วิธี Bayesian inference มีประโยชน์และใช้งานได้อย่างดีในกรณีที่ได้ข้อมูลสังเกตทดลองใหม่ๆ เพิ่มเติมขึ้นมา (newly acquired empirical data) เพื่อนำมารวมกับข้อมูลที่มีอยู่แล้ว (existing information) ซึ่งข้อมูลที่มีอยู่แล้วนั้น อาจจะมาจกแหล่งข้อมูลที่เป็นข้อมูลสังเกตทดลอง (empirical data) หรือ ความคิดเห็นผู้เชี่ยวชาญ (expert opinion) ก็ได้ ทั้งนี้เมื่อมีการรวบรวมข้อมูลทั้งปัจจุบันและที่ได้มาใหม่แล้ว ทำให้สามารถปรับปรุงค่าประมาณของ parameter ที่ใช้ในการอธิบายการแจกแจงความน่าจะเป็นได้ (OIE, 2004)

แม้ว่าวิธีการนี้จะได้รับการวิพากวิจารณ์ถึงความเป็นนามธรรม (subjective) อย่างไรก็ตาม วิธีการ classical statistics ที่แนะนำให้ใช้สำหรับกรณีที่ข้อมูลปริมาณน้อยและเป็นตัวแทน (few representative data) ก็มีความเป็นนามธรรมจากการเลือกชนิดการแจกแจง ช่วงความเชื่อมั่น (confidence interval) ค่า P (p-value) การยอมรับสมมติฐาน (statistical hypothesis) หรือ ข้อกำหนดพื้นฐานของการแจกแจงทางสถิติ ยกตัวอย่างเช่น กรณีค่า P ที่ใช้ในการประเมินหลักฐานการยอมรับหรือการปฏิเสธข้อสมมติฐานของการทดสอบทางสถิติ ซึ่งค่า P ไม่ควรนำมาใช้ในการตัดสินใจสุดท้ายเพื่อเลือกการแจกแจงความน่าจะเป็น นอกจากนี้ วิธี classical statistics ยังอาศัยการพิสูจน์เพื่อหักล้าง (contradict) ด้วยความน่าจะเป็นระดับสูง และ วิธี classical statistics ยังอาศัยการพิสูจน์เพื่อสรุปให้ได้ว่าข้อสมมติฐาน (hypothesis) ในการทดสอบทางสถิตินั้นมีโอกาสเป็นไปได้น้อยมาก (sufficiently unlikely) ค่า P อาจจะทำให้เข้าใจคลาดเคลื่อนได้ (deceptive) เพราะ ค่า P เกี่ยวข้องกับความน่าจะเป็นของข้อมูลที่ไม่ได้จากการสังเกตทดลอง (unobserved data) ซึ่งข้อมูลในลักษณะนี้มีโอกาสเกิดขึ้นได้น้อยอยู่แล้วเนื่องจากจะมีค่าที่น้อยมากกว่าหรือสูงมากกว่า (more extreme) ข้อมูลที่ได้จริง (observed data) ในทางตรงกันข้าม วิธี Bayesian inference กลับเป็นวิธีที่ปรับเปลี่ยนค่าประมาณความน่าจะเป็นเริ่มต้น (initial probability) ตามหลักฐานที่ปรากฏจริง

วิธี Bayesian inference เป็นวิธีการที่ขยายความต่อมาจาก Bayes's theorem และใช้งานได้ดี มีความยืดหยุ่น เหมาะกับการเรียนรู้ (learning) เพิ่มเติมตามระดับประสบการณ์ (experience) ที่เพิ่มขึ้นมา วิธีการนี้เอื้ออำนวยให้มีการปรับความรู้ปัจจุบันตามข้อมูลใหม่ที่ได้มาได้อย่างง่ายดายและสมเหตุสมผล วิธีการนี้แสดงให้เห็นถึงความเป็นนามธรรมอย่างชัดเจนและอธิบายกระบวนการเรียนรู้เชิงคณิตศาสตร์ (mathematical learning process) แม้ว่าขั้นตอนจะเริ่มต้นด้วยความคิดเห็นผู้เชี่ยวชาญที่เหมือนจะไม่มีน้ำหนักมากพอ (vague) แต่ขั้นตอนต่อมาจะมีการปรับเปลี่ยนค่าเมื่อมีข้อมูลใหม่เพิ่มขึ้นมา ดังนั้น วิธีนี้จะประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

1. การกำหนด [“prior estimate” หรือ “ค่าประมาณก่อน”] ของ parameter ในรูปการแจกแจงความน่าจะเป็น (probability distribution) ที่อธิบายความรู้ (หรือ อาจจะเป็นความไม่รู้) ก่อนที่จะได้ข้อมูลสังเกตทดลองในระยะเวลาต่อมา

การกำหนด “prior distribution” หรือ “การแจกแจงก่อน” นี้จะมีความยืดหยุ่นมาก เนื่องจากสามารถกำหนดตามจำนวนข้อมูลไม่มาก หรือ กระทั่งไม่ต้องมีข้อมูลเลย ซึ่งก็เท่ากับเป็นการกำหนดอย่างเป็นนามธรรมล้วน (purely subjective) เช่น กรณีของการอาศัยความคิดเห็นผู้เชี่ยวชาญ (expert opinion)

2. การหา [“likelihood function” หรือ “ฟังก์ชันที่เป็นไปได้”] ที่เหมาะสมสำหรับข้อมูลที่ได้จริง (observed data) likelihood function คำนวณความน่าจะเป็นของการได้ข้อมูลของค่าต่างๆของค่าประมาณต้น (prior estimate) ของ parameter รูปร่าง (shape) ของ likelihood function ทำหน้าที่ในการจุปริมาณข้อมูล ถ้าข้อมูลมีจำนวนน้อย รูปร่าง likelihood function ก็จะแผ่กว้างกว่าหรือมีความแปรปรวนมากกว่า ในขณะที่ข้อมูลมีจำนวนมาก รูปร่าง likelihood function ก็จะบีบแคบกว่า

3. การคำนวณ [“posterior estimate” หรือ “ค่าประมาณหลัง”] ของ parameter จากผลคูณ (multiplication) ของ “prior estimate” และ “likelihood function” แล้วนำผลคูณที่ได้มาปรับให้เป็นปกติ (normalize) เพื่อให้พื้นที่ใต้เส้นโค้ง (area under curve) รวมกันเท่ากับหนึ่ง

“posterior distribution” หรือ “การแจกแจงหลัง” เป็นการแจกแจงที่อธิบายระดับของความรู้ (state of knowledge) ของ parameter ภายหลังจากได้ข้อมูลใหม่เพิ่มเติมขึ้นมา เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบความเหมือนหรือความต่างระหว่าง การแจกแจงหลัง (posterior distribution) และ การแจกแจงก่อน (prior distribution) จึงเป็นไปได้ 2 กรณี คือ

= กรณีที่ 1 : posterior distribution มีลักษณะคล้ายกับ prior distribution แสดงว่า ข้อมูลใหม่เพิ่มเติมนั้นช่วยยืนยันความเชื่อ (pre-existing belief) หรือ ระดับความรู้ดั้งเดิมในตอนแรก (prior)

= กรณีที่ 2 : posterior distribution มีลักษณะที่แตกต่างกับ prior distribution อย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่า มีการได้รับข้อมูลใหม่ที่สำคัญ หรือ เป็นการลบล้าง (wane) ความเชื่อหรือระดับความรู้เดิมในตอนแรก

Bayesian inference มีประโยชน์ในการแสดงให้เห็นถึง (elucidate) อิทธิพลของสมมุติฐานก่อน (prior assumption) เมื่อเทียบกับข้อมูลใหม่ที่ได้มา

Bayesian inference ยังกำหนดปริมาณและคุณภาพของข้อมูลที่จำเป็นในอันจะสรุป (convergence) ให้ได้ posterior distribution ที่เป็นแบบเดียวกับ prior distribution

Bayesian inference เป็นวิธีที่โปร่งใส (transparent) ในการจำลอง (model) ความคิดเห็นผู้เชี่ยวชาญ ซึ่งมีบทบาทหลักอย่างเด่นชัดในการกำหนด prior distribution

prior distributions

(การแจกแจงก่อน)

“การแจกแจงก่อน” เป็นการกำหนดระดับของความรู้ (state of knowledge) ก่อนที่จะมีการสังเกตทดลองเกิดขึ้น ดังนั้น สถานการณ์หรือระดับของความรู้ที่มีอยู่จะเป็นเครื่องมือในการกำหนด “การแจกแจงก่อน”

Uninformed prior distribution

(การแจกแจงก่อนชนิดไม่มีข้อมูล)

“การแจกแจงก่อนชนิดไม่มีข้อมูล” เป็นการกำหนด “การแจกแจงก่อน” โดยไม่มีข้อมูลจากการสังเกตทดลองเลย ดังนั้น “การแจกแจงก่อนชนิดไม่มีข้อมูล” จึงกำหนดอย่างกว้างๆ เป็นพิสัย (range) ของค่าที่เป็นไปได้ทั้งหมด (all possible values) ในลักษณะ “ค่าต่ำสุด” (minimum) ถึง “ค่าสูงสุด” (maximum) ของ parameter ของ “การแจกแจงก่อนชนิดไม่มีข้อมูล”

ตัวอย่าง : ค่าที่เป็นไปได้ของความชุกของ *Pseudomonas fluorescens* ที่ปนเปื้อนในเนื้อสุกรในตลาดสดในเขตหนึ่ง ดังนั้น จึงอาจจะมีการกำหนดพิสัยของความชุกอย่างคร่าวๆ ดังนี้

= ค่าต่ำสุดที่เป็นไปได้ (min) ร้อยละ 0

= ค่าสูงสุดที่เป็นไปได้ (max) ร้อยละ 30

โดยโอกาสในการเกิดความเป็นไปได้มีค่าเท่ากันหมด (equally likely) ในพิสัย (range) ร้อยละ 0 ถึง ร้อยละ 30 (0.3) ดังนั้น ข้อมูลดังกล่าวสามารถกำหนดให้เป็น parameter ของ “การแจกแจงก่อนชนิดไม่มีข้อมูล” ชนิด Uniform prior distribution หรือ *Uniform(0,0.3)* ซึ่งการแจกแจงชนิด Uniform นี้ มี parameter ที่กำหนดแค่เพียงพิสัย (0-30%) ของการแจกแจงเท่านั้น จึงแทบจะไม่มีอิทธิพลใดๆ ต่อการคำนวณ “การแจกแจงหลัง” เลย

ในบางกรณี parameter ของ “การแจกแจงก่อนชนิดไม่มีข้อมูล” อาจจะถูกกำหนดแตกต่างกันออกไปได้หลายอย่าง

ตัวอย่าง : กำหนดให้ค่าเฉลี่ยจำนวนชิ้นเนื้อสุกรที่ปนเปื้อนด้วย *Pseudomonas fluorescens* ต่อวัน มี “การแจกแจงก่อน” อยู่ใน [“กระบวนการ Poisson” หรือ Poisson process] ซึ่งมี parameter คือ λ (lambda) โดยมีข้อสมมุติฐานหรือข้อกำหนดพื้นฐานสำคัญ ดังนี้

= การปนเปื้อนชิ้นเนื้อสุกรในแต่ละวันเป็นอิสระต่อกัน² (independent)

= โอกาสปนเปื้อน *P. fluorescens* คงที่ (constant) ต่อเนื่อง (continuous) ตลอดทั้งวัน

ถ้ากำหนดให้ค่าเฉลี่ยจำนวนชิ้นเนื้อสุกรต่อวันสามารถกำหนดให้เป็น $\frac{1}{\beta}$ โดย β^3 เป็นช่วงเวลาเฉลี่ยระหว่างชิ้นเนื้อสุกรแต่ละชิ้นที่เกิดการปนเปื้อน (mean time interval between event)

จากนั้นจึงกำหนด “การแจกแจงก่อน” ของ parameter $\frac{1}{\lambda}$ สำหรับ λ (เช่นเดียวกับที่ กำหนด “การแจกแจงก่อน” ของ parameter $\frac{1}{\beta}$ สำหรับ β)

และด้วยคุณสมบัติพื้นฐานที่ $\beta = \frac{1}{\lambda}$ (เช่นเดียวกับที่ $\lambda = \frac{1}{\beta}$) ดังนั้น จึงกล่าวได้ว่า β เป็น prior ของ λ (เช่นเดียวกับที่ λ เป็น prior ของ β)

² การปนเปื้อนที่เป็นอิสระต่อกัน (independent) : จำนวนชิ้นเนื้อสุกรที่ปนเปื้อนของเมื่อวานนี้ (yesterday) ไม่ว่าจะมากหรือน้อยอย่างไร ก็จะไม่มียิทธิพลต่อจำนวนชิ้นเนื้อสุกรที่ปนเปื้อนของวันนี้ (today) แต่อย่างใด

³ $\lambda = \frac{1}{\beta}$ หรือ $\beta = \frac{1}{\lambda}$

Informed prior distribution

(การแจกแจงก่อนชนิดมีข้อมูล)

“การแจกแจงก่อนชนิดมีข้อมูล” เป็นการกำหนด “การแจกแจงก่อน” ได้ทั้งจาก กรณีไม่มีข้อมูล (subjective) หรือ กรณีข้อมูลจากการสังเกตทดลอง (empirical data) ก็ได้

“conjugate prior distribution” หมายถึง “การแจกแจงก่อน” ที่มีลักษณะหรือรูปแบบของการแจกแจง (functional form) ที่มีเหมือนการแจกแจงของ likelihood function ดังนั้นแล้ว ก็จะทำให้ “การแจกแจงหลัง” มีลักษณะ/รูปแบบของการแจกแจง (functional form) ที่มีเหมือนกันกับ “การแจกแจงก่อน”

ลักษณะ/รูปแบบของการแจกแจงที่เหมือนกัน (functional form) ของทั้ง “การแจกแจงก่อน” และ “likelihood function” จึงช่วยหลีกเลี่ยงการสร้างแบบจำลองผลคูณของ “การแจกแจงก่อน” และ “likelihood function” จัดเป็นความสะดวกสบายในการคำนวณหา “การแจกแจงหลัง” เป็นอย่างมาก ดังนั้น “conjugate prior distribution” จึงเรียกได้อีกอย่างว่า “convenience prior distribution” ดังตารางที่ 2.12

ตารางที่ 2.12 ตัวอย่างการแจกแจง “conjugate prior” “likelihood function” และผลที่ได้เป็น “การแจกแจงหลัง” ที่มีลักษณะ/รูปแบบของการแจกแจงที่เหมือนกัน (same functional form)

Parameter	Conjugate prior	Likelihood function	Posterior
ความชุก (Prevalence)	= Uninformed prior : - $Uniform(0,1)$ หรือ - $Beta(1,1)$ = Informed prior - $Beta(\alpha_1, \alpha_2)$ $\alpha_1 : 1 + s_1$ $\alpha_2 : 1 + [n_1 - s_1]$ n_1 : ประวัติจำนวนตัวอย่าง s_1 : ประวัติจำนวนผลบวก $[n_1 - s_1]$: ประวัติจำนวนผลลบ	Binomial	$= Beta(1+s_1, 1 + [n_1 - s_1])$ หรือ $= Beta(\alpha_1, \alpha_2)$ n_1 : จำนวนตัวอย่าง s_1 : จำนวนผลบวก (positive) $[n_1 - s_1]$: จำนวนผลลบ (negative)
ค่าเฉลี่ยจำนวนสิ่งที่สนใจ ต่อหนึ่งช่วงระยะเวลา (mean No. of events per unit interval : λ)	= Uninformed prior : - $Prior(\lambda) \propto \frac{1}{\lambda}$ = Informed prior - $Gamma(a, b)$ a : จำนวนเหตุการณ์ที่เกิด b : เวลาระหว่างเหตุการณ์ที่เกิด	Poisson	$= Gamma\left(x, \frac{1}{t}\right)$ $= Gamma\left(a + x, \frac{b}{1 + b t}\right)$ x : จำนวนเหตุการณ์ที่เกิดขึ้น t : เวลาระหว่างเหตุการณ์ที่เกิดขึ้น

Likelihood functions

(ฟังก์ชันที่เป็นไปได้)

Likelihood function คือ ความน่าจะเป็น (probability) หรือ ความเป็นไปได้ (likelihood) ของการได้ (observe) prior estimate โดยรูปร่างของ likelihood function ที่ควรจะเป็นนั้น จะสอดคล้องกับการได้ค่า prior estimate ที่ถูกกำหนดไว้ในขั้นตอนแรกเริ่ม

ตัวอย่าง : เก็บตัวอย่างเนื้อสุกรในตลาดสดในเขตหนึ่งจำนวน n ชิ้น เมื่อวิเคราะห์การปนเปื้อน *Pseudomonas fluorescens* พบว่า มี s ชิ้นที่ปนเปื้อน ดังนั้น likelihood function ก็คือ ความเป็นไปได้ (likelihood) ที่จะมีเนื้อสุกรปนเปื้อน s ชิ้น เมื่อกำหนดให้ prior estimate คือ ความชุก (prevalence) ของการปนเปื้อน p ดังนั้น สามารถใช้ binomial distribution⁴ function ใน Excel เพื่อคำนวณหา likelihood function ของการได้เนื้อสุกรปนเปื้อน s ชิ้น (สมการ 2.10)

$$P(X = s) = \text{BINOMDIST}(s, n, p \times Se + (1 - p) \times (1 - Sp), 0) \quad (2.10)$$

เมื่อ

p (prevalence) คือ ความชุกของการปนเปื้อน *P. fluorescens*

n (sample size) คือ จำนวนตัวอย่างที่ทดสอบ

s (positive) คือ จำนวนตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ปนเปื้อน

Se (sensitivity) คือ ความไวของวิธีวิเคราะห์การปนเปื้อน

Sp (specificity) คือ ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์การปนเปื้อน

มี function ของการแจกแจงความน่าจะเป็นอีกหลากหลายที่ใช้ในการกำหนด likelihood function ตามสถานการณ์หรือตัวแปรที่สนใจ เช่น การแจกแจง Poisson, hypergeometric หรือ negative binomial

Posterior distributions

(การแจกแจงหลัง)

Posterior distribution เป็นค่าประมาณ parameter ที่ได้รับการปรับใหม่ (revised) ซึ่งคำนวณได้จากผลคูณ (multiplication) ของ “prior estimate” และ “likelihood function” เนื่องจาก ความน่าจะเป็น (ที่คำนวณได้จากผลคูณ) เป็นอิสระต่อกัน ดังนั้น เมื่อนำความน่าจะเป็นที่ได้ของผลคูณทั้งหมดที่ได้มารวมกันจึงอาจไม่ได้หนึ่ง จึงจำเป็นต้องปรับให้เป็นปกติ (normalize) เพื่อให้พื้นที่ใต้เส้นโค้ง (area under curve) รวมกันเท่ากับหนึ่ง โดยใช้

○ *Discrete* ($\{x_i\}, \{p_i\}$) สำหรับ discrete distribution

○ *General* (*minimum, maximum*, $\{x_i\}, \{p_i\}$) สำหรับ continuous distribution

⁴ ในที่นี้ binomial distribution เป็นการแจกแจงความน่าจะเป็นของจำนวนชิ้นเนื้อสุกรที่ปนเปื้อน (x)

ตัวอย่าง ต้องการทราบความชุกของการปนเปื้อน *Pseudomonas fluorescens* ในเนื้อสุกรในตลาดสดแห่งหนึ่งเพื่อเป็นตัวแทนของความชุกของการปนเปื้อนในเขตหนึ่งซึ่งเป็นเขตที่มีตลาดสดจำนวนมาก โดยใช้ Bayesian inference

กรณี 1 Uninformed prior : ไม่มีข้อมูลความชุกของ *P.fluorescens* มาก่อนเลย (ตารางที่ 2.13)

กำหนดให้เก็บตัวอย่างเนื้อสุกรจำนวน 100 ชิ้น วิเคราะห์แล้วให้ผลบวกจำนวน 10 ชิ้น

คำตอบ กรณี 1

เนื่องจาก ไม่มีข้อมูลความชุกมาก่อนเลย ดังนั้น จึงได้พิสัยของความชุกอย่างคร่าวๆ ดังนี้

= ค่าต่ำสุดที่เป็นไปได้ (min) ร้อยละ 0

= ค่าสูงสุดที่เป็นไปได้ (max) ร้อยละ 100

โดยโอกาสในการเกิดความเป็นไปได้มีค่าเท่ากันหมด (equally likely) ในพิสัย (range) ร้อยละ 0 (0) ถึง ร้อยละ 100 (1) ดังนั้น ข้อมูลดังกล่าวสามารถกำหนดให้เป็น parameter ของ “การแจกแจงก่อน ชนิดไม่มีข้อมูล” ชนิด Uniform prior distribution หรือ *Uniform(0,1)* ซึ่งการแจกแจงชนิด Uniform นี้ มี parameter ที่กำหนดแต่เพียงพิสัย (0-100%) ของการแจกแจงเท่านั้น จึงไม่มีอิทธิพลใดๆ ต่อการคำนวณ “การแจกแจงหลัง” เลย

โดยเหตุบังเอิญว่า *Uniform(0,1)* มีการแจกแจงที่เหมือนกัน (identical) กับ *Beta(1,1)* ด้วย ซึ่งการแจกแจง Beta เป็นการแจกแจงที่นิยมใช้กับความชุก (prevalence) ซึ่งตรงกับความต้องการของโจทย์ Parameter ของ Beta distribution ประกอบด้วย alpha 1 (α_1) และ alpha 2 (α_2) สามารถเขียนได้ ดังนี้

Beta (alpha 1, alpha 2) หรือ Beta (α_1, α_2)

โดยที่

alpha 1 (α_1) คือ จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก (positive) หรือ มีลักษณะที่สนใจ (success : s) เช่น จำนวนชิ้นเนื้อสุกรที่มีการปนเปื้อนด้วย *P.fluorescens*

alpha 2 (α_2) คือ จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบ (negative) หรือ ขาดลักษณะที่สนใจ (failure) เช่น จำนวนชิ้นเนื้อสุกรปลอดการปนเปื้อนด้วย *P.fluorescens* หรือ จำนวนตัวอย่าง (n) ที่หักด้วยจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก (s) หรือ $n-s$ ก็ได้

ดังนั้น จำนวนตัวอย่าง (n) หรือ sample size จึงเท่ากับ alpha 1 + alpha 2 หรือ ($\alpha_1 + \alpha_2$) นั่นเอง หรือ $n = \alpha_1 + \alpha_2$

การประมาณค่าความชุก (prevalence) โดยเทียบกับตารางที่ 12

Prior distribution : $Beta(1,1)$ ซึ่งเหมือนกับ $Uniform(0,1)$

Likelihood function : Binomial distribution function

Posterior distribution : $Beta(1+s, 1+[n-s])$

n : จำนวนตัวอย่างที่เก็บเพื่อวิเคราะห์หาความชุก (sample size)

s : จำนวนตัวอย่างที่ปนเปื้อน หรือ ผลบวก (positive samples)

$[n-s]$: จำนวนตัวอย่างที่ปลอดปนเปื้อน หรือ ผลลบ (negative samples)

ข้อมูลที่ได้ คือ $n = 100$ ตัวอย่าง และ $s = 10$ ตัวอย่าง

ดังนั้น จึงได้

Posterior distribution = $Beta(1+10, 1+[100-10])$

= $Beta(1+10, 1+90)$

= $Beta(11, 91)$

ดังนั้น

การแจกแจงความน่าจะเป็น (probability distribution) ของความชุกของการปนเปื้อน *Pseudomonas fluorescens* ในเนื้อสุกรในตลาดสดแห่งหนึ่งเป็นตัวแทนของความชุกของการปนเปื้อนในเขตหนึ่งซึ่งเป็นเขตที่มีตลาดสดจำนวนมาก โดยการใช้ Bayesian inference

ในกรณีที่ Uninformed prior : ไม่มีข้อมูลความชุกของ *P.fluorescens* มาก่อนเลย กำหนดให้เก็บตัวอย่างเนื้อสุกรจำนวน 100 ชิ้น วิเคราะห์แล้วให้ผลบวกจำนวน 10 ชิ้น

= $Beta(11, 91)$

ตารางที่ 2.13 Uninformed prior

Parameter	Conjugate prior	Likelihood function	Posterior
ความชุก (Prevalence)	= $Uniform(0,1)$ หรือ = $Beta(1,1)$	Binomial	= $Beta(1+s, 1+[n-s])$ s : จำนวนผลบวก (positive) $[n-s]$: จำนวนผลลบ (negative) ----- = $Beta(1+10, 1+[100-10])$ = $Beta(1+10, 1+90)$ = $Beta(11, 91)$ s : 10 ตัวอย่าง $[n-s]$: 100 - 10 ตัวอย่าง

กรณี 2 Informed prior : มีข้อมูลความชุกของ *P.fluorescens* มาก่อน (ตารางที่ 2.14)

กำหนดให้

1. ประวัติ : การเก็บตัวอย่างเนื้อสุกรจำนวน 100 ชิ้น วิเคราะห์ให้ผลบวกจำนวน 10 ชิ้น
2. ปัจจุบัน : การเก็บตัวอย่างเนื้อสุกรเพิ่มจำนวน 200 ชิ้น วิเคราะห์ให้ผลบวกเพิ่มอีก 20 ชิ้น

คำตอบ กรณี 2

1. Informed prior distribution (การแจกแจงก่อนชนิดมีข้อมูล) คือ การเก็บตัวอย่างเนื้อสุกรจำนวน 100 ชิ้น วิเคราะห์แล้วให้ผลบวกจำนวน 10 ชิ้น

2. Likelihood function (ฟังก์ชันที่เป็นไปได้) คือ การเก็บตัวอย่างเนื้อสุกรจำนวน 100 ชิ้น วิเคราะห์แล้วให้ผลบวกจำนวน 10 ชิ้น

การประมาณค่าความชุก (prevalence) โดยเทียบเคียงกับตารางที่

Prior distribution : $Beta(1 + s_1, 1 + [n_1 - s_1])$

n_1 : ประวัติจำนวนตัวอย่างที่วิเคราะห์หาความชุก (prior sample size)

s_1 : ประวัติจำนวนตัวอย่างที่ปนเปื้อน (prior positive samples)

$[n_1 - s_1]$: ประวัติจำนวนตัวอย่างที่ปลอดปนเปื้อน (prior negative samples)

ข้อมูลที่ได้ คือ $n = 100$ ตัวอย่าง และ $s = 10$ ตัวอย่าง

ดังนั้น จึงได้

$$= Beta(1+10, 1+[100-10])$$

$$= Beta(1+10, 1+90)$$

$$= Beta(11, 91)$$

$$= Beta(\alpha_1, \alpha_2)$$

ดังนั้น $\alpha_1 = 11$ และ $\alpha_2 = 91$

Likelihood function : Binomial distribution function

Posterior distribution : $= Beta(\alpha_1 + s_2, \alpha_2 + [n_2 - s_2])$

$$\alpha_1 : 1 + s_1 = 11$$

$$\alpha_2 : 1 + [n_1 - s_1] = 91$$

n_2 : จำนวนตัวอย่างปัจจุบันวิเคราะห์ความชุก
(present sample size)

s_2 : จำนวนตัวอย่างปัจจุบันที่ปนเปื้อน
(present positive samples)

$[n_2 - s_2]$: จำนวนตัวอย่างปัจจุบันที่ปลอดปนเปื้อน
(present negative samples)

ข้อมูลที่ได้ คือ $n_2 = 200$ ตัวอย่าง และ $s_2 = 20$ ตัวอย่าง

ดังนั้น จึงได้

$$\begin{aligned}
 &= \text{Beta}(11+20, 91+[200-20]) \\
 &= \text{Beta}(11+20, 91+180) \\
 &= \text{Beta}(31, 271)
 \end{aligned}$$

ดังนั้น

การแจกแจงความน่าจะเป็น (probability distribution) ของความชุกของการปนเปื้อน *Pseudomonas fluorescens* ในเนื้อสุกรในตลาดสดแห่งนี้เป็นตัวแทนของความชุกของการปนเปื้อนในเขตหนึ่งซึ่งเป็นเขตที่มีตลาดสดจำนวนมาก โดยการใช้ Bayesian inference

ในกรณีที่ Informed prior : มีข้อมูลความชุกของ *P.fluorescens* มาก่อน โดยกำหนดให้

1. ประวัติ : การเก็บตัวอย่างเนื้อสุกรจำนวน 100 ชิ้น วิเคราะห์ให้ผลบวกจำนวน 10 ชิ้น
 2. ปัจจุบัน : การเก็บตัวอย่างเนื้อสุกรเพิ่มจำนวน 200 ชิ้น วิเคราะห์ให้ผลบวกเพิ่มอีก 20 ชิ้น
- $$= \text{Beta}(31, 271)$$

ตารางที่ 2.14 Informed prior

Parameter	Conjugate prior	Likelihood function	Posterior
ความชุก (Prevalence)	- $\text{Beta}(\alpha_1, \alpha_2)$	Binomial	$= \text{Beta}(\alpha_1+s_2, \alpha_2+[n_2-s_2])$
	$\alpha_1 : 1 + s_1$		$\alpha_1 : 1 + s_1$
	$\alpha_2 : 1 + [n_1-s_1]$		$\alpha_2 : 1 + [n_1-s_1]$
	$n_1 : \text{ประวัติจำนวนตัวอย่าง}$		$n_2 : \text{จำนวนตัวอย่างปัจจุบัน}$
	$s_1 : \text{ประวัติจำนวนผลบวก}$		$s_2 : \text{จำนวนผลบวกปัจจุบัน}$
	$[n_1-s_1] : \text{ประวัติจำนวนผลลบ}$		$[n_2-s_2] : \text{จำนวนผลลบปัจจุบัน}$
	-----		-----
	$= \text{Beta}(1+10, 1 + [100-10])$ หรือ		$= \text{Beta}(11+ 20, 91+ [200-20])$ หรือ
	$= \text{Beta}(11,91)$		$= \text{Beta}(31,271)$
	$n_1 : 100$		$\alpha_1 : 11$
	$s_1 : 10$		$\alpha_2 : 91$
	$[n_1-s_1] : [200-20]$		$n_2 : 200$
	$\alpha_1 = 11$		$s_2 : 20$
	$\alpha_2 = 91$		$[n_2-s_2] : [200-20]$

2.2.5 ผลการแจกแจงความน่าจะเป็นการเสื่อมของเนื้อสุกร (Probability distribution of pork spoilage)

การแบ่งพื้นที่ของกรุงเทพมหานครในการสุ่มเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์การปนเปื้อนแบคทีเรียเสื่อม ซึ่งครอบคลุมพื้นที่กรุงเทพที่มีการแบ่งส่วนราชการกรุงเทพมหานครได้ 6 กลุ่มเขตพื้นที่ ดังนี้

1. กรุงเทพมหานครกลาง (Central Bangkok) ประกอบด้วย เขตพระนคร เขตสัมพันธวงศ์ เขตห้วยขวาง และเขตดินแดง
2. กรุงเทพมหานครตะวันออก (East Bangkok) ประกอบด้วย เขตบางกะปิ เขตสะพานสูง เขตบึงกุ่ม เขตคันนายาว เขตลาดกระบัง เขตมีนบุรี เขตหนองจอก และเขตคลองสามวา
3. กรุงเทพมหานครเหนือ (North Bangkok) ประกอบด้วย เขตจตุจักร เขตบางซื่อ เขตลาดพร้าว เขตหลักสี่ เขตดอนเมือง เขตสายไหม และ เขตบางเขน
4. กรุงเทพมหานครใต้ (South Bangkok) ประกอบด้วย เขตปทุมวัน เขตบางรัก เขตสาทร เขตบางคอแหลม เขตยานนาวา เขตคลองเตย เขตวัฒนา เขตพระโขนง เขตสวนหลวง เขตบางนา และ เขตประเวศ
5. ธนบุรีเหนือ (Upper thonburi) ประกอบด้วย เขตธนบุรี เขตคลองสาน เขตจอมทอง เขตบางกอกใหญ่ เขตบางกอกน้อย เขตบางพลัด เขตตลิ่งชัน และ เขตทวีวัฒนา
6. ธนบุรีใต้ (Lower thonburi) ประกอบด้วย เขตภาษีเจริญ เขตบางแค เขตหนองแขม เขตบางขุนเทียน เขตบางบอน เขตราษฎร์บูรณะ และ เขตทุ่งครุ

สัดส่วนของจำนวนตัวอย่างที่เก็บ พิจารณาเน้นให้มีสัดส่วนที่สอดคล้องกับจำนวนประชากรที่อาศัยในกลุ่มเขตพื้นที่ และทุกกลุ่มเขตพื้นที่มีจำนวนตัวอย่างเกิน 30 ตัวอย่าง เพื่อให้ผลการวิเคราะห์เป็นตัวแทนที่เหมาะสมของแต่ละกลุ่มเขตพื้นที่ (ภาพที่ 2.7 และ ตารางที่ 2.15)



ภาพที่ 2.7 การเก็บตัวอย่างตามการแบ่งพื้นที่ส่วนราชการกรุงเทพมหานครเนื้อสุกร 325 ตัวอย่าง

ตารางที่ 2.15 จำนวนตัวอย่างที่เก็บได้แบ่งตามความหนาแน่นประชากรและตามเขตพื้นที่

กลุ่มเขตพื้นที่	จำนวนตลาด	จำนวนตัวอย่าง
1. กรุงเทพมหานคร (C)	2	48
2. กรุงเทพฯนอก (E)	3	70
3. กรุงเทพฯเหนือ (N)	3	48
4. กรุงเทพฯใต้ (S)	2	57
5. ชนบุรีเหนือ (U)	3	54
6. ชนบุรีใต้ (L)	4	48
รวม	17	325

แบคทีเรียเสีย (spoilage bacteria) ที่วิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ คือ *Pseudomonas fluorescens* และ *Klebsiella* spp. ผลการวิเคราะห์ทำให้ได้ข้อมูล 2 ลักษณะ คือ ระดับการปนเปื้อน (contamination) และ ความชุกของการปนเปื้อน (prevalence)

การแจกแจงความน่าจะเป็นการปนเปื้อน

(probability distribution of spoilage contamination)

การแจกแจงความน่าจะเป็นการปนเปื้อน (contamination) แบคทีเรียเสียเนื้อสุกร เลือกใช้ Parametric distribution ชนิด LogNormal distribution เนื่องจาก มีความเหมาะสมกับลักษณะข้อมูลที่มีปริมาณมากและเป็นตัวแทนของประชากร (abundant representative) เนื่องจาก มีจำนวนตัวอย่างมากกว่า 30 ตัวอย่าง/กลุ่มเขตพื้นที่ โดย LogNormal distribution ต้องการ 2 parameters ในรูปแบบ (notation) ดังสมการ (2.11)

$$\text{spoilage distribution (concentration)} = \text{Normal}(\mu, \sigma) \quad (2.11)$$

ประกอบด้วย

1. μ (average) โดยมากจะเป็น mean มีหน่วยเป็น log cfu/g ซึ่งในที่นี้คำนวณโดยใช้ค่าเฉลี่ยเรขาคณิต (Geometric mean) ของระดับการปนเปื้อนเฉพาะที่ให้ผลบวก (positive samples) เนื่องจาก
 - ก. ค่าความเข้มข้นของจุลินทรีย์ที่วิเคราะห์เชิงปริมาณโดยวิธี Direct Plate Count จะมีการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นในลักษณะเป็นเลขยกกำลัง (exponential)
 - ข. หากมีระดับการปนเปื้อนบางตัวอย่างที่แตกต่างจากตัวอย่างอื่นในกลุ่ม เช่น ระดับการปนเปื้อนสูงกว่า หรือ ต่ำกว่าตัวอย่างอื่นในกลุ่ม หากใช้ค่าเฉลี่ยเลขคณิต (arithmetic mean) ก็จะทำให้ได้ค่าเฉลี่ยที่กระโดดหรือดึงออกจากตัวอย่างอื่นในกลุ่มไปมาก ดังนั้นการคำนวณเป็นค่าเฉลี่ยเลขคณิต (arithmetic mean) จึงไม่เหมาะสมและไม่เป็นตัวแทนที่ดีของกลุ่มตัวอย่างที่วิเคราะห์
2. σ (Standard deviation : SD) มีหน่วยเป็น log cfu/g เช่นเดียวกัน แต่ในบางกรณีอาจไม่สามารถคำนวณ SD ได้ เนื่องจาก มีเพียงตัวอย่างเดียวที่ให้ผลบวก

ผลการวิเคราะห์ parameter ของ LogNormal distribution ที่เป็นการแจกแจงความน่าจะเป็น การเสื่อมของเนื้อสุกรในกลุ่มเขตพื้นที่ของกรุงเทพมหานครสำหรับความเข้มข้น (concentration) ของ *Pseudomonas fluorescens* ดังตารางที่ 2.12 และ ภาพที่ 2.7 ตามลำดับ และ *Klebsiella* spp. ดัง ตารางที่ 2.16-2.17 ตามลำดับ

ตารางที่ 2.16 การแจกแจงความน่าจะเป็นการเสื่อมของเนื้อสุกร (spoilage distribution) ในกลุ่มเขตพื้นที่กรุงเทพมหานครสำหรับความเข้มข้น (concentration) ของ *Pseudomonas fluorescens*

กลุ่มเขตพื้นที่	การแจกแจงความน่าจะเป็นความเข้มข้นการเสื่อมเนื้อสุกร			
	ตลาดที่ 1	ตลาดที่ 2	ตลาดที่ 3	ตลาดที่ 4
กรุงเทพกลาง	LogNorm (6.00,0)*	LogNorm (7.00,0)	N/A**	N/A
กรุงเทพออก	LogNorm (5.50,0.71)	LogNorm (5.24,0.34)	LogNorm (5.89,0.96)	N/A
กรุงเทพเหนือ	LogNorm (5.00,0)	LogNorm (5.70,0)	LogNorm (6.76,0.69)	N/A
กรุงเทพใต้	LogNorm (6.19,1.00)	LogNorm (5.74,0.89)	N/A	N/A
ธนบุรีเหนือ	0	LogNorm (5.30,0.43)	LogNorm (7.00,0)	N/A
ธนบุรีใต้	LogNorm (4.00,0)	LogNorm (4.37,2.29)	LogNorm (7.66,1.33)	LogNorm (7.00,0)

* LogNormal (μ, σ) : หน่วย log cfu/g

** N/A ไม่มีการเก็บตัวอย่าง

ตารางที่ 2.17 การแจกแจงความน่าจะเป็นการเสื่อมของเนื้อสุกร (spoilage distribution) ในกลุ่มเขตพื้นที่ของกรุงเทพมหานครสำหรับความเข้มข้น (concentration) *Klebsiella* spp.

กลุ่มเขตพื้นที่	การแจกแจงความน่าจะเป็นความเข้มข้นการเสื่อมเนื้อสุกร (log cfu/g)			
	ตลาดที่ 1	ตลาดที่ 2	ตลาดที่ 3	ตลาดที่ 4
กรุงเทพกลาง	LogNorm (5.43,0.57)*	LogNorm (4.65,0.70)	N/A**	N/A
กรุงเทพออก	LogNorm (5.05,0.82)	LogNorm (5.14,0.87)	LogNorm (5.54,0.76)	N/A
กรุงเทพเหนือ	LogNorm (4.71,0.48)	LogNorm (6.72,0.86)	LogNorm (4.56,0.52)	N/A
กรุงเทพใต้	LogNorm (4.95,0.87)	LogNorm (6.49,0.72)	N/A	N/A
ธนบุรีเหนือ	LogNorm (4.72,0.03)	LogNorm (4.46,0.74)	LogNorm (4.46,0.62)	N/A
ธนบุรีใต้	LogNorm (5.17,0.68)	LogNorm (3.59,1.14)	LogNorm (5.03,0.78)	LogNorm (4.38,0.43)

* LogNormal (μ, σ) : หน่วย log cfu/g

** N/A ไม่มีการเก็บตัวอย่าง

การแจกแจงความน่าจะเป็นความชุก

(probability distribution of spoilage prevalence)

การแจกแจงความน่าจะเป็นความชุก (prevalence) ของการปนเปื้อนแบคทีเรียเสื่อมเนื้อสุกร เลือกใช้วิธี Bayesian inference ชนิด Beta distribution เนื่องจาก

1. เหมาะสมกับลักษณะข้อมูลที่มีปริมาณน้อยและเป็นตัวแทนของประชากร (few representative) เนื่องจาก การคำนวณความชุก จะคำนวณจากจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ตรวจวิเคราะห์

2. สามารถ update หรือเพิ่มเติมข้อมูลในการวิเคราะห์รอบที่ 2 จากข้อมูลพื้นฐานในรอบการเก็บตัวอย่างที่ 1 โดย

- ข้อมูลการวิเคราะห์ รอบที่ 1 เป็น การแจกแจงก่อน (prior distribution)
- ข้อมูลการวิเคราะห์ รอบที่ 2 เป็น ฟังก์ชันที่เป็นไปได้ (likelihood function)

โดย Beta distribution ต้องการ 2 parameters ในรูปแบบ (notation) ดังสมการ (2.12)

$$\text{spoilage distribution (prevalence)} = \text{Beta}(\alpha_1, \alpha_2) = \text{Beta}(1+s, 1+[n-s]) \quad (2.12)$$

ประกอบด้วย

1. α_1 คือ $1 + s$
2. α_2 คือ $1 + [n - s]$

- n : จำนวนตัวอย่างที่วิเคราะห์หาความชุก (sample size)
 s : จำนวนตัวอย่างที่ปนเปื้อน (positive samples)
 $[n - s]$: จำนวนตัวอย่างที่ปลอดปนเปื้อน (negative samples)

ผลการวิเคราะห์ parameter ของ Beta distribution ที่เป็นการแจกแจงความน่าจะเป็นการเสื่อมของเนื้อสุกรในกลุ่มเขตพื้นที่ของกรุงเทพมหานครสำหรับความชุก (prevalence) ของ *Pseudomonas fluorescens* และ *Klebsiella* spp. ดังตารางที่ 2.18-2.19 ตามลำดับ

ตารางที่ 2.18 การแจกแจงความน่าจะเป็นการเสื่อมของเนื้อสุกร (spoilage distribution) ในกลุ่มเขตพื้นที่กรุงเทพมหานครสำหรับความชุก (prevalence) *Pseudomonas fluorescens*

กลุ่มเขตพื้นที่	การแจกแจงความน่าจะเป็นความชุกของการเสื่อมเนื้อสุกร (ร้อยละ)			
	ตลาดที่ 1	ตลาดที่ 2	ตลาดที่ 3	ตลาดที่ 4
กรุงเทพกลาง	Beta(2,28)* = 7%	Beta(2,20) = 9%	N/A**	N/A
กรุงเทพออก	Beta(3,11) = 21%	Beta(3,9) = 25%	Beta(17,33) = 34%	N/A
กรุงเทพเหนือ	Beta(2,8) = 20%	Beta(2,4) = 33%	Beta(11,27) = 29%	N/A
กรุงเทพใต้	Beta(4,37) = 10%	Beta(8,10) = 44%	N/A	N/A
ธนบุรีเหนือ	Beta(1,7) = 13%	Beta(3,17) = 15%	Beta(2,30) = 6%	N/A
ธนบุรีใต้	Beta(2,22) = 8%	Beta(5,7) = 42%	Beta(7,3) = 70%	Beta(2,8) = 20%

*Beta(1 + s, 1 + n - s) หน่วย : ร้อยละ **N/A ไม่มีการเก็บตัวอย่าง

ตารางที่ 2.19 การแจกแจงความน่าจะเป็นการเสื่อมของเนื้อสุกร (spoilage distribution) ในกลุ่มเขตพื้นที่ของกรุงเทพมหานครสำหรับความชุก (prevalence) *Klebsiella* spp.

กลุ่มเขตพื้นที่	การแจกแจงความน่าจะเป็นความชุกของการเสื่อมเนื้อสุกร (ร้อยละ)			
	ตลาดที่ 1	ตลาดที่ 2	ตลาดที่ 3	ตลาดที่ 4
กรุงเทพกลาง	Beta(12,1)* = 92%	Beta(12,1) = 92%	N/A**	N/A
กรุงเทพออก	Beta(13,1) = 93%	Beta(10,1) = 91%	Beta(40,1) = 98%	N/A
กรุงเทพเหนือ	Beta(5,1) = 83%	Beta(5,1) = 83%	Beta(28,1) = 97%	N/A
กรุงเทพใต้	Beta(31,1) = 97%	Beta(17,1) = 94%	N/A	N/A
ธนบุรีเหนือ	Beta(3,1) = 75%	Beta(6,1) = 86%	Beta(7,1) = 88%	N/A
ธนบุรีใต้	Beta(17,1) = 94%	Beta(4,1) = 80%	Beta(4,1) = 80%	Beta(7,1) = 88%

*Beta(1 + s, 1 + n - s) หน่วย : ร้อยละ **N/A ไม่มีการเก็บตัวอย่าง

=====

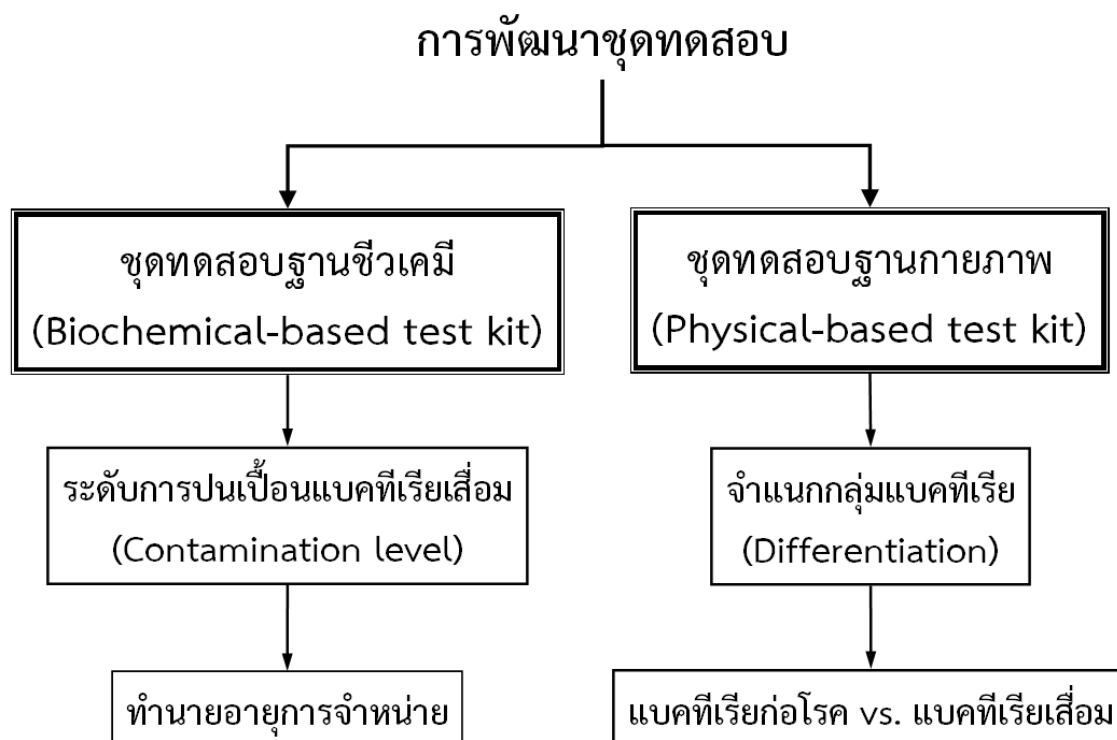
บทที่ 3

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบจุลินทรีย์อย่างรวดเร็วในเนื้อสุกร (Rapid microbial test kit)

3.1 Test kit ทดสอบจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่มีรูปแบบและคุณสมบัติเหมาะสมในการทดสอบ

การพัฒนาชุดทดสอบ (test kit) จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่มีรูปแบบและคุณสมบัติเหมาะสมในการทดสอบ จากการสืบค้นและทบทวนเอกสารทางวิทยาศาสตร์ อาจจะแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ตามวัตถุประสงค์และคุณสมบัติพื้นฐานสำคัญของแบคทีเรีย (ภาพที่ 3.1) ดังนี้

1. ชุดทดสอบฐานชีวเคมี (Biochemical-based test kit)
 - วัตถุประสงค์หลัก : หาระดับการปนเปื้อนของแบคทีเรียเสื่อม (contamination level)
 - เพื่อช่วยในการทำนายอายุการเก็บรักษาเนื้อสุกร (shelf life prediction)
 - คุณสมบัติชีวเคมี : เน้นการมีเอนไซม์และการนำไฟฟ้าของเซลล์แบคทีเรีย
2. ชุดทดสอบฐานกายภาพ (Physical-based test kit)
 - วัตถุประสงค์หลัก : จำแนกกลุ่มแบคทีเรียก่อโรคจากแบคทีเรียเสื่อม (differentiation)
 - เพื่อช่วยในการควบคุมความปลอดภัยและอายุการเก็บรักษา (safety vs. spoilage)
 - คุณสมบัติกายภาพ : เน้นความสอดคล้องกันของ
 1. การตรวจพบแบคทีเรียเสื่อม
 2. สภาวะกายภาพของผลิตภัณฑ์
 - 2.1 สภาวะเก็บรักษาเนื้อสุกร : อุณหภูมิ และ ออกซิเจน
 - 2.2 คุณสมบัติกายภาพที่ผิวผลิตภัณฑ์ : pH และ water activity



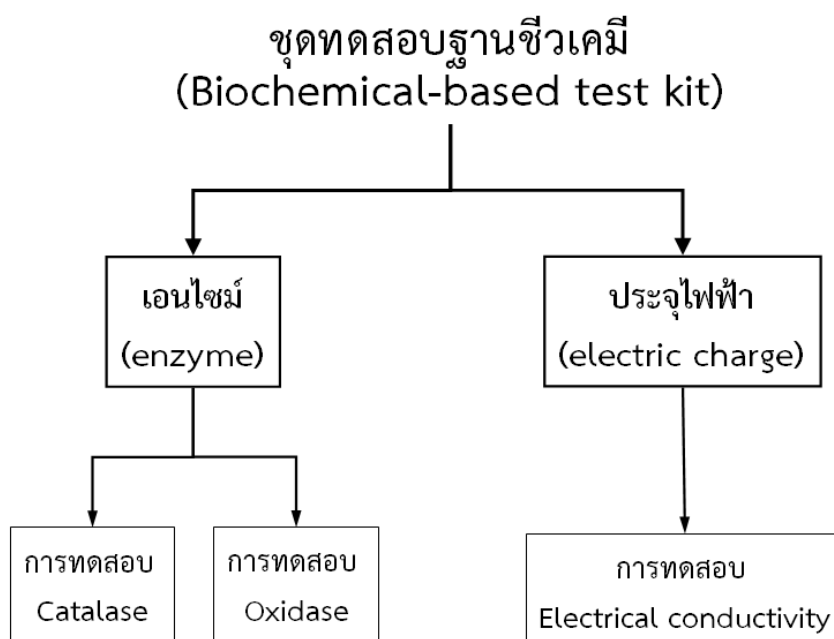
ภาพที่ 3.1 แนวทางการพัฒนาชุดทดสอบรวดเร็วและวัตถุประสงค์การใช้

3.1.1 ชุดทดสอบฐานชีวเคมี (Biochemical-based test kits)

ชุดทดสอบฐานชีวเคมีเป็นชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นมาโดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรีย ซึ่งนักจุลชีววิทยาได้อาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมีพื้นฐานเหล่านี้เป็นเครื่องมือในการระบุชนิดแบคทีเรีย (bacterial identification) ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาตามปกติอยู่แล้ว เช่น การย้อมติดสีของผนังเซลล์ (Gram staining) การมีเอนไซม์ชนิดต่างๆ (เช่น Catalase, Oxidase เป็นต้น)

อย่างไรก็ตาม คุณสมบัติชีวเคมีส่วนใหญ่ของแบคทีเรานั้น ต้องอาศัยการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา (bacteriological laboratory) ด้วยเครื่องมือและอุปกรณ์เฉพาะ และต้องใช้เวลาในระหว่างการบ่มเพาะแบคทีเรีย ดังนั้น คุณสมบัติทางชีวเคมีบางอย่างของแบคทีเรียเท่านั้น ที่จะสามารถพัฒนาเป็นชุดทดสอบ (test kit) ได้

วัตถุประสงค์หลักของชุดทดสอบฐานชีวเคมี คือ การมุ่งวิเคราะห์ระดับการปนเปื้อนของแบคทีเรียเสื่อม (contamination level) ในเนื้อสุกร โดยอาศัยคุณสมบัติชีวเคมีพื้นฐานของเซลล์แบคทีเรีย คือ การมีเอนไซม์หรือการนำไฟฟ้าของเซลล์แบคทีเรีย (ภาพที่ 3.2) โดยทั่วไปแล้ว ระดับการปนเปื้อนของแบคทีเรียเสื่อมจะมีความสัมพันธ์กับการแสดงผลของเอนไซม์และการนำไฟฟ้าของเซลล์แบคทีเรีย กล่าวคือ ระดับการปนเปื้อนเซลล์แบคทีเรียเสื่อมมาก ก็จะแสดงผลเอนไซม์และการนำไฟฟ้าที่สูงตาม ซึ่งสอดคล้องกับอายุการเก็บรักษาหรือการกำหนดอายุเนื้อสุกรที่สั้นลงด้วย ดังนั้นชุดทดสอบชีวเคมีจึงพัฒนาขึ้นเพื่อช่วยในการทำนายอายุการเก็บรักษาเนื้อสุกร (shelf life prediction)



ภาพที่ 3.2 ชนิดของการทดสอบฐานชีวเคมี (biochemical-based test kit)

เอนไซม์

(enzyme)

เอนไซม์ที่นิยมใช้ในการระบุชนิดของแบคทีเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียที่เรียลีส้อม เช่น Catalase และ Oxidase เป็นต้น เนื่องจาก การสังเกตคุณสมบัติการมีอยู่ของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ทำได้รวดเร็ว ชัดเจน และ มีการตอบสนองแบบแปรผันตรงกับระดับการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่เรียลีส้อม ดังนั้น จึงเลือกใช้ Catalase และ Oxidase ในการพัฒนาเป็น test kit ทดสอบจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่มีรูปแบบและคุณสมบัติเหมาะสมในการทดสอบ

การทดสอบ Catalase

การทดสอบ Catalase เป็นการทดสอบ เพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของ Catalase ของแบคทีเรีย โดยคุณสมบัติพื้นฐานในการทดสอบ คือ คุณสมบัติในการเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ให้กลายเป็นก๊าซออกซิเจน (oxygen) ให้ ดังสมการ (3.1)



คุณสมบัติการมี Catalase เป็นคุณสมบัติพื้นฐานของแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน หรือ ต้องการใช้ออกซิเจนเป็น final electron acceptor ในการหายใจแบบใช้ออกซิเจน (aerobic respiration) ดังนั้น แบคทีเรียให้ผลบวกต่อการทดสอบ Catalase จึงมักจะเป็นแบคทีเรียกลุ่ม aerobic หรือ facultatively anaerobic (โดยไม่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติการย้อมติดสีของผนังเซลล์)

1. แบคทีเรียแกรมบวก (Gram's positive bacteria) เช่น

- กลุ่ม *Bacillus*
- กลุ่ม *Staphylococcus*
- กลุ่ม *Micrococcus*
- *Brochothrix thermosphacta*

2. แบคทีเรียแกรมลบ (Gram's negative bacteria)

- กลุ่ม *Enterobacteriaceae* เช่น *Klebsiella*, *Serratia*, *Hafnia*, *Enterobacter*, *Escherichia coli* เป็นต้น
- กลุ่ม *Pseudomonas* เช่น *P.putida*, *P.fluorescens*, *P.fragi* เป็นต้น
- กลุ่ม *Acinetobacter/Moraxella* (*Psychrobacter*)
- *Shewanella (Alteromonas) putrefaciens*

โดยสรุป คือ แบคทีเรียลีส้อมทุกชนิดในเนื้อสัตว์ให้ผลบวก (positive) ต่อการทดสอบ Catalase ยกเว้นกลุ่ม lactic acid bacteria (กลุ่ม anaerobic หรือ กลุ่ม microaerophilic)

แม้ว่าแบคทีเรียลีส้อมเกือบทุกชนิดจะให้ผลบวกต่อการทดสอบ Catalase แต่ระยะเวลาตอบสนองของแบคทีเรียลีส้อมต่อการทดสอบ Catalase แตกต่างกันไป ดังตารางที่ 3.1-3.2

ตารางที่ 3.1 การตอบสนองต่อการทดสอบ Catalase ของแบคทีเรีย *Enterobacteriaceae*⁵

Family : <i>Enterobacteriaceae</i>	จำนวนสายพันธุ์ที่ตอบสนองต่อ Catalase test	
	แบบ Immediate	แบบ Delayed
<i>Cedecea davisaea</i>	4	-
<i>Cedecea lapageia</i>	2	-
<i>Edwardsiella tarda</i>	-	5
<i>Citrobacter amalonaticusa</i>	-	15
<i>Citrobacter diversusa</i>	-	15
<i>Citrobacter freundii</i>	-	15
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	12
<i>Enterobacter agglomerans</i>	-	11
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	26
<i>Enterobacter gergoviae</i>	-	13
<i>Enterobacter sakazakii</i>	-	13
<i>Escherichia coli</i>	-	120
<i>Escherichia vulneria</i>	-	2
<i>Escherichia hermannii</i>	-	1
<i>Escherichia fergusonii</i>	-	1
<i>Hafnia alveia</i>	6	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	6
<i>Klebsiella ozaenae</i>	-	6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	52
<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	-	5
<i>Kluyvera ascorbata</i>	-	3
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	-	2

⁵ Chester, B. and Moskowitz, Lee. 1987. Rapid Catalase Supplemental Test for Identification of Members of the Family *Enterobacteriaceae* J. of Clinical Microbiology 25 (2) : 439-441

ตารางที่ 3.2 การตอบสนองต่อการทดสอบ Catalase ของแบคทีเรีย *Enterobacteriaceae*⁶ (ต่อ)

Family : <i>Enterobacteriaceae</i>	จำนวนสายพันธุ์ที่ตอบสนองต่อ Catalase test	
	แบบ Immediate	แบบ Delayed
<i>Morganella morganii</i>	15	-
<i>Proteus mirabilis</i>	37	-
<i>Proteus penneria</i>	4	-
<i>Proteus vulgaris</i>	8	-
<i>Providencia alcalifaciens</i>	8	-
<i>Providencia rettgeri</i>	12	-
<i>Providencia stuartii</i>	17	-
<i>Salmonella arizonae</i>	-	3
<i>Salmonella cholerae-suis</i>	-	4
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	15
<i>Salmonella typhi</i>	-	4
<i>Shigella boydii</i>	-	3
<i>Shigella dysenteriae</i>	-	4
<i>Shigella flexneri</i>	-	5
<i>Shigella sonnei</i>	-	11
<i>Serratia liquefaciens</i>	10	-
<i>Serratia marcescens</i>	24	-
<i>Serratia odoriferaa</i>	6	-
<i>Serratia rubidaea</i>	2	-
<i>Tatumella ptyseosa</i>	-	2
<i>Yersinia enterocolitica</i>	21	-
<i>Yersinia frederiksenii</i>	1	-
<i>Yersinia intermedia</i>	14	-
<i>Yersinia kristensenii</i>	2	-
<i>Yersinia pestis</i>	1	-
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	9	-

⁶ Chester, B. and Moskowitz, Lee. 1987. Rapid Catalase Supplemental Test for Identification of Members of the Family *Enterobacteriaceae* J. of Clinical Microbiology 25 (2) : 439-441

จากตารางที่ 3.1-3.2 จะพบว่า *Enterobacteriaceae* สามารถแบ่งได้ 2 กลุ่มย่อยตามระยะเวลาตอบสนองต่อการทดสอบ Catalase คือ

1. กลุ่มตอบสนองทันที (Immediate catalase group) ประกอบด้วย

- *Cedecea*
- *Hafnia*
- *Morganella*
- *Proteus*
- *Providencia*
- *Serratia*
- *Yersinia*

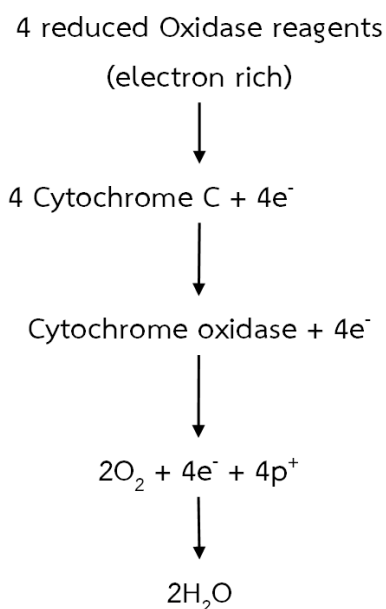
2. กลุ่มตอบสนองหน่วง (Delayed catalase group) ประกอบด้วย

- *Citrobacter*
- *Edwardsiella*
- *Enterobacter*
- *Escherichia*
- *Klebsiella*
- *Kluyvera*
- *Salmonella*
- *Shigella*
- *Tatumella*

รายงานของ Wang and Fung (1986) ได้กล่าวโดยภาพรวมของแบคทีเรียเชื่อมทั้ง Gram's positive และ Gram's negative พบว่า การตอบสนองต่อการทดสอบ Catalase สูงสุดอันดับที่ 1 คือ *Micrococcus luteus* การตอบสนองสูงสุดอันดับที่ 2 คือ *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas fluorescens* การตอบสนองอันดับต่อมา คือ *Escherichia coli* และ *Bacillus cereus* การตอบสนองอันดับท้ายสุด คือ *Salmonella* spp. ในขณะที่ Boismenu et al. (1990) รายงานว่า *Pseudomonas* spp. และ *Micrococcus* spp. ให้ผลการทดสอบสูงสุดในเนื้อปลาสด (cod fillet) ดังนั้น ความแตกต่างหรือความหลากหลายของผลการทดสอบ Catalase ของแบคทีเรียขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น ชนิด/สายพันธุ์/ของแบคทีเรียเชื่อม รวมถึงชนิดของอาหารที่ทดสอบด้วย

การทดสอบ Oxidase

การทดสอบ Oxidase เป็นการทดสอบ เพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของ Oxidase ของแบคทีเรีย โดยคุณสมบัติพื้นฐานในการทดสอบ คือ คุณสมบัติของ cytochrome oxidase ในการรับอิเล็กตรอน (electrons : e^-) ทางอ้อมจาก oxidase reagents ผ่าน cytochrome C ดังภาพที่ 3.3



ภาพที่ 3.3 แผนภูมิการเกิดปฏิกิริยาของการทดสอบ Oxidase

คุณสมบัติการมี Oxidase เป็นคุณสมบัติพื้นฐานของแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน หรือ ต้องการใช้ออกซิเจนเป็น final electron acceptor ในการหายใจแบบใช้ออกซิเจน (aerobic respiration)

แบคทีเรียแต่ละกลุ่มหรือชนิดจะให้ผลการตอบสนองต่อการทดสอบ Oxidase แตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของ (Cytochrome C composition) ลักษณะของ Cytochrome oxidases และ องค์ประกอบของ electron transport system (ETS) ในกระบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน ทำให้สามารถแบ่งแบคทีเรียตามระดับการตอบสนองต่อการทดสอบ Kovacs Oxidase ได้เป็น 4 กลุ่ม⁷ ดังนี้

1. กลุ่มที่ให้ผลบวกต่อ Oxidase (Kovacs oxidase-positive) แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อย คือ

1.1 กลุ่มที่ตอบสนองมาก (high) ประกอบด้วย

- *Achromobacter*
- *Azotobacter*
- *Azotomonas*
- *Neisseria*

⁷ Jurtshuk, P. and McQuitty, D., 1976. Survey of Oxidase-Positive and -Negative Bacteria Using a Quantitative Kovacs Oxidase Test. International J. of Systematic Bacteriology, 26 (2) : 127-135

- *Pseudomonas*

- *Spirillum*

1.2 กลุ่มที่ตอบสนองปานกลาง (intermediate) ประกอบด้วย

- *Aeromona*

- *Flavobacterium*

- *Micrococcus* (variable)

- *Vibrio*

2. กลุ่มที่ให้ผลลบต่อ Oxidase (Kovacs oxidase-negative) แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อย คือ

2.1 กลุ่มที่ตอบสนองน้อย (low) ประกอบด้วย

- *Acinetobacter*

- *Bacillus*

- Family *Enterobacteriaceae* ส่วนมาก

- *Mycobacterium*

2.2 กลุ่มที่ไม่ตอบสนองน้อย (none) ประกอบด้วย

- Family *Enterobacteriaceae* บางชนิด

- *Gafflzya*

- *Lactobacillus*

- *Pediococcus*

- *Streptococcus*

โดยสรุป คือ แบคทีเรียแกรมบวกเกือบทุกชนิดในเนื้อสัตว์ให้ผลลบต่อการทดสอบ Oxidase ในขณะที่แบคทีเรียแกรมลบที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบ Oxidase คือ กลุ่ม *Pseudomonas* *Moraxella* และ *Shewanella* (*Alteromonas*) *putrefaciens* เป็นต้น

Oxidase reagent ที่ใช้ในการทดสอบ Oxidase นิยมใช้ 2 ชนิด คือ

1. Di-methyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride (DMPD)

2. Tetra-methyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD)

ในสถานะที่ Oxidase reagent รับ electron โดยอยู่ในรูป reduced TMPD หรือ reduced DMPD จะไม่มีสี (no color) แต่เมื่อ reduced Oxidase reagent ส่ง electron ให้กับ cytochrome C แล้ว reduced oxidase reagent จะเปลี่ยนรูปเป็น oxidised Oxidase reagent ที่มีสี (color)

แรกเริ่มเมื่อปี คศ. 1928 นาย Gordon และ นาย McLeod⁸ ได้ใช้การทดสอบ Oxidase เพื่อการแยก *Neisseria gonorrhoeae* ซึ่งให้ผลบวกต่อการทดสอบ Oxidase (oxidase positive) ออกจาก *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. ซึ่งให้ผลลบต่อการทดสอบ Oxidase (oxidase

⁸ Gordon, J., and J. W. McLeod. 1928. The practical application of the direct oxidase reaction in bacteriology. J. Pathol. Bacteriol. 31:185-190.

negative) โดย oxidase reagent ที่ใช้คือ Di-methyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride (DMPD)

และต่อมาในปี คศ. 1956 นาย Kovac⁹ ได้พัฒนาการทดสอบให้มีการตอบสนองที่เร็วขึ้นโดยใช้ Tetra-methyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD) เป็น oxidase reagent โดยเป็นการทดสอบบนกระดาษกรอง (Filter paper method) โดยดูการเกิดสีน้ำเงินเข้ม (Dark blue)

และต่อมาในปี คศ. 1957 นาย Gaby และ นาย Hadley¹⁰ ได้ปรับปรุง (modified) การทดสอบ Oxidase โดยใช้ *p*-amino dimethyl aniline oxalate ร่วมกับ α -naphthol ในการทดสอบ Oxidase ในหลอดทดลอง (test tube method) โดยดูการเกิดสีน้ำเงินเข้ม (Dark blue) เช่นเดียวกัน

ประจุไฟฟ้า

(electric charge)

การทดสอบ Electrical conductivity

คุณสมบัติการนำไฟฟ้า (electrical conductivity) คือ ส่วนกลับของความต้านทานไฟฟ้า (resistance) เป็นการวัดความเข้มข้นประจุ (ionic concentration) ของสารละลายหรือของเหลว มีหน่วย คือ Siemen/meter (S/m) microSiemen/centimeter (μ S/cm) หรือ milliSiemen/cm (mS/cm)

คุณสมบัติการนำไฟฟ้าของเนื้อสุกมีความสัมพันธ์กับทั้งคุณภาพเนื้อสุก (Jukna et al., 2012) และ ระดับการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในเนื้อสุกด้วย (Byun et al., 2003; Gibson, 2001) นอกจากนี้ การนำไฟฟ้าของเนื้อสุกจะเพิ่มมากขึ้น ตามระยะเวลาหลังการฆ่า ดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 ค่าการนำไฟฟ้าที่สัมพันธ์กับคุณภาพเนื้อสุก

คุณภาพเนื้อสุก	การนำไฟฟ้า (mS/cm) หลังฆ่า		
	45 นาที	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
Dark Firm and Dry (DFD)	N/A	< 4.3	n/a
ปกติ	2-3	5-7	11-28
Pale Soft and Exudative (PSE)	> 8.3	12-15	n/a

ดัดแปลงจาก Jukna et al., 2012

กล่าวโดยสรุป คือ

= EC เนื้อสุกทั่วไป หลังฆ่า 45 นาที ~ 2 mS/cm หลังฆ่า 24 และ 48 ชั่วโมงเพิ่มขึ้นเป็น ~ 6 และ ~ 20 mS/cm ตามลำดับ

⁹ Kovács, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature (London) 178::703.

¹⁰ Gaby, W. L., and C. Hadley. 1957. Practical laboratory test for the identification of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 74:356–358.

= EC เนื้อสุกร Pale soft exudative (PSE) หลังฆ่า 45 นาที สูงกว่า 8.3 mS/cm และ หลังฆ่า 24 ชั่วโมง 12-15 mS/cm ดังนั้น เนื้อ PSE จะมีค่า EC สูงกว่าเนื้อสุกรปกติ

= EC เนื้อสุกร Dark firm dry (DFD) หลังฆ่า 24 ชั่วโมง ต่ำกว่า 4.3 mS/cm ดังนั้น เนื้อ DFD จะมีค่า EC ต่ำกว่าเนื้อสุกรปกติ (Jukna et al., 2012)

3.1.2 ชุดทดสอบฐานกายภาพ (Physical-based test kit)

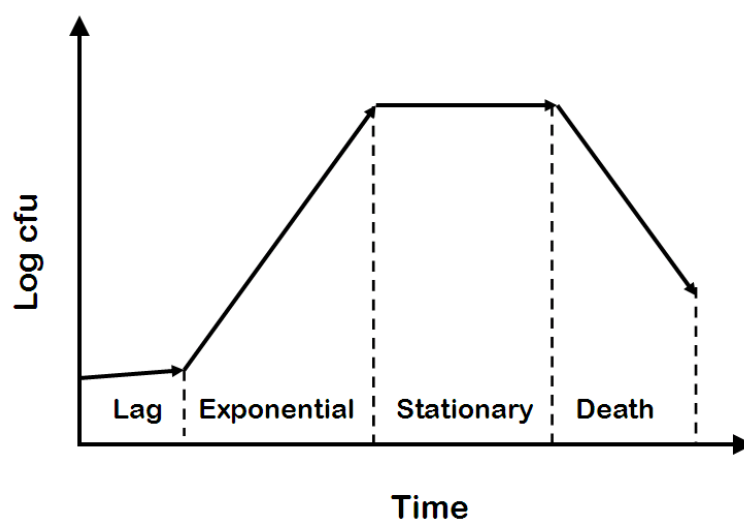
ชุดทดสอบโดยอาศัยคุณสมบัติทางกายภาพของแบคทีเรีย อาศัยความรู้พื้นฐานในหัวข้อ ต่อไปนี้

1. เส้นโค้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (bacterial growth curve)
2. อัตราการเจริญเติบโตและระยะเวลาการเก็บรักษา/ขนส่ง (growth rate and time)
3. ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (factor affecting bacterial growth)

เส้นโค้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

(bacterial growth curve)

แบคทีเรียเพิ่มจำนวนหรือสืบพันธุ์โดยการแบ่งตัว (budding) ซึ่งจะต้องอาศัยสารอาหารในสิ่งแวดล้อมที่แบคทีเรียนั้นอาศัยอยู่ ดังนั้นการจะทราบจำนวนแบคทีเรียในทางจุลชีววิทยาแล้ว จะเป็นการนับจำนวนโดยอาศัยความสามารถของแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโต (forming) ในรูปของโคโลนี (colony) บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (agar media) ดังนั้นจำนวนเซลล์แบคทีเรียจึงมีหน่วยนับเป็น colony forming unit (cfu) โดยแบคทีเรียจะใช้ช่วงระยะแรกในการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ ก่อนที่จะมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในระยะต่อมา ดังนั้นหากมีการติดตามการเพิ่มจำนวนในรูปของความเข้มข้นของแบคทีเรียในช่วงระยะเวลาที่ต่อเนื่อง ก็จะสามารถเห็นรูปแบบเฉพาะของการเจริญเติบโตหรือเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย (growth) ในรูปแบบของเส้นโค้ง (curve) ที่มี “แกนนอน” เป็นระยะเวลาในการเจริญเติบโตหรือระยะเวลาในการเก็บรักษาหรือขนส่งเนื้อสุกรเย็น และ “แกนตั้ง” เป็นเลขยกกำลัง (Logarithmic : Log) ของจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ (colony-forming-unit : cfu) เรียกว่า เส้นโค้งการเจริญเติบโต (growth curve) (McKellar and Lu, 2003) ดังภาพที่ 3.4



ภาพที่ 3.4 รูปแบบทั่วไปของเส้นโค้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (growth curve)

เส้นโค้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (growth curve) สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ระยะ (phase) ดังนี้

1. **ระยะปรับตัว (Lag phase)** เป็นช่วงระยะที่แบคทีเรียเริ่มต้นในการปรับตัวให้เข้ากับ ชนิด/ปริมาณสารอาหาร และสภาวะแวดล้อมใหม่ที่มีความแตกต่างของ

- ก. อุณหภูมิ (temperature)
- ข. ความเป็นกรดต่าง (pH)
- ค. ปริมาณน้ำใช้ได้ (water activity : a_w) และ
- ง. ปริมาณออกซิเจน (oxygen)

แบคทีเรียจึงยังไม่มี การเพิ่มจำนวนอย่างชัดเจน ดังนั้นจึงสังเกตเห็นเส้นโค้งการเจริญเติบโตที่ยกตัวเพียงลาดต่ำๆ เท่านั้นในช่วงระยะที่ 1 ดังภาพที่ 1

2. **ระยะเพิ่มจำนวน (Exponential phase)** หลังจากทีแบคทีเรียมีการปรับตัวให้เข้ากับ สิ่งแวดล้อมใหม่แล้ว แบคทีเรียมีความพร้อมในการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ซึ่งแบคทีเรียจะมีการเพิ่มจำนวนจนถึงจุดสูงสุดในระยะนี้ ดังนั้นจึงสังเกตเห็นเส้นโค้งการเจริญเติบโตมีการยกตัวลาดชันมากขึ้นในระยะที่ 2 ดังภาพที่ 1

3. **ระยะคงตัว (Stationary phase)** เป็นระยะที่ต่อเนื่องจาก exponential phase ณ จุดสูงสุด โดยในระยะนี้แบคทีเรียมีการใช้สารอาหารที่มีอยู่อย่างจำกัดในสิ่งแวดล้อมนั้นๆ ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วต่อเนื่องดังเช่นใน exponential phase กอปรกับการตายของแบคทีเรียบางส่วนที่เกิดจากการสะสมของเสียที่ขับออกมา (toxic waste) โดยแบคทีเรียเองด้วย ทำให้จำนวนแบคทีเรียที่เพิ่มจำนวนขึ้นเท่ากับจำนวนแบคทีเรียที่ตายไปจากสารพิษ หรือโดยสุทธิตั้งแล้ว จำนวนแบคทีเรียเป็นค่าคงที่หรือไม่มีการเพิ่มจำนวนมากไปกว่า exponential phase ดังนั้นจึงสังเกตเห็นเส้นโค้งการเจริญเติบโตที่ทอดยืดยาวออกไประยะหนึ่ง ดังภาพที่ 1

4. **ระยะการตาย (Death phase)** เป็นช่วงระยะที่สารอาหารในสิ่งแวดล้อมนั้น หายหมด จำนวนลงไปเรื่อยไป ในขณะที่มียังคงมีการสะสมสารพิษอย่างต่อเนื่อง ทำให้สิ่งแวดล้อมนี้ไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตหรือการตั้งอยู่รอดของแบคทีเรีย ทำให้จำนวนแบคทีเรียทยอยตาย ดังนั้นจึงสังเกตเห็นเส้นโค้งมีความลาดชันลดลงตามลำดับ ดังภาพที่ 1 (McKellar and Lu, 2003)

อัตราการเจริญเติบโตและระยะเวลาการเก็บรักษา/ขนส่ง (growth rate and time)

อัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย คือ ความเร็วของแบคทีเรียในการเพิ่มจำนวน โดยมากแล้วอัตราการเจริญเติบโตจะกำหนดเป็นเงื่อนไข จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นต่อหนึ่งหน่วยเวลา เช่น 100 cfu/ชั่วโมง หมายความว่า ในเวลา 1 ชั่วโมง แบคทีเรียสามารถเพิ่มจำนวนได้ 100 cfu (เซลล์) อย่างไรก็ตาม เนื่องจากอัตราการเจริญเติบโตเป็นเงื่อนไขของเวลา หากต้องการทราบจำนวนเซลล์จุลินทรีย์มีการเพิ่มขึ้นจริงจะต้องทราบระยะเวลาในการเจริญเติบโต

ตัวอย่าง อัตราการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเซลล์แบคทีเรีย คือ 1 log cfu/hr

1. ระยะเวลาการเก็บรักษาเนื้อสุกร 2 ชั่วโมง

จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นจริง = 1 log cfu/hr x 2 hr = 2 log cfu = 100 cfu

2. ระยะเวลาการเก็บรักษาเนื้อสุกร 4 ชั่วโมง

จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นจริง = 1 log cfu/hr x 4 hr = 4 log cfu = 10,000 cfu

จากตัวอย่างนี้จะสังเกตได้อย่างชัดเจนว่า จำนวนแบคทีเรียที่เพิ่มจำนวนขึ้นนั้นจะแปรผันตามระยะเวลา ในที่นี้ครอบคลุมถึงการผลิต การตัดแต่ง การเก็บรักษาและการขนส่ง

กล่าวโดยสรุป คือ ระยะเวลาที่นานขึ้น จะทำให้จำนวนจุลินทรีย์เพิ่มจำนวนมากขึ้นตามสัดส่วน หรือความเร็วของอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

(factor affecting bacterial growth)

นอกจากเส้นโค้งการเจริญเติบโตแล้ว การเจริญเติบโตของแบคทีเรียบ่งชี้ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยสำคัญที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (McKellar and Lu, 2003) ประกอบด้วย

1. อุณหภูมิ (Temperature)

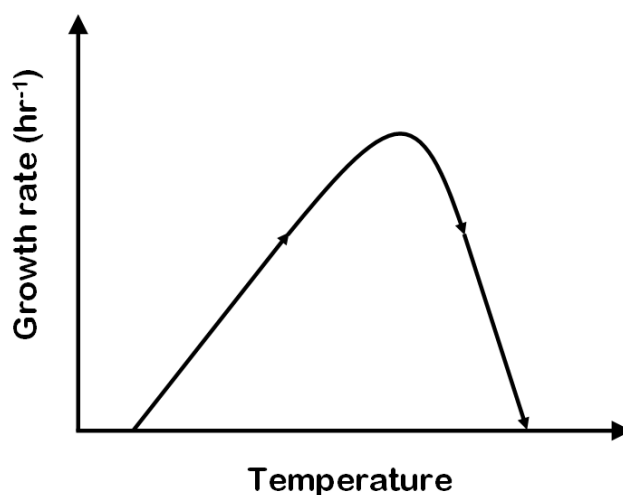
อุณหภูมิที่แบคทีเรียนั้นอาศัยอยู่เป็นปัจจัยพื้นฐานที่สำคัญยิ่งยวดในการกำหนดอัตราการเจริญเติบโต (growth rate) (McKellar and Lu, 2003) ดังเช่น กรณีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคอาหารเป็นพิษในเนื้อสุกร หรือ กรณีการเจริญเติบโตของ BI ในเครื่องบ่งชี้อุณหภูมิและเวลา เป็นต้น อย่างไรก็ตามทั้งซากสุกรและเนื้อสุกรย่อมจะต้องมีการเก็บรักษาภายในห้องระหว่างกระบวนการผลิต ดังนั้น จึงควรจะทราบอุณหภูมิที่สำคัญในห่วงโซ่การผลิตเนื้อสุกรเย็นด้วย ดังตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 ช่วงอุณหภูมิที่สำคัญในห่วงโซ่การผลิตเนื้อสุกรเย็น^a

จุดควบคุมอุณหภูมิสำคัญ	ช่วงอุณหภูมิ
Refrigerated room	Freezer : -18°C ถึง -30 °C
Refrigerated room	Chiller : 0 °C ถึง + 7 °C
Chilled meat	+ 4°C ถึง + 7°C
Cutting room	+10°C ถึง +15°C
Curing room	+5°C ถึง +10°C

^aHeinz, G. and Hautzinger, P. 2007. Meat processing technology for small - to medium - scale procedures. RAP publication 2007/20.

ความสัมพันธ์ของอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสามารถแสดงได้ดังภาพที่ 3.5 โดยจะสังเกตได้ว่า ในช่วงครึ่งแรกของช่วงอุณหภูมิ อัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจะสูงขึ้นแปรผันตามอุณหภูมิที่สูงขึ้น อย่างไรก็ตาม เมื่ออัตราการเจริญเติบโตถึงระดับสูงที่สุด ณ อุณหภูมิที่เรียกว่า อุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum temperature) แล้ว ในช่วงครึ่งหลังของช่วงอุณหภูมิ อัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกลับลดลงแปรผกผันกับอุณหภูมิที่สูงขึ้น เนื่องจาก อุณหภูมิที่สูงเกินไปทำให้โครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) เสียหาย รวมถึงความสมดุลของเอนไซม์โดยรวม (enzymes) ในเซลล์แบคทีเรียเสียไปด้วย ทำให้อัตราการเจริญเติบโตลดลง จนเมื่ออุณหภูมิสูงมากเกินไป เช่น มากกว่า 60°C ขึ้นไป เป็นต้น ความร้อนกลับมีผลเสียที่ทำให้เซลล์แบคทีเรียตายได้ในที่สุด

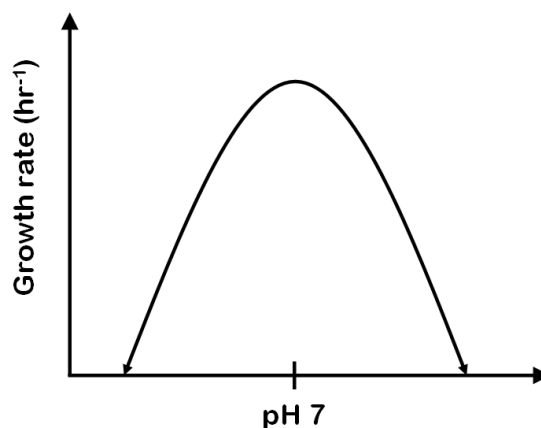


ภาพที่ 3.5 อัตราการเจริญเติบโตขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่เก็บรักษา

อย่างไรก็ตาม ในช่วงอุณหภูมิการเก็บรักษาเนื้อสุกรโดยมากแล้วจะอยู่ในช่วงครึ่งแรกของช่วงอุณหภูมิดังภาพที่ 3.5 และ ตารางที่ 22 ดังนั้นอัตราการเจริญเติบโตของทั้งจุลินทรีย์ก่อโรคอาหารเป็นพิษ และแบคทีเรียบ่งชี้จึงมักจะสูงขึ้นตามอุณหภูมิในการเก็บรักษาและขนส่งที่สูงขึ้น

2. ความเป็นกรดต่าง (pH)

ความเป็นกรดต่าง (pH) มีช่วงค่าระหว่าง 0 และ 14 โดย pH ที่เป็นกลาง คือ $\text{pH} = 7$ โดยช่วง pH ที่ต่ำกว่า 7 เรียกว่า กรด (acid) ส่วนช่วง pH ที่สูงกว่า 7 เรียกว่า ต่าง (base) ในขณะที่แบคทีเรียโดยทั่วไปจะมีอัตราการเจริญเติบโตได้ดีในช่วงที่ใกล้กับ pH ที่เป็นกลาง ในขณะที่อัตราการเจริญเติบโตจะค่อยๆ ลดลงในสภาวะที่เป็นกรดหรือด่างมากขึ้น (McKellar and Lu, 2003) ดังภาพที่ 3.6



ภาพที่ 3.6 ความสัมพันธ์ของอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย กับ ความเป็นกรดต่าง (pH)

เนื้อสัตว์สดหลังการฆ่าใหม่ๆ จะมี pH เป็นกลาง ประมาณ 7.0 หลังจากนั้นเซลล์กล้ามเนื้อจะใช้พลังงานจาก carbohydrate ในรูปของ glycogen (ร้อยละ 1) ที่สะสมในกล้ามเนื้อ ทำให้ได้กรดแลคติก (lactic acid) สะสมในเนื้อ ทำให้ pH ของเนื้อสัตว์ลดลงตามลำดับ โดย pH สุดท้ายที่ 24 ชั่วโมง (ultimate pH หรือ pH₂₄) มักจะลดลงไปอยู่ที่ประมาณ pH 5.4-5.8 สำหรับ pH ของเนื้อสัตว์อยู่ในช่วง 5.4 – 7.2 ดังตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 ช่วง pH ของเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์^a

เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์	ช่วง pH
เนื้อสัตว์หลังฆ่า	7.0 – 7.2
เนื้อโค	5.4 – 6.0
เนื้อสุกร	5.5 – 6.2
เลือด	7.3 – 7.6

^aHeinz, G. and Hautzinger, P. 2007. Meat processing technology for small - to medium - scale procedures. RAP publication 2007/20.

3. ปริมาณน้ำใช้ได้ (water activity : a_w)

ปริมาณน้ำใช้ได้ หมายถึง โมเลกุลของน้ำที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ความหมายของคำนี้มีความคล้ายคลึงกับแนวคิดในเรื่องน้ำทั้งหมด (water content) หรือความชื้น (moisture) แต่ไม่เหมือนกันทั้งหมด โปรดสังเกตจากตัวอย่างต่อไปนี้ เช่น อาหารชนิดหนึ่งอาจจะมีปริมาณน้ำสูง แต่อาจจะมี a_w ต่ำก็ได้ เนื่องจาก โมเลกุลของน้ำจำนวนมากอาจจะจับตัว (bound) กับ โมเลกุลของอาหาร โดยธรรมชาติแล้วจุลินทรีย์ในอาหารย่อมต้องการใช้น้ำเพื่อการเจริญเติบโต (ตารางที่ 3.6) แต่จุลินทรีย์กลับไม่สามารถใช้น้ำที่มีอยู่ในอาหารนั้นได้ เพราะว่า น้ำส่วนมากแล้วรวมตัวอยู่กับ สารประกอบในอาหาร จุลินทรีย์จึงไม่สามารถนำน้ำเหล่านี้ในอาหารไปใช้ได้ ดังนั้น อัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจึงมีความสัมพันธ์ในทางเดียวกันกับปริมาณ a_w กล่าวคือ a_w ที่มากขึ้น จุลินทรีย์ก็จะมีอัตราการเจริญเติบโตมากขึ้น (McKellar and Lu, 2003)

ตารางที่ 3.6 ค่า water activities (a_w) ต่ำสุดที่จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้¹¹

Microorganism	Minimum a_w
<i>Clostridium botulinum</i> Type E <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.97
<i>Bacillus cereus</i>, <i>Burkholderia cepacia</i> <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Clostridium botulinum</i> Type A, B <i>Escherichia coli</i>, <i>Klebsiella</i>, <i>Salmonella</i> spp. <i>Lactobacillus viridescens</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.95
<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.94
<i>Micrococcus lysodekticus</i> <i>Rhizopus nigricans</i>	0.93
<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Mucor plumbeus</i> <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0.92
<i>Aeromonas caviae</i> , <i>Aeromonas hydrophilia</i> , <i>Aeromonas sobria</i> <i>Plesiomonas shigelloides</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Shigella</i> spp. <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	0.91
<i>Bacillus subtilis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> (anaerobic) <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.90
<i>Candida</i> <i>Staphylococcus aureus</i> (aerobic) <i>Paecilomyces variotti</i> <i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Penicillium glabrum</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Halobacterium halobium</i> (halophilic bacterium) <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> (osmophilic yeast) <i>Xeromyces bisporus</i> (xerophilic fungi)	0.88 0.87 0.84 0.83 0.82 0.81 0.78 0.77 0.75 0.62 0.61
no microbial growth	< 0.60

¹¹ Fontana Jr., A.F., Senior Research Scientist, Decagon Devices, Inc. Understanding Water Activity for Reduced Microbial Testing Using USP Method <1112>

4. ออกซิเจน หรือ อากาศ (oxygen หรือ atmosphere)

แบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนหรือการใช้ออกซิเจนเป็นส่วนหนึ่งการหายใจเพื่อสร้างพลังงาน (respiration) จะใช้ Superoxide dismutase (SOD) ในการกำจัดอนุมูลอิสระ Superoxide radical (O_2^-) และ ใช้ Catalase หรือ Peroxidases ในการกำจัด Hydrogen peroxide (H_2O_2) ซึ่งเป็น oxidizing agent ที่แรงมาก เรียกว่า aerobic bacteria

การจำแนกจุลินทรีย์โดยอาศัยออกซิเจนเป็นปัจจัยดำรงชีพ จะสรุปอยู่ในตารางที่ 1

4.1 จุลินทรีย์ใช้อากาศ (strictly aerobic) จุลินทรีย์สร้างพลังงานโดยการหายใจแบบใช้ออกซิเจน (aerobic respiration) มากกว่าการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic respiration) เช่น กลุ่ม *Pseudomonas* รา ยีสต์เสื่อมอาหารส่วนใหญ่ เป็นต้น

4.2 จุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศ (strictly anaerobic) จุลินทรีย์สร้างพลังงานโดยการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic respiration) และ/หรือ การหมัก (fermentation) เช่น *Clostridium* spp. และ *Desulfotomaculum* spp. เป็นต้น

4.3 จุลินทรีย์ใช้/ไม่ใช้/อากาศ (facultatively anaerobic) จุลินทรีย์สร้างพลังงานได้ทั้งการหายใจอากาศใช้ออกซิเจน (aerobic respiration) ไม่ใช้ออกซิเจน และการหมัก (fermentation) จึงมีคุณสมบัติรวมของ aerobes และ anaerobes เข้าด้วยกัน เช่น *Enterobacteriaceae* (*E.coli*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Erwinia*, *Salmonella*, *Shigella*), *Spoilage Bacillus*, *Staphylococcus*, *Vibrio*, *Aeromonas* และ ยีสต์เสื่อมอาหารบางชนิด เป็นต้น

4.4 จุลินทรีย์ใช้อากาศน้อย (Microaerophilic) จุลินทรีย์สร้างพลังงานโดยการใช้ออกซิเจนน้อย เนื่องจาก มีเอนไซม์ในการกำจัดพิษจากการใช้ออกซิเจน เช่น SOD หรือ catalase น้อย เช่น กลุ่ม Lactic acid bacteria, *Listeria* spp. และ *Campylobacter* spp. เป็นต้น

แบคทีเรียเสื่อมที่สำคัญมีความต้องการออกซิเจนในระดับที่แตกต่างกัน สรุปดังตารางที่ 3.7

ตารางที่ 3.7 ความต้องการออกซิเจนของแบคทีเรียเสื่อม

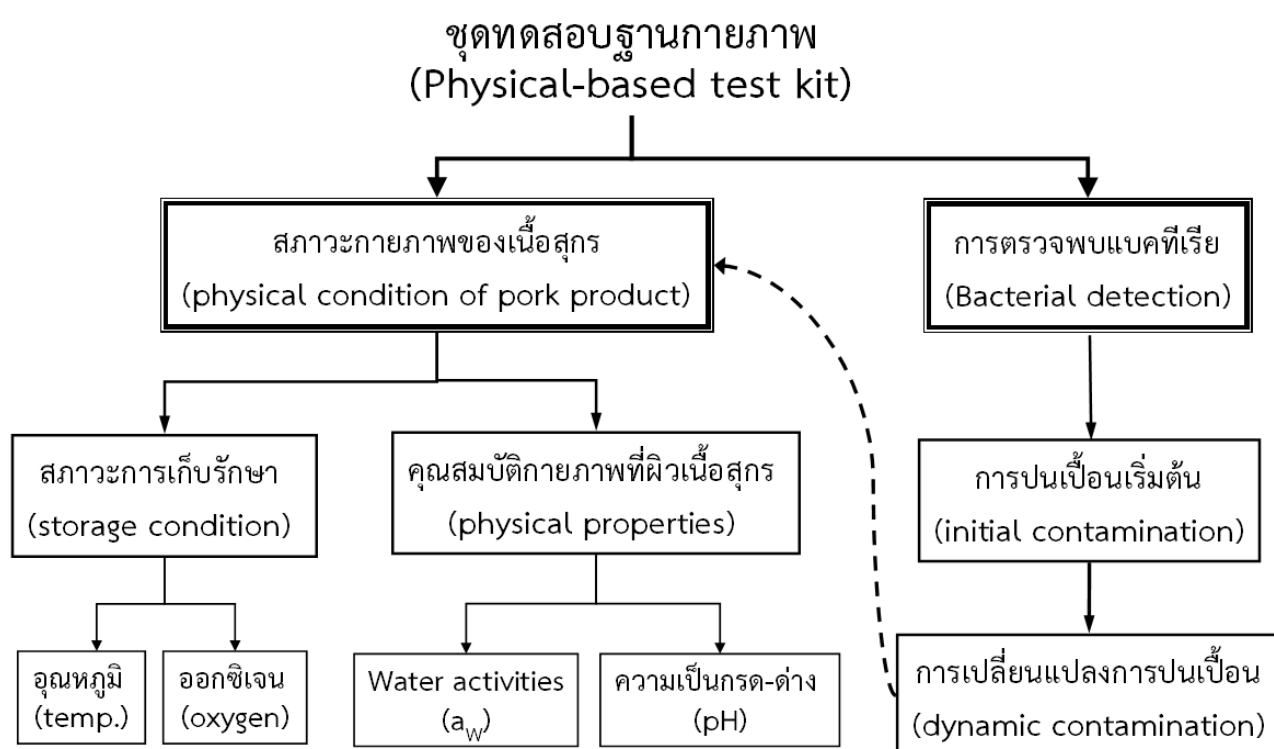
Spoilage bacterial group	Oxygen requirement
<i>Pseudomonas</i>	Strictly aerobic
<i>Acinetobacter</i>	Strictly aerobic
<i>Moraxella</i>	Strictly aerobic
<i>Enterobacteriaceae</i>	Facultatively anaerobic
Lactic acid bacteria	Microaerophilic
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Facultatively anaerobic
<i>Shewanella putrefaciens</i>	Facultatively anaerobic

ความสัมพันธ์ระหว่าง “สภาวะกายภาพของเนื้อสุกร” และ “การตรวจพบแบคทีเรีย”

(Relationship of “physical condition of pork product” and “bacterial detection”)

แนวทางในการพัฒนาชุดทดสอบฐานกายภาพเป็นการพิจารณา “สภาวะกายภาพของเนื้อสุกร” ที่เอื้ออำนวยหรือสนับสนุน (support) ต่อการอยู่รอดและ/หรือเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

กล่าวคือ เป็นการศึกษา¹ สภาวะการเก็บรักษาเนื้อสุกร ณ จุดจำหน่ายที่เป็นตลาดสดทั่วไป เช่น อุณหภูมิ และ ออกซิเจน ผสมกับ² คุณสมบัติทางกายภาพที่ผิวเนื้อสุกร เช่น pH และ water activities ซึ่งเป็น จะขอเรียกโดยรวมทั้ง 2 ส่วนนี้ว่า “สภาวะทางกายภาพของเนื้อสุกร (physical condition)” ที่มี ความสอดคล้องกับการตรวจพบแบคทีเรีย ดังภาพที่ 3.7



ภาพที่ 3.7 ชนิดของการทดสอบฐานกายภาพ (physical-based test kit)

สภาวะกายภาพของเนื้อสุกร

(physical condition of pork product)

สภาวะกายภาพของเนื้อสุกร ดังแผนภูมิที่ 3 ประกอบด้วย

1. สภาวะการเก็บรักษา (storage condition) พิจารณาปัจจัยทางกายภาพ ต่อไปนี้ คือ

- **อุณหภูมิ (temperature)** การเก็บรักษาเนื้อสุกร ณ จุดจำหน่ายตลาดสด เป็นการวางจำหน่ายโดยไม่มีการควบคุมอุณหภูมิ ดังนั้น อุณหภูมิในการเก็บรักษา จึงเป็นอุณหภูมิของอากาศในระหว่างวันที่จำหน่าย ในขณะเดียวกัน เนื้อสุกรที่รอจำหน่ายบางส่วนอาจจะมีการเก็บรักษาในตู้เย็นหรือตู้แช่ที่ควบคุมอุณหภูมิด้วย

- **ออกซิเจน (oxygen)** การเก็บรักษาเนื้อสุกร ณ จุดจำหน่ายตลาดสด โดยมากจะเป็นการเก็บรักษาแบบมีออกซิเจน (หรืออากาศ)

2. คุณสมบัติกายภาพที่ผิวเนื้อสุกร (physical properties) พิจารณาปัจจัยทางกายภาพต่อไปนี้ คือ

- **ความเป็นกรด-ด่าง (pH)** โดยมากจะเป็นการวัด Ultimate pH ที่ประมาณ 24 ชั่วโมง หลังการฆ่า (pH_{24}) อยู่ระหว่าง 5.5-6.2 อย่างไรก็ตาม ความเป็นกรด-ด่างของเนื้อสุกรที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 5.6-5.9

- **water activity (a_w)** ของเนื้อสุกร อยู่ระหว่าง 0.98-0.99 (Heinz and Hautzinger, 2007¹²) โดย water activity จะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับความชื้น (moisture)

การตรวจพบแบคทีเรีย

(Bacterial detection)

นิยามหรือความหมาย “การตรวจพบแบคทีเรีย” ในที่นี้ หมายถึง ผลสุทธิของการอยู่รอดและเจริญเติบโตที่ผิวเนื้อสุกรของแบคทีเรียเสื่อม ขึ้นอยู่กับ 2 เงื่อนไข คือ ¹ การปนเปื้อนเริ่มต้น (initial contamination) และ ² การเปลี่ยนแปลงการปนเปื้อน (dynamic contamination)

1. การปนเปื้อนเริ่มต้น (initial contamination)¹³

การปรากฏเริ่มต้นของแบคทีเรียเสื่อมในเนื้อสุกร มีที่มาจาก 2 แหล่งการปนเปื้อนหลัก คือ

1.1 ร่างกายสุกร (body) เช่น ผิวหนัง/ขน (hide & hair) ซาก (carcass) อุจจาระ (manure) และอวัยวะภายใน (visceral organs) เป็นต้น

1.2 สิ่งแวดล้อม (environment) เช่น เครื่องมือ/อุปกรณ์/เชือด พื้น/ผนัง/โรงเชือด บุคลากร น้ำใช้ อากาศ ภาชนะบรรจุ ยานพาหนะขนส่ง เป็นต้น

¹² Heinz, G. and Hautzinger, P. 2007. Meat processing technology for small-to-medium-scale producers.

¹³ Gill, C.O. and Greer, G.G. 1993. Enumeration and identification of meat spoilage bacteria. Technical Bulletin 1993-8E. ©Minister of Supply and Services Canada. Cat. No. 54-8/1993-8E ISBN 0-662-20963-X

ในระหว่างการเก็บรักษาเนื้อสัตว์ไม่ว่าจะเป็นอุณหภูมิอากาศและอุณหภูมิเย็น มีจุลินทรีย์เพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่ปรากฏปนเปื้อนเริ่มต้น (initial contamination) จะสามารถอยู่รอดและเจริญเติบโต (dynamic contamination) จนก่อให้เกิดการเสื่อมของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ได้ เช่น

- *Acinetobacter*
- *Brochothrix thermosphacta*
- *Enterobacteriaceae* (บาง spp.)
- lactic acid bacteria
- *Moraxella*
- *Pseudomonas*
- *Shewanella putrefaciens*

แบคทีเรียที่ปนเปื้อนแรกเริ่มที่ผิวซากสุกร (carcass) หลังการตัดแต่งจะเป็นแบคทีเรียที่พบได้ตามปกติที่หนังสัตว์ (skin commensal) รวมถึงแบคทีเรียจากดินและอุจจาระสัตว์ที่ปนเปื้อนที่หนังสัตว์ โดยมากแล้วจะเป็นแบคทีเรียชอบอุ่นย้อมติดสีแกรมบวกที่ผนังเซลล์ (Gram-positive mesophiles) เช่น *Micrococcus*, *Staphylococcus* และ *Bacillus* และส่วนน้อยที่เป็นแบคทีเรียชอบเย็นย้อมติดสีแกรมลบที่ผนังเซลล์ (Gram-negative psychrotrophes)

เมื่อซากสุกรผ่านการลวก (scalded) เฝาน (singed) และชุดชน (polished) ด้วยความร้อน ดังนั้นแบคทีเรียที่ยังคงปนเปื้อนอยู่ คือ แบคทีเรียที่ทนความร้อน (thermoduric : heat tolerant) ในกลุ่มที่ปนเปื้อนแรกเริ่ม คือ Gram-positive mesophiles และ Gram-negative psychrotrophes ซึ่งจะมีการปนเปื้อน Gram-negative psychrotrophes จากอุปกรณ์การชุดชนเพิ่มเติมขึ้นมาอีกด้วย

หากมีการลดอุณหภูมิซากสุกรให้เย็นลงระหว่าง 0-5°C (refrigerated temperatures) แบคทีเรียส่วนมากที่อยู่รอด/เจริญเติบโต/ต่อไป คือ Gram-negative psychrotrophes ในทางตรงกันข้าม หากฝังซากสุกรที่อุณหภูมิอากาศ (ambient temperature) แบคทีเรียส่วนมากที่อยู่รอด/เจริญเติบโต/ต่อไป คือ Gram-positive mesophiles แทน

การตัดแต่งซากสุกรจะก่อให้เกิดการถ่ายโอนแบคทีเรียจากผิวซากสุกรไปสู่ผิวหนังสุกร นอกจากนี้ยังมีการปนเปื้อน mesophiles เพิ่มเติมจากมือของผู้ปฏิบัติงาน และการปนเปื้อน psychrotrophes เพิ่มเติมจากอุปกรณ์ที่ไม่ได้รับการทำลายเชื้อและทำความสะอาดเพียงพอ สุขอนามัยในระหว่างการฆ่า การลดอุณหภูมิและการตัดแต่งทำให้มีการปนเปื้อนน้อยกว่า $10^3/\text{cm}^2$ และเป็น psychrotrophes ไม่เกินร้อยละ 5 (Gill and Greer, 1993)

2. การเปลี่ยนแปลงการปนเปื้อน (dynamic contamination)

แบคทีเรียที่ปรากฏในเนื้อสุกรในระยะเริ่มต้นจะแข่งขันกันเพื่อการอยู่รอดและเพิ่มจำนวนใน “สภาวะทางกายภาพของเนื้อสุกร (physical condition)” ดังแผนภูมิที่ 3 ตลอดระยะเวลาการขนส่ง (transportation) และการเก็บรักษา (storage) จนกระทั่งถึงจุดจำหน่าย (point of sale) โดยสามารถ

พิจารณาได้จาก 2 ปัจจัยเก็บรักษา (storage factors) คือ ¹อุณหภูมิ (temperature factor) ² ออกซิเจน (oxygen factor)

แบคทีเรียเสื่อมเด่น (dominated spoilage bacteria) คือ แบคทีเรียเสื่อมที่เริ่มต้นปนเปื้อนและมีการแข่งขันจนสามารถอยู่รอด/เจริญเติบโตจนมีระดับการปนเปื้อนที่มากกว่า (dominated) แบคทีเรียเสื่อมอื่นๆ ในเนื้อสุกตลอดระหว่างการเก็บรักษา จะขึ้นอยู่กับ 2 ปัจจัยหลัก (ลำดับความสำคัญจากมากไปน้อย) คือ

2.1 ระดับการปนเปื้อน (contamination level)

2.2 อัตราการเจริญเติบโต (growth rate)

กล่าวคือ แบคทีเรียเสื่อมที่ปนเปื้อนมากกว่า (heavy contamination) แม้ว่าจะมีอัตราการเจริญเติบโตช้ากว่า (slow growth) ท้ายสุดก็จะเป็นแบคทีเรียเสื่อมเด่นในเนื้อสุก

ปัจจัยอุณหภูมิ

(temperature factor)

แบคทีเรียเสื่อมเด่น (dominated spoilage bacteria) ในเนื้อสุกที่เก็บรักษาระหว่าง 0-5°C (refrigerated temperatures) แบบมีออกซิเจน (aerobic) คือ *Pseudomonas* spp. ตามมาด้วยแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจน (obligate aerobes) เช่น *Acinetobacter* และ *Moraxella* ในขณะที่ *Enterobacteriaceae*, and *Brochothrix thermosphacta* ที่ปนเปื้อนมากกว่าก็อาจจะกลายเป็นแบคทีเรียเด่นได้

แบคทีเรียเสื่อมที่ต้องการออกซิเจน เช่น *Pseudomonas* spp. จะเจริญเติบโตโดยสารอาหารแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำและมีขนาดโมเลกุลเล็ก เช่น การใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส (glucose) ก่อนจนกว่าจะหมด แล้วจึงเปลี่ยนไปใช้สารอาหารอื่น ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นแหล่งโปรตีน คือ กรดอะมิโน (amino acid) สิ่งที่เหลือจากการใช้ก็จะได้เป็นสารที่มีกลิ่นไม่ดี (malodorous compounds) ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการเสื่อมแบบมีออกซิเจน

ปัจจัยออกซิเจน

(oxygen factor)

การควบคุมแบคทีเรียเสื่อมที่เจริญเติบโตแบบมีออกซิเจนเนื้อสุก คือ การใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียเสื่อมเด่นยังคงเป็นแบคทีเรียเสื่อมที่ต้องการออกซิเจน ดังนั้น วิธีการที่มีประสิทธิภาพดี คือ การทำให้เป็นสุญญากาศ (vacuum) โดยการห่อหุ้มเนื้อสุกด้วยฟิล์มที่ยอมให้ออกซิเจนผ่านน้อย (low oxygen permeability) ทั้งนี้เซลล์กล้ามเนื้อยังสามารถใช้ออกซิเจนคงเหลือในบรรจุภัณฑ์และออกซิเจนปริมาณน้อยที่ผ่านฟิล์มได้

แบคทีเรียเสื่อมที่เจริญเติบโตแบบไม่มีหรือมีออกซิเจนน้อย สามารถแบ่งเป็นกลุ่มต่างๆ ตามความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่ผิวเนื้อสุก

- pH ปกติ ~ 5.5-5.8 เช่น lactic acid bacteria กลุ่ม
= *Carnobacterium*

= *Lactobacillus*

= *Leuconostoc*

- pH สูง > 5.8 เช่น

= *Brochothrix thermosphacta*

= *Enterobacteriaceae*

= *Shewanella putrefaciens*

แม้ว่า กลุ่ม *Enterobacteriaceae* (แบคทีเรียลำไส้) จะมีอัตราการเจริญเติบโตน้อยกว่า กลุ่ม lactic acid bacteria อย่างไรก็ตาม กลุ่ม *Enterobacteriaceae* กลับเป็นแบคทีเรียเสื่อมเด่น (dominated spoilage bacteria) แม้ว่าจะมีระดับการปนเปื้อนที่น้อยกว่าก็ตาม และมักจะก่อให้เกิดกลิ่นที่ไม่ดีด้วย

3.2 ชนิดแบคทีเรียเสื่อม (Spoilage bacteria)

3.2.1 กลุ่มแบคทีเรียเสื่อมสำคัญ¹⁴ (Significant spoilage groups)

1. กลุ่ม *Pseudomonas*

ลักษณะจุลชีววิทยา

- แกรมลบ รูปร่างท่อน (rod) เคลื่อนที่ได้ (motile)
- $a_w > 0.94$ (*P.fluorescens*)
- ต้องใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต (strictly aerobic) จึงมี Catalase และ Oxidase
- ใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรต คือ น้ำตาล (โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลูโคส) และไม่ผลิตก๊าซ
- ใช้แหล่งโปรตีน คือ กรดอะมิโน ได้ผลพลอยได้ที่มีกลิ่นไม่ดี (malodorous) กลิ่นเน่า (putrid) เช่น sulfide amine ester เป็นต้น

ลักษณะการเสื่อม

- แบคทีเรียเสื่อมเด่น ในเนื้อสุกรที่เก็บรักษา 0-5°C (chilled meat) แบบมีออกซิเจน
- *Pseudomonas* spp. ที่พบบ่อย คือ *P.fluorescens* และ *P.fragi*
- pH 5.5-5.8
- ผิวเนื้อสุกรปกติ ถ้ามีกลูโคสมาก จะเสื่อมที่ $10^8/\text{cm}^2$
- ผิวผลิตภัณฑ์ชนิด dark, firm, dry (DFD) ถ้ามีกลูโคสน้อย จะเสื่อมที่ $10^6/\text{cm}^2$
- เสื่อมสูงสุดที่ $10^9/\text{cm}^2$ พบลักษณะเมือก (slime) หนาจนออกซิเจนไม่สามารถซึมผ่านถึงเชื้อได้

2. กลุ่ม *Enterobacteriaceae*

ลักษณะจุลชีววิทยา

- แกรมลบ รูปร่างท่อน (rod) เคลื่อนที่ได้และไม่ได้ (motile และ non-motile)
- $a_w > 0.95$ (*E.coli*, *Salmonella*, *Klebsiella*)
- ใช้/ไม่ใช้/ออกซิเจนในการเจริญเติบโต (facultative anaerobe) มี Catalase ไม่มี Oxidase
- ใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรต คือ น้ำตาล และผลิตก๊าซ
- ใช้แหล่งโปรตีน คือ กรดอะมิโน ได้ผลพลอยได้ที่มีกลิ่นไม่ดี (malodorous) กลิ่นเน่า (putrid)

ลักษณะการเสื่อม

- แบคทีเรียเสื่อมเด่น ในเนื้อสุกรที่เก็บรักษา แบบไม่มีออกซิเจน ที่ pH > 5.8
- pH > 5.8

¹⁴ Gill, C.O. and Greer, G.G. 1993. Enumeration and identification of meat spoilage bacteria. Technical Bulletin 1993-8E. ©Minister of Supply and Services Canada. Cat. No. 54-8/1993-8E ISBN 0-662-20963-X

- เนื้อสุกรเย็น : *Serratia*, *Hafnia* และ *Enterobacter*
- เนื้อสุกรอุ่น : *Klebsiella* และ *E.coli*

3. กลุ่ม *Acinetobacter* & *Moraxella*

ลักษณะจุลชีววิทยา

Acinetobacter

- แกรมลบ รูปร่างกลม (cocci) รูปร่างท่อนกลม (coccobacilli) แบ่งตัวอยู่เป็นคู่ (diplococci) ไม่เคลื่อนที่ (non-motile)
- ต้องใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต (strictly aerobic) มี Catalase ไม่มี Oxidase
- ใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรต คือ น้ำตาล
- ไม่ใช้แหล่งโปรตีน

Moraxella

- แกรมลบ รูปร่างกลม (cocci) รูปร่างท่อนกลม (coccobacilli) แบ่งตัวอยู่เป็นคู่ (diplococci) ไม่เคลื่อนที่ (non-motile)
- ต้องใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต (strictly aerobic) จึงมี Catalase และ Oxidase
- ไม่ใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรต คือ น้ำตาล
- ใช้แหล่งโปรตีน แต่ไม่ก่อให้เกิดกลิ่นไม่ดี

ลักษณะการเสื่อม

- แบบที่เรียที่มีศักยภาพในการเสื่อม (potential spoilage) ที่เก็บรักษา 0-5°C (chilled meat)
- เสื่อมเนื้อสุกรโดยไม่ก่อให้เกิดกลิ่นไม่ดี

4. กลุ่ม Lactic acid bacteria

ลักษณะจุลชีววิทยา

- แกรมบวก รูปร่างท่อน (rod) และกลม (cocci) เคลื่อนที่ไม่ได้ (non-motile)
- $a_w > 0.95$ (*Lactobacillus viridescens*)
- ใช้/ไม่ใช้/ออกซิเจนในการเจริญเติบโต (facultative anaerobe) ไม่มี Catalase ไม่มี Oxidase
- ใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรต คือ น้ำตาล (โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลูโคส) และผลิตภัณฑ์แลคติก
- ใช้แหล่งโปรตีน คือ กรดอะมิโน ได้ผลพลอยได้ที่มีกลิ่นไม่ดี (malodorous) กลิ่นเน่า (putrid) และ กรดไขมัน (volatile fatty acid)

ลักษณะการเสื่อม

- แบบที่เรียที่มีศักยภาพในการเสื่อม (potential spoilage) เก็บรักษาไม่มีออกซิเจน pH ปกติ
- *Lactobacillus*, *Leuconostoc* และ *Carnobacterium*
- pH 5.5-5.8
- เสื่อมสูงสุดที่ $10^8/\text{cm}^2$

5. *Brochothrix thermosphacta*

ลักษณะจุลชีววิทยา

- แกรมบวก รูปร่างท่อน (rod) เคลื่อนที่ไม่ได้ (non-motile)
- ใช้/ไม่ใช้/ออกซิเจนในการเจริญเติบโต (facultative anaerobe) มี Catalase ไม่มี Oxidase
- ใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรต คือ น้ำตาล
 - = แบบไม่มีออกซิเจน : ผลิตกรดแลคติก
 - = แบบมีออกซิเจน : ผลิตกรดอะซิติก
- ใช้แหล่งโปรตีน คือ กรดอะมิโน ได้ผลพลอยได้ที่มีกลิ่นไม่ดี (aromatic odor)

ลักษณะการเสื่อม

- แบคทีเรียที่มีศักยภาพในการเสื่อม (potential spoilage) เก็บรักษามี/ไม่มีออกซิเจน pH > 5.8
- pH > 5.8

6. *Shewanella putrefaciens*

ลักษณะจุลชีววิทยา

- แกรมลบ รูปร่างท่อน (rod) เคลื่อนที่ได้ (motile)
- ใช้/ไม่ใช้/ออกซิเจนในการเจริญเติบโต (facultative anaerobe) มี Catalase และ Oxidase
- ใช้แหล่งโปรตีน คือ กรดอะมิโน ได้ผลพลอยได้ที่มีกลิ่นไม่ดี
- ใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรต คือ น้ำตาล

ลักษณะการเสื่อม

- แบคทีเรียเสื่อมแรกเริ่ม (initial potential spoilage) เก็บรักษามี/ไม่มีออกซิเจน pH > 6.0
- pH > 6.0

3.2.2 กลุ่มแบคทีเรียเสื่อมแรกเริ่ม¹⁵ (Initial spoilage group)

1. *Staphylococcus* spp.

- แกรมบวก รูปร่างกลม (cocci) ไม่เคลื่อนที่ (non-motile)
- $a_w > 0.85$ (*S.aureus*)
- ใช้/ไม่ใช้/ออกซิเจนในการเจริญเติบโต (facultative anaerobe) มี Catalase ไม่มี Oxidase
- ใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรต คือ น้ำตาล
- แหล่งปนเปื้อนจากผิวหนังปกติและมีแผลเปิด
- บางชนิดก่อโรคได้ จากสารพิษ (enterotoxin)
- เก็บรักษาที่อุณหภูมิอากาศ (mesophile)

¹⁵ Gill, C.O. and Greer, G.G. 1993. Enumeration and identification of meat spoilage bacteria. Technical Bulletin 1993-8E. ©Minister of Supply and Services Canada. Cat. No. 54-8/1993-8E ISBN 0-662-20963-X

- แบคทีเรียเสื่อมแรกเริ่ม (initial potential spoilage) เท่านั้น

2. *Micrococcus* spp.

- แกรมบวก รูปร่างกลม (cocci) ไม่เคลื่อนที่ (non-motile)
- $a_w > 0.93$ (*M. lysodeketicus*)
- ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต (strictly aerobic) มี Catalase ไม่มี Oxidase
- เก็บรักษาที่อุณหภูมิอากาศ (mesophile)
- แบคทีเรียเสื่อมแรกเริ่ม (initial potential spoilage) เท่านั้น

3. *Bacillus* spp.

- แกรมบวก รูปร่างท่อน (rod) เคลื่อนที่ได้และไม่ได้ (motile และ non-motile)
- $a_w > 0.95$ (*B. cereus*)
- $a_w > 0.90$ (*B. subtilis*)
- ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต (strictly aerobic) มี Catalase ไม่มี Oxidase
- แหล่งปนเปื้อนจากผิวหนัง
- เก็บรักษาที่อุณหภูมิอากาศ (mesophile)

โดยสรุป ลักษณะจุลชีววิทยาของแบคทีเรียเสื่อมสำคัญหรือจุลินทรีย์ก่อโรค ดังแสดงในตารางที่

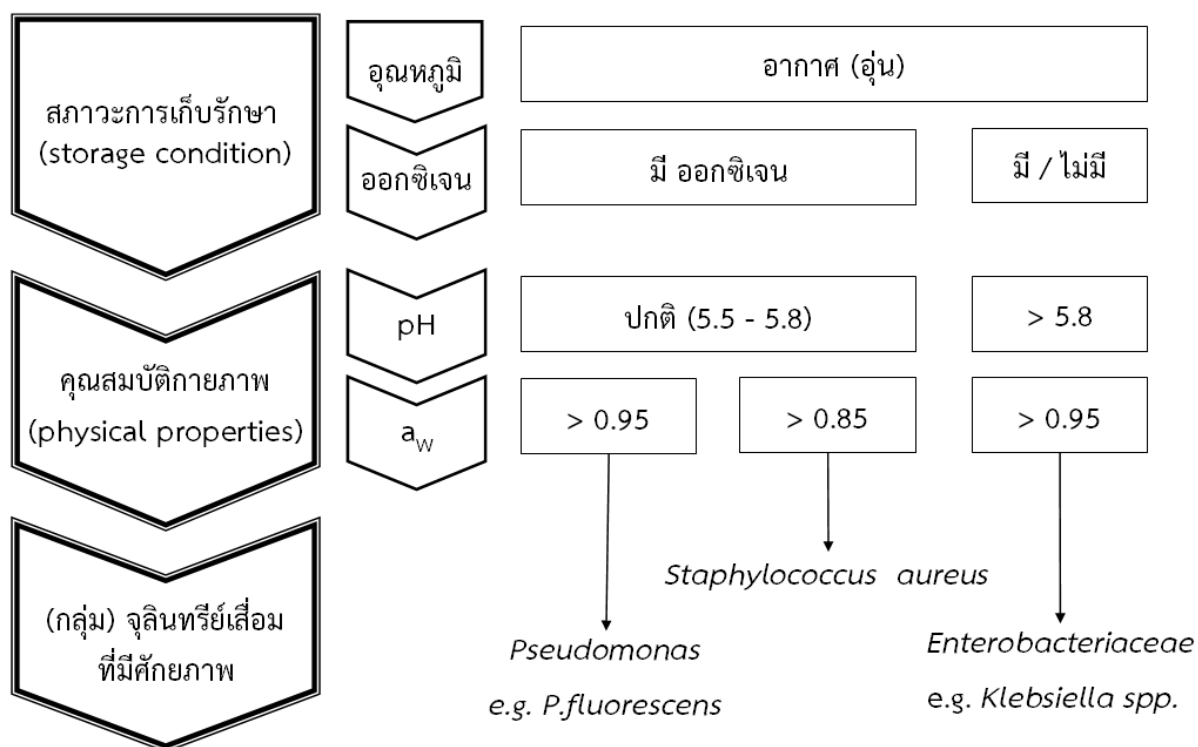
3.8

ตารางที่ 3.8 ลักษณะจุลชีววิทยาของแบคทีเรียเสื่อมสำคัญหรือจุลินทรีย์ก่อโรค

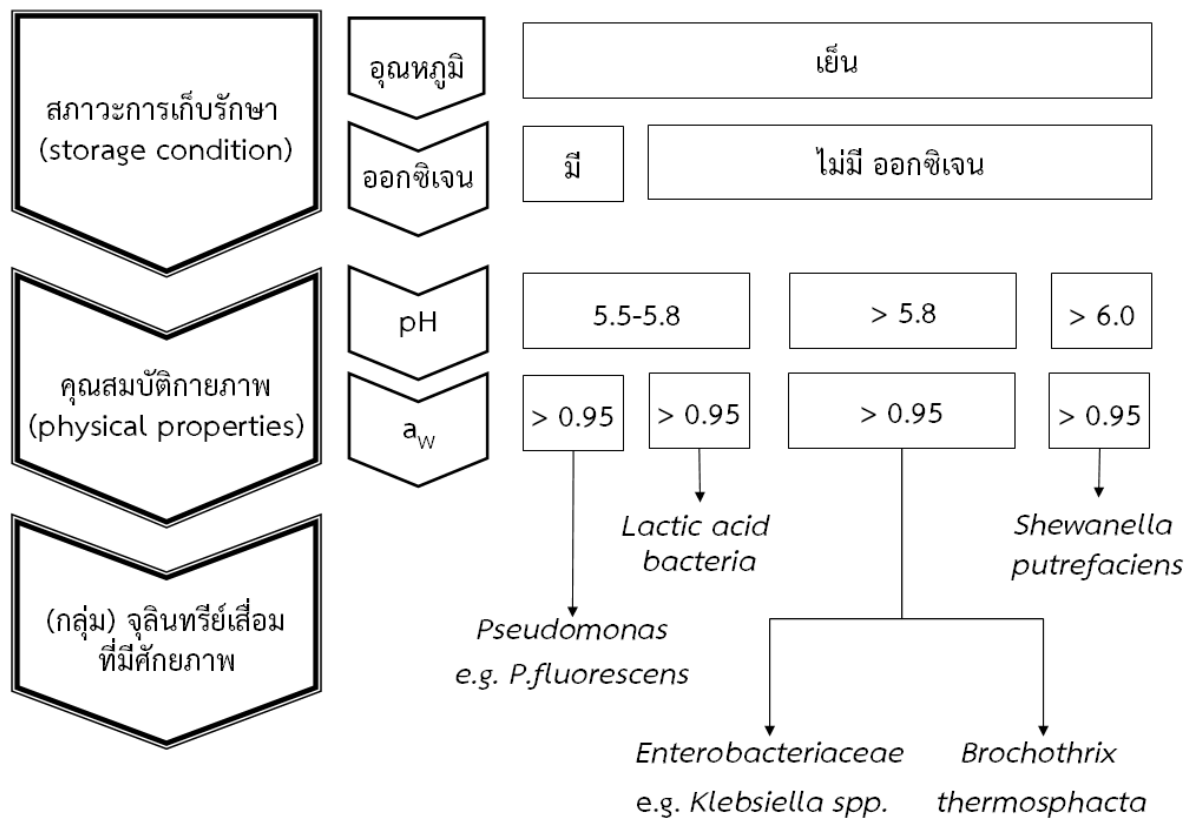
Spoilage bacterial group	Temperature	Oxygen	pH	a_w
<i>Pseudomonas</i>	Psychrotrophe	Strict aerobe	5.5-5.8	0.95
Lactic acid bacteria	Psychrotrophe	Facultative anaerobe	5.5-5.8	0.95
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Psychrotrophe	Facultative anaerobe	> 5.8 (anaerobic)	0.95
<i>Shewanella putrefaciens</i>	Psychrotrophe	Facultative anaerobe	> 6.0	n/a
<i>Enterobacteriaceae</i>	Mesophile	Facultative anaerobe	> 5.8 (anaerobic)	0.95
<i>Staphylococcus aureus</i>	Mesophile	Facultative anaerobe	6.8-7.2	0.87-0.90

ดัดแปลงจาก Gill and Greer, 1993

การเสื่อมเนื่องจากแบคทีเรียในเนื้อสุกร ณ จุดขาย จะพิจารณาจากสภาวะการเก็บรักษา (storage condition) ตามด้วยคุณสมบัติกายภาพที่ผิวเนื้อสุกร (physical properties) เมื่อพิจารณา ร่วมกับลักษณะจุลชีววิทยาของแบคทีเรียเสื่อมที่มีศักยภาพในการเสื่อมสูงและจุลินทรีย์ก่อโรค ดังตารางที่ 25 ทำให้สามารถคาดคะเน (predict) แบคทีเรียเสื่อมที่มีศักยภาพในการเสื่อมสูงและจุลินทรีย์ก่อโรค (pathogen) ในสภาวะกายภาพต่างๆ ของเนื้อสุกรที่เก็บรักษาในอุณหภูมิอากาศ (อุ่น) และ เย็น ดังภาพที่ 3.8 และ 3.9 ตามลำดับ



ภาพที่ 3.8 (กลุ่ม)จุลินทรีย์เสื่อมที่มีศักยภาพในการเก็บรักษาเนื้อสุกที่อุณหภูมิอากาศ (อุ่น)



ภาพที่ 3.9 (กลุ่ม)จุลินทรีย์เสื่อมที่มีศักยภาพในการเก็บรักษาเนื้อสุกที่อุณหภูมิเย็น

3.2.3 Spoilage bacteria หลักที่ใช้ในการพัฒนา test kit

(Major spoilage bacteria developed for test kit)

แบคทีเรียเสื่อมหลักที่ใช้ในการพัฒนา test kit เน้นแบคทีเรียที่มีความสอดคล้องกับการใช้กับทั้งชุดทดสอบฐานชีวเคมี (biochemical-based) และชุดทดสอบฐานกายภาพ (physical-based) ประกอบด้วย

1. กลุ่มแบคทีเรียเสื่อมสำคัญ (significant spoilage groups)

- กลุ่ม *Pseudomonas* เช่น
 - = *Pseudomonas fluorescens*
 - = *Pseudomonas putida*
- กลุ่ม *Enterobacteriaceae* เช่น
 - = *Klebsiella spp.*
 - = *E.coli*
 - = *Salmonella spp.*
 - = *Serratia marcescens*
- กลุ่ม *Acinetobacter* และ *Moraxella* เช่น
 - = *Acinetobacter baumannii*
 - = *Moraxella catarrhalis*
- *Shewanella putrefaciens*

2. กลุ่มแบคทีเรียเสื่อมแรกเริ่ม (initial spoilage group)

- *Staphylococcus aureus*
- *Micrococcus spp.* เช่น
 - = *Micrococcus luteus*
- กลุ่ม *Bacillus spp.* เช่น
 - = *Bacillus cereus*
 - = *Bacillus subtilis*

การทดสอบและพัฒนาชุดทดสอบฐานชีวเคมี (biochemical-based test kit) ประกอบด้วยหลายการทดสอบหลาย ซึ่งแบคทีเรียเสื่อมอาจจะให้ผลบวกหรือมีการตอบสนองแตกต่างกันไปตามแต่คุณสมบัติพื้นฐานทางชีวเคมีของแบคทีเรียเสื่อมนั้นๆ ดังนั้น จำนวนแบคทีเรียเสื่อมที่ใช้ในการทดสอบและพัฒนาชุดทดสอบฐานชีวเคมีจึงมีจำนวนแตกต่างกัน

รายชื่อและจำนวน isolate ของแบคทีเรียเสื่อมที่ใช้ในการทดสอบและพัฒนาชุดทดสอบฐานชีวเคมี (biochemical-based test kit) ดังแสดงในตารางที่ 3.9

ตารางที่ 3.9 จำนวน isolate ของแบคทีเรียเส้นที่ใช้ในการพัฒนา test kit

Gram	Micro-organisms	Catalase	Oxidase	Conductivity
Positive	<i>Bacillus cereus</i>	1	n/a*	-
	<i>Bacillus subtilis</i>	1	n/a	-
	<i>Micrococcus luteus</i>	1	1	-
	<i>Staphylococcus</i> (Coagulase +)	2	n/a	1
	<i>Staphylococcus</i> (Coagulase -)	2	n/a	1
Negative	<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	n/a	-
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	1	n/a	-
	<i>E. coli</i> ATCC 35218	1	n/a	-
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	n/a	-
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	n/a	2
	<i>Moraxella catarrhalis</i>	1	1	-
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3	4	1
	<i>Pseudomonas putida</i>	1	1	1
	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1	n/a	-
	<i>Salmonella</i> Typhimurium	1	n/a	-
	<i>Serratia marcescens</i>	1	n/a	-
	<i>Shewanella putrefaciens</i>	2	2	-
Total		22	9	6

* n/a ให้ผลลบต่อ Oxidase test

3.3 การศึกษาความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์แบคทีเรียเสื่อมและระดับการตอบสนองของ test kits เบื้องต้น

(Relationship of Concentration vs. Response of spoilage bacteria)

การศึกษาความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์แบคทีเรียและระดับการตอบสนอง test kits เบื้องต้น เน้นการทดสอบของชุดทดสอบฐานชีวเคมี โดยการตอบสนอง (response) ของจุลินทรีย์นี้จะต้องสามารถวัดปริมาณได้ และมีความสัมพันธ์กับระดับจุลินทรีย์ กล่าวคือ เมื่อจำนวนจุลินทรีย์เพิ่มจำนวนมากขึ้น การตอบสนองก็จะมีมากขึ้นตามสัดส่วน (เส้นตรง)

การศึกษาความสัมพันธ์ของการตอบสนองและระดับจุลินทรีย์ แบ่งเป็นการตอบสนองใน 2 ระดับ (ตารางที่ 3.10) คือ

1. การตอบสนองระดับห้องปฏิบัติการ (laboratory response) การศึกษาการตอบสนองระดับห้องปฏิบัติการมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจาก ผลการศึกษาความสัมพันธ์ที่ได้ มีประโยชน์ทำให้สามารถ

- ตรวจสอบความถูกต้องของการทดสอบ (validation) การสืบค้นทางวิชาการจำเป็นจะต้องมีการตรวจสอบเพื่อยืนยันผลการทดสอบที่แท้จริง
- ประเมินการตอบสนองต่อระดับแบคทีเรียเสื่อม (dose-response assessment) เป็นการพิจารณาสัดส่วนของการตอบสนอง เช่น การทดสอบ Oxidase และ Catalase
 - = การตอบสนองเชิงปริมาณ (degree) : ระดับความมากน้อยของการตอบสนอง
 - = การตอบสนองเชิงเวลา (duration) : ระยะเวลาในการสังเกตการตอบสนอง
- ชนิดของแบคทีเรียเสื่อมที่ทำให้การตอบสนอง (spoilage bacteria selection) เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ขั้นพื้นฐาน เพื่อใช้เป็นข้อมูลการคัดเลือกแบคทีเรียเสื่อมในการศึกษาความสัมพันธ์ระดับใช้งานภาคสนามต่อไป

ตารางที่ 3.10 การตอบสนองของการทดสอบโดยฐานชีวเคมี

การทดสอบ	การตอบสนอง (response)	
	ห้องปฏิบัติการ (laboratory)	ใช้งานภาคสนาม (practical)
Catalase	ร้อยละของการเกิดฟองอากาศ	ฟองอากาศ : มาก-ปานกลาง-น้อย
Oxidase	ระดับการดูดกลืนคลื่นแสง (absorbance)	สี : เข้ม-ปานกลาง-จาง
Conductivity	ค่าการนำไฟฟ้า (mS/cm)	ค่าการนำไฟฟ้า : มาก-ปานกลาง-น้อย

2. การตอบสนองระดับใช้งานภาคสนาม (practical response) ดังตารางที่ 3.10 ประกอบด้วย

2.1 การพัฒนารูปแบบการทดสอบภาคสนาม (develop practical platform) เป็นการปรับรูปแบบการตอบสนองจากระดับห้องปฏิบัติการให้มีความสอดคล้องกับการทดสอบภาคสนาม

2.2 การกำหนดระดับการตอบสนองกึ่งปริมาณ (semi-quantitative scaling) เนื่องจากข้อจำกัดด้านความละเอียดของประสาทสัมผัสของมนุษย์ในการแยกระดับการตอบสนอง ดังนั้น จำเป็นที่จะต้องปรับระดับการตอบสนองของรูปแบบการทดสอบภาคสนามให้สอดคล้องกับการทดสอบภาคสนาม คือ การกำหนดระดับการตอบสนองในลักษณะกึ่งปริมาณ เช่น ระดับมาก ระดับปานกลาง และระดับน้อย โดยที่ระดับการตอบสนองกึ่งปริมาณดังกล่าว (semi-quantitative response) จะมีความสอดคล้องกับระดับการปนเปื้อนแบคทีเรียเสื่อมกึ่งปริมาณด้วย (semi-quantitative spoilage contamination)

2.3 ตรวจสอบความถูกต้องของการทดสอบ (practical platform validation) เป็นขั้นตอนการตรวจสอบความถูกต้องของผลการตอบสนองในภาคสนาม ด้วยผลการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งสอดคล้องกับวัตถุประสงค์ของการเก็บตัวอย่างในรอบที่ 2 คือ

- เพื่อการทดสอบ test kit ในการประเมินการเสื่อมและการประเมินความเสี่ยง
- การเฝ้าระวังความเสี่ยงเพื่อเปรียบเทียบกับ “ค่าประมาณความเสี่ยงระดับพื้นฐาน” ที่ได้จากการเก็บตัวอย่างในช่วงที่ 1

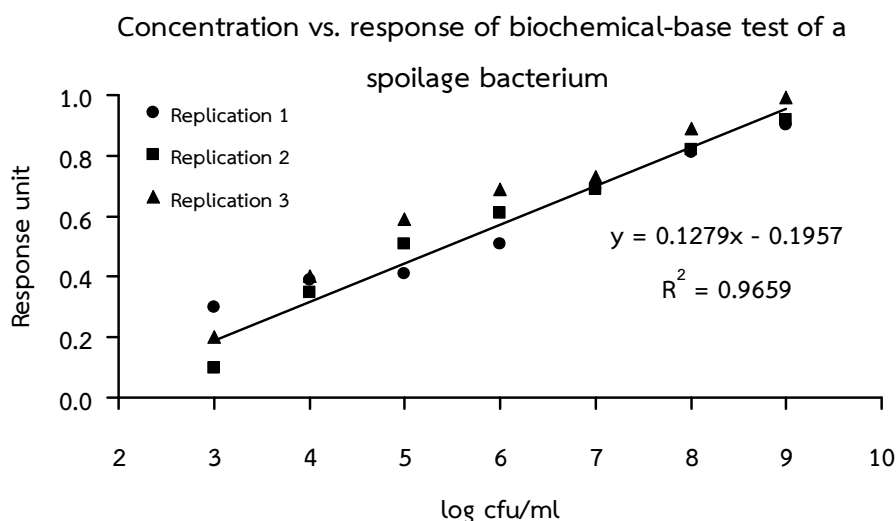
3.3.1 การศึกษาการตอบสนองของการทดสอบฐานชีวเคมีระดับห้องปฏิบัติการ

Response of biochemical-based test kit at laboratory scale

การศึกษาการตอบสนองของการทดสอบฐานชีวเคมี เป็นการพิจารณาสัดส่วนของการตอบสนองเชิงปริมาณ (degree) หรือ การตอบสนองเชิงเวลา (duration) โดยอาศัยหลักการประเมินการตอบสนองต่อปริมาณแบคทีเรียเสื่อม (dose response assessment) ด้วยการสร้างแบบจำลองหาความสัมพันธ์ของระดับแบคทีเรียเสื่อม (spoilage bacterial concentration) เป็นตัวแปรต้น (independent variable : X) และการตอบสนองเชิงปริมาณ (quantitative response) เป็นตัวแปรตาม (dependent variable : Y) โดยใช้สมการถดถอยเส้นตรงอย่างง่าย (simple linear regression model) ดังสมการ (3.2)

$$Y = a + bX \quad (3.2)$$

โดยที่ Y คือ การตอบสนองของการทดสอบ
 a คือ จุดตัดแกนตั้ง (แกน Y)
 b คือ ความชันของสมการเส้นตรง (slope)
 X คือ ปริมาณแบคทีเรียเสื่อม



ภาพที่ 3.10 ค่าการตอบสนอง (response unit) ต่อระดับแบคทีเรียเสื่อม (log cfu/ml) และ การวิเคราะห์การถดถอยอย่างง่าย (simple regression analysis)

จากภาพที่ 3.10 การวิเคราะห์การถดถอยอย่างง่ายได้ค่า r^2 และ $r = 0.9659$ และ 0.9828 ลำดับ ซึ่งทั้ง 2 ค่านี้มีความสำคัญในการประเมินความสัมพันธ์ของระดับแบคทีเรียเสื่อมต่อการตอบสนองของการทดสอบฐานชีวเคมี ดังรายละเอียดในหัวข้อ “สถิติในการวิเคราะห์การตอบสนอง” และ “การประเมินการทดสอบฐานชีวเคมีทางห้องปฏิบัติการ”

สถิติในการวิเคราะห์การตอบสนอง

การประเมินการตอบสนองของการทดสอบฐานชีวเคมีระดับห้องปฏิบัติการ พิจารณาจากผลการวิเคราะห์การถดถอยอย่างง่าย (simple regression analysis) (Daniel, 1987) ดังนี้

1. ความพอดีของการหาสมการถดถอยเส้นตรงอย่างง่ายกับค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ (goodness-of-fit : gof) พิจารณาจาก 2 ค่า คือ

1.1 coefficient of determination (r^2) มีค่าเป็นบวกเสมออยู่ระหว่าง 0 ถึง 1 เนื่องจากเป็นค่ายกกำลังสอง

- ค่า r^2 น้อย หมายความว่า ระดับ gof น้อย

- ค่า r^2 มาก หมายความว่า ระดับ gof มาก

1.2 p -value of F statistics เป็นการทดสอบนัยสำคัญทางสถิติของ r^2

- p -value ≥ 0.05 แสดงว่า สมการถดถอยเส้นตรงอย่างง่ายไม่เหมาะสมในการอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างระดับแบคทีเรียกับการตอบสนอง

- p -value < 0.05 แสดงว่า สมการถดถอยเส้นตรงอย่างง่ายมีความเหมาะสมในการอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างระดับแบคทีเรียกับการตอบสนองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (statistical significance)

2. ความสัมพันธ์ระหว่างระดับแบคทีเรียกับการตอบสนอง (level of association) พิจารณาจาก 2 ค่า คือ

2.1 correlation coefficient (r) มีค่าระหว่าง -1 ถึง +1 กล่าวคือ

- $r < 0$ หรือ ค่าลบ (negative) คือ ตัวแปรตาม (Y) แปรผกผัน กับตัวแปรต้น (X) โดยระดับการแปรผกผันมากขึ้น เมื่อ r เข้าใกล้ -1

- $r = 0$ คือ ตัวแปรตาม (Y) ไม่แปรผันตามตัวแปรต้น (X)

- $r > 0$ หรือ ค่าบวก (positive) คือ ตัวแปรตาม (Y) แปรผันตรง กับตัวแปรต้น (X) โดยระดับการแปรผันตรงมากขึ้น เมื่อ r เข้าใกล้ +1

2.2 p -value of t statistics เป็นการทดสอบนัยสำคัญทางสถิติของ r

- p -value > 0.05 แสดงว่า ความสัมพันธ์ของระดับแบคทีเรียและการตอบสนองไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

- p -value < 0.05 แสดงว่า ความสัมพันธ์ของระดับแบคทีเรียและการตอบสนองมีนัยสำคัญทางสถิติ (statistical significance)

การประเมินการทดสอบฐานชีวเคมีทางห้องปฏิบัติการ

การประเมินผลของการทดสอบฐานชีวเคมีในระดับห้องปฏิบัติการ ให้พิจารณาประกอบกันทั้งความพอดีของการหาสมการถดถอยอย่างง่ายและระดับความสัมพันธ์ระหว่างระดับแบคทีเรียกับการตอบสนอง กล่าวคือ

1. การวิเคราะห์การถดถอยอย่างง่าย (simple regression analysis) ควรจะมีนัยสำคัญทางสถิติ (statistical significance) ทั้ง 2 การทดสอบทางสถิติดังกล่าวข้างต้น หรือ มี $p\text{-value} < 0.05$ ทั้งกรณี F test (gof) และ t test (association)

2. การเปรียบเทียบค่า r ระหว่างแบคทีเรียเสื่อม (different spoilage bacteria) ในการทดสอบฐานชีวเคมีชนิดเดียวกัน (same test) กล่าวคือ

- แบคทีเรียเสื่อมที่มีค่า r ต่ำ แสดงว่า ให้การตอบสนองที่ต่ำกว่า เนื่องจาก มีระดับความสัมพันธ์ของระดับแบคทีเรียและการตอบสนองที่น้อยกว่า หมายความว่า การทดสอบฐานเคมีชนิดนี้สามารถใช้ตรวจหาระดับแบคทีเรียเสื่อมชนิดนี้ได้ไม่ตรง ดังนั้น จึงอาจจะบอกระดับความเสื่อมของเนื้อสุกรได้ไม่ دقیق
- แบคทีเรียเสื่อมที่มีค่า r สูง แสดงว่า ให้การตอบสนองที่ดีกว่า เนื่องจาก มีระดับความสัมพันธ์ของระดับแบคทีเรียและการตอบสนองที่สูงกว่า หมายความว่า การทดสอบฐานเคมีชนิดนี้สามารถใช้ตรวจหาระดับแบคทีเรียเสื่อมชนิดนี้ได้ดี เท่ากับเป็นการบอกระดับความเสื่อมของเนื้อสุกรได้ดีด้วย

3. การเปรียบเทียบค่า r ของแบคทีเรียเสื่อมชนิดเดียวกัน (same spoilage bacterium) ด้วยการทดสอบฐานชีวเคมีหลายชนิด (different tests) กล่าวคือ

- การทดสอบที่มีค่า r ต่ำ แสดงว่า ให้การตอบสนองที่ต่ำกว่า เนื่องจาก มีระดับความสัมพันธ์ของระดับแบคทีเรียและการตอบสนองที่น้อยกว่า หมายความว่า การทดสอบฐานเคมีชนิดนี้อาจจะไม่เหมาะสมในการตรวจหาระดับแบคทีเรียเสื่อมชนิดนี้ ดังนั้น การทดสอบนี้จึงอาจจะบอกระดับความเสื่อมของเนื้อสุกรได้ไม่ دقیق
- การทดสอบที่มีค่า r สูง แสดงว่า ให้การตอบสนองที่ดีกว่า เนื่องจาก มีระดับความสัมพันธ์ของระดับแบคทีเรียและการตอบสนองที่สูงกว่า หมายความว่า การทดสอบฐานเคมีชนิดนี้สามารถใช้ตรวจหาระดับแบคทีเรียเสื่อมชนิดนี้ได้ดี ดังนั้น การทดสอบนี้จึงสามารถบอกระดับความเสื่อมของเนื้อสุกรได้ดีด้วยนั้น

3.3.2 การทดสอบ Catalase ระดับห้องปฏิบัติการ (Catalase test at laboratory scale)

ตั้งแต่ ค.ศ. 1818 นาย Thenard ได้ค้นพบว่า Hydrogen peroxide (H_2O_2) ในเนื้อเยื่อของสัตว์สลายตัว (decompose) กลายเป็น น้ำ + ออกซิเจน ต่อมา ค.ศ. 1901 นาย Loew ได้ตั้งชื่อของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการเปลี่ยน Hydrogen peroxide ไปเป็นน้ำและออกซิเจน ว่า Catalase (Jasass and Fung, 1998)

Catalase เป็นเอนไซม์ที่เป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่ออวัยวะ และเม็ดเลือดแดง (erythrocyte) ของสัตว์ทุกชนิด รวมถึง พืชและจุลินทรีย์ทุกชนิดที่ต้องการออกซิเจน (aerobic microorganisms) เนื่องจาก Catalase ทำหน้าที่ในการป้องกันมิให้เซลล์สิ่งมีชีวิตได้รับพิษที่เกิดจาก Hydrogen peroxide ซึ่งเป็น metabolite ที่ได้จากการกำจัดออกซิเจนในรูปอนุมูลอิสระ

กล่าวคือ ออกซิเจนเป็น oxidant ที่แรงและสามารถทำปฏิกิริยากับส่วนประกอบของเซลล์ (ส่วนมากเป็น electron carrier) โดยไม่ต้องอาศัยเอนไซม์ แล้วกลายเป็นสารประกอบที่แรงขึ้นและอันตรายกับเซลล์มากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง

1. Superoxide radical (O_2^-) เป็นอนุมูลอิสระที่แรงมากและเป็นสาร reducing ที่ทำลายส่วนประกอบของเซลล์ที่สำคัญและ สร้างอนุมูลอิสระเพิ่มเมื่อทำปฏิกิริยากับน้ำ

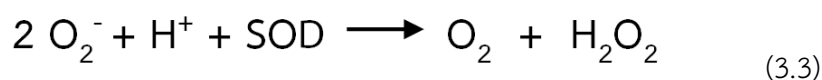
2. Hydrogen peroxide (H_2O_2) เป็น oxidizing agent ที่แรง สามารถทำลายโปรตีนและส่วนประกอบเซลล์ โดยเฉพาะส่วนประกอบของเซลล์(element)ที่รับผิดชอบการสร้างพลังงาน(energy-generating machinery)

ดังนั้นเซลล์สิ่งมีชีวิตที่อาศัยการสร้างพลังงานจากออกซิเจน จึงต้องมีกลไกเฉพาะที่จะกำจัดทั้ง O_2^- และ H_2O_2 เป็น 2 ขั้นตอน คือ

1. การกำจัด O_2^- (Superoxide radical)

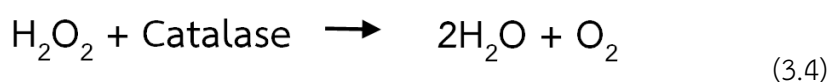
เซลล์สิ่งมีชีวิตใช้เอนไซม์ Superoxide dismutase (SOD) เปลี่ยน O_2^- ไปเป็น H_2O_2 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เซลล์ที่ใช้อากาศมักจะมีหลายเอนไซม์คล้ายๆ กับ SOD นี้อยู่ด้วย

ผลที่ได้จากปฏิกิริยาของ SOD คือ H_2O_2 ซึ่งยังเป็นพิษต่อเซลล์สิ่งมีชีวิตอยู่ ดังนั้น เซลล์จึงต้องอาศัย Catalase และ/หรือ peroxidase ในการกำจัด H_2O_2 ที่เป็นพิษต่อเซลล์



2. การกำจัด H_2O_2 (Hydrogen peroxide)

- Catalase เป็นเอนไซม์ที่สลาย (decompose) H_2O_2 อย่างมีประสิทธิภาพมาก แล้วได้ผลลัพธ์เป็นออกซิเจน(O_2)และน้ำ ปฏิกิริยาการสลาย H_2O_2 เร็วกว่าการสร้าง H_2O_2 ทำให้ระดับ H_2O_2 ที่อยู่ในเซลล์ไม่เป็นพิษมากนัก



- Peroxidases เป็นกลุ่ม enzyme ที่สลาย H_2O_2 และ เปอร์ออกไซด์อินทรีย์อื่นๆ โดยอาศัยตัวให้อิเลคตรอนอินทรีย์ (organic electron donor) แต่เป็นปฏิกิริยาที่มีประสิทธิภาพน้อย เนื่องจาก ต้องอาศัยตัวให้อิเลคตรอนซึ่งอาจจะใช้หมดไปได้ จึงต้องมีปฏิกิริยาอื่นที่ในการวนตัวให้อิเลคตรอนกลับมาทำงานซ้ำได้อีก (recycle)

โครงสร้างเคมีของ Catalase

Catalase เป็นโปรตีนที่เซลล์สังเคราะห์สร้างขึ้นจากกว่า 100 กรดอะมิโน ประกอบด้วย 4 ธาตุเหล็ก (iron) มีน้ำหนักประมาณ 220,000 Daltons มีประสิทธิภาพสูงในการสลาย Peroxide 44,000 โมเลกุล/วินาที ในขณะที่ cyanide, phenol, azide, hydrogen peroxide, ต่าง และ urea สามารถลดการทำงานของ Catalase ลงได้ ดังนั้น การทดสอบ Catalase โดยใช้สารตั้งต้น hydrogen peroxide ความเข้มข้นสูงเกินไป กลับอาจจะทำให้การทำงานของ Catalase ลดประสิทธิภาพลงได้ (Jasass and Fung, 1998)

อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะขึ้นอยู่กับ 3 ปัจจัยหลัก คือ

1. ความเข้มข้นของเอนไซม์ (concentration) อัตราการเกิดปฏิกิริยาแปรผันตรงกับความเข้มข้นของเอนไซม์ และจะเพิ่มขึ้นจนถึงอัตราเร็วสูงสุดเท่านั้น
2. อุณหภูมิ (temperature) อัตราการเกิดปฏิกิริยาแปรผันตรงกับอุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยา จนกระทั่งถึงอุณหภูมิ 45°C อย่างไรก็ตาม อัตราการเกิดปฏิกิริยากลับลดลง ณ อุณหภูมิที่สูงกว่า 45°C ต่อมาเอนไซม์จะเกิดการเสื่อมสภาพ (denature) จนไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ ณ อุณหภูมิที่สูงกว่า 55°C ในขณะที่เซลล์สิ่งมีชีวิตก็เริ่มถูกทำลายด้วยความร้อนเช่นเดียวกัน
3. ความเป็นกรด-ด่าง (pH) อัตราการเกิดปฏิกิริยามีได้มีความสัมพันธ์โดยตรงกับความเป็นกรด-ด่าง อย่างไรก็ตาม การเกิดปฏิกิริยาจะมีความเสถียร (stable) ในช่วง pH 3 ถึง 10 ในขณะที่การทำงานของเอนไซม์ลดลงนอกช่วง pH ดังกล่าว

คุณสมบัติการมี Catalase เป็นคุณสมบัติพื้นฐานของแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic respiration) ดังนั้น แบคทีเรียให้ผลบวกต่อการทดสอบ Catalase จึงมักจะเป็นแบคทีเรียกลุ่ม aerobic หรือ facultatively anaerobic (โดยไม่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติการย้อมติดสีของผนังเซลล์)

1. แบคทีเรียแกรมบวก (Gram's positive bacteria) เช่น
 - กลุ่ม *Bacillus*
 - กลุ่ม *Staphylococcus*
 - กลุ่ม *Micrococcus*
 - *Brochothrix thermosphacta*
2. แบคทีเรียแกรมลบ (Gram's negative bacteria)
 - กลุ่ม *Enterobacteriaceae* เช่น *Klebsiella*, *Serratia*, *Hafnia*, *Enterobacter*, *Escherichia coli* เป็นต้น

- กลุ่ม *Pseudomonas* เช่น *P.putida*, *P.fluorescens*, *P.fragi* เป็นต้น
- กลุ่ม *Acinetobacter/Moraxella* (*Psychrobacter*)
- *Shewanella* (*Alteromonas*) *putrefaciens*

โดยสรุป คือ แบคทีเรียเกือบทุกชนิดในเนื้อสัตว์ ยกเว้นกลุ่ม lactic acid bacteria (ซึ่งเป็นกลุ่ม anaerobic ถึง microaerophilic) ให้ผลบวกต่อการทดสอบ Catalase

แม้ว่าแบคทีเรียเกือบทุกชนิดจะให้ผลบวกต่อการทดสอบ Catalase แต่ระยะเวลาตอบสนองของแบคทีเรียต่อการทดสอบ Catalase แตกต่างกันไป ตามลำดับการตอบสนองต่อการทดสอบ Catalase คือ

1. *Micrococcus luteus* ให้ผลตอบสนองดีที่สุด
2. กลุ่ม *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas fluorescens*
3. *Escherichia coli* และ *Bacillus cereus*
4. *Salmonella* spp.

วิธีการทดสอบ Catalase

การทำงานของ Catalase (catalase activity) สามารถวัดได้หลายวิธี ดังนี้

1. วิธี Titrimetric

ปี ค.ศ. 1926 นาย Von Euler และนาย Josephson ได้พัฒนาวิธี titrimetric โดยการใช้ hydrogen peroxide ที่ทราบปริมาณแน่นอน นำผสมกับ phosphate buffer แล้วทำให้เย็นที่ 0°C จากนั้นเติมสารละลาย Catalase ลงไป จากนั้นจึงหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟูริก เป็นวิธีที่ดีที่สุดในการทดสอบ Catalase

2. วิธี Spectrophotometric

ปี ค.ศ. 1950 นาย Chance และ นาย Herbert ได้พัฒนาวิธีการวัดการทำงานของ Catalase โดย spectrophotometer กล่าวคือ hydrogen peroxide ยอมให้แสงผ่านได้ที่ความยาวคลื่นแสง 230-250 nm การทดสอบโดยการวัดแสงผ่านสารละลายผสมของ Catalase 1 ul ในการสลาย 1:5,000 hydrogen peroxide 3 มล. ลดลงในเวลา 10, 20, 30, 50 และ 70 วินาที

3. วิธี Manometric

ปี ค.ศ. 1948 นาย George ได้พัฒนาวิธีวัดการทำงานของ Catalase โดยการวัดปริมาณออกซิเจนที่เกิดขึ้นระหว่างการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง Catalase และ hydrogen peroxide วิธีนี้สามารถวัดความเร็วของการเกิดปฏิกิริยาได้ด้วย

4. วิธี Catalasemeter ด้วย Paper Disc System

บริษัท Bio-Engineering Group จำกัด เมือง New Haven รัฐ Cincinnati สหรัฐอเมริกา ได้พัฒนาเครื่องมือวัดเวลาการลอยตัว (floatation time) ของกระดาษกระดุม (paper disc) ที่มี catalase

การทดสอบทำได้โดยเติมสารละลาย 3% hydrogen peroxide (น้ำ และ EDTA 10^{-6} M.) 5 มล. ลงในหลอดทดลองและวางลงในเครื่องมือ แล้วนำ paper disc ชุบตัวอย่างไปวางลงในหลอดทดลองที่เตรียมไว้ทันที paper disc จะตกลงสู่ที่ผิวสารละลายด้วยแรงดึงดูดของโลก เริ่ม

จับเวลาตั้งแต่เริ่มวาง paper disc ลงในหลอดทดลอง (start) หากตัวอย่างมี Catalase ก็จะทำให้เกิดปฏิกิริยากับสารละลาย hydrogen peroxide ที่ก้นหลอด เกิดฟองอากาศ (gas bubbles) ขึ้นมา จนดันให้ paper disc ลอยตัวขึ้นมาจากผิวสารละลาย hydrogen peroxide ช่วงระยะเวลาหนึ่ง เมื่อ paper disc ตกลงสู่ผิวสารละลาย hydrogen peroxide ให้หยุดการจับเวลา (stop) ระยะเวลาตั้งแต่เริ่มจนหยุดปฏิกิริยา เรียกว่า เวลาการลอยตัว (floatation time) โดยเวลาการลอยตัวจะแปรผกผันกับการทำงานของ Catalase ทำให้สามารถใช้เครื่องมือในการวัดการทำงานของ Catalase ได้

5. วิธี Test tube

วิธีนี้สามารถวัดอัตราการเกิดปฏิกิริยาได้ โดยการใส่ตัวอย่างที่เป็นของแข็งหรือของเหลวลงในหลอดทดลองปัดเชื้อ จากนั้นเติมสารละลาย hydrogen peroxide ลงไป บันทึกผลการทดลองเป็น ระดับขึ้น คือ แรง (strong) ปานกลาง (moderate) น้อย (low) หรือ ไม่มี (no) นิยมใช้วิธีนี้ในการทดสอบการทำงานของ Catalase ในเนื้อสัตว์

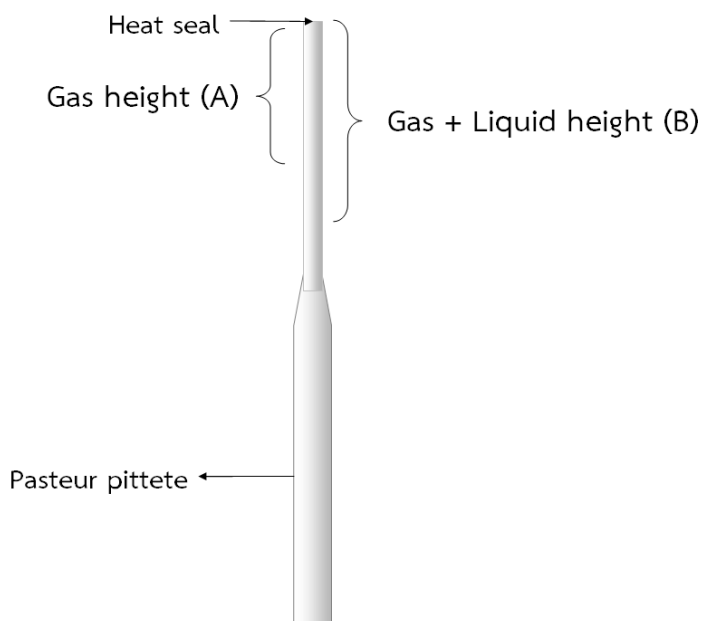
6. วิธี Capillary tube

ปี ค.ศ. 1985 นาย Fung ได้พัฒนาวิธีการใช้หลอด capillary อย่างง่ายๆ โดยการลนปิดปลายหลอด Pasteur pipette ด้านแคบด้วยความร้อน โดยการผสมสารละลาย hydrogen peroxide และ Catalase ให้ทำปฏิกิริยากันที่ปลาย Pasteur pipette ที่ลนปิดด้วยความร้อน เมื่อกลับหัวด้านที่ลนปิดด้วยความร้อนขึ้น ฟองอากาศ (gas bubbles) ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาก็จะลอยตัวสะสมที่ด้านบนของ Pasteur pipette โดยปริมาณฟองอากาศที่สะสมจะแปรผันตรงกับการทำงานของ Catalase (ภาพที่ 3.11)

การศึกษาเพื่อประเมินการตอบสนองต่อปริมาณแบคทีเรียเสื่อม (dose response assessment) ใช้วิธี Test tube (Fung and Petrachko, 1973; Jasass and Fung, 1998), เป็นวิธีการทดสอบ Oxidase ระดับห้องปฏิบัติการ

วิธีทำ (methods)

1. นำเชื้อที่บ่มใน Tryptic soy broth (TSB) มาทำ 4-fold serial dilution 6 ครั้ง ด้วย sterile normal saline (1 ml : 3 ml)
2. นำเชื้อที่ความเจือจางต่างๆ มาทำปฏิกิริยากับ 3% hydrogen peroxide ในอัตราส่วน 1 : 1 (300 ul : 300 ul หรือ 600 ul : 600 ul) ในหลอด Pasteur pipette ที่อุดปลายด้วยการลนด้วยความร้อน
3. สะบัดหลอด Pasteur pipette เพื่อให้ของเหลวทั้งหมดเข้าไปในปลายหลอด คว่ำหลอด Pasteur pipette รออ่านผลหลังจากเริ่มปฏิกิริยา 5 นาที
4. คำนวณ catalase activity (CA) โดย



ภาพที่ 3.11 การทดสอบการทำงานของ Catalase โดยวิธี Capillary tube

A คือ ความสูงเฉพาะฟองอากาศสะสมรวมที่ปลาย Pasteur pipette

B คือ ความสูงรวมของเหลวและฟองอากาศสะสมรวมที่ปลาย Pasteur pipette

$$\% \text{ Catalase Activity} = \frac{A}{B} \times 100 \quad (3.5)$$

5. ความเข้มข้นหรือปริมาณแบคทีเรียที่มาก จะมี Catalase มาก ก็จะมีฟองอากาศสะสมมาก (A) ทำให้ % Catalase activity (CA) มากตาม

ผลการประเมินการตอบสนองการทดสอบ Catalase ต่อระดับแบคทีเรียเสื่อม

ค่าสถิติที่ได้จากการทดสอบการตอบสนองด้วยการทดสอบ Catalase ต่อระดับแบคทีเรียเสื่อม
ดังแสดงในตารางที่ 3.11-3.12 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.11 ค่าเฉลี่ย r^2 และ r^{**} จากการวิเคราะห์การถดถอยอย่างง่าย โดยในการทดสอบ Catalase

Micro-organisms	r^2	P -value	r	p -value
<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain 1	0.42 ^s	0.016	0.65 ^s	< 0.025
<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain 2	0.96 ^s	5×10^{-9}	0.98 ^s	< 0.001
<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain 3	0.89 ^s	1×10^{-6}	0.94 ^s	< 0.001
<i>Pseudomonas putida</i>	0.68 ^s	0.001	0.82 ^s	< 0.001
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	0.04	0.720	0.19	> 0.05
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.21	0.300	0.46	> 0.05
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0.47 ^s	0.01	0.68 ^s	< 0.01
<i>Staphylococcus aureus</i> (Coagulase +) strain 1	0.87 ^s	2×10^{-4}	0.93 ^s	< 0.001
<i>Staphylococcus aureus</i> (Coagulase +) strain 2	0.94 ^s	8×10^{-5}	0.97 ^s	< 0.001
<i>Staphylococcus aureus</i> (Coagulase -) strain 1	0.67 ^s	0.05	0.82 ^s	< 0.05
<i>Staphylococcus aureus</i> (Coagulase -) strain 2	0.01	0.76	0.10	> 0.05
<i>Shewanella putrefaciens</i> 1	0.77 ^s	8×10^{-6}	0.88 ^s	< 0.001
<i>Shewanella putrefaciens</i> 2	0.85 ^s	2×10^{-5}	0.92 ^s	< 0.001

* ค่า r^2 : ความเหมาะสมของสมการในการอธิบายค่าที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ (goodness-of-fit)

** ค่า r : ระดับความสัมพันธ์ของความเข้มข้นเซลล์แบคทีเรียเสื่อมกับการตอบสนองของการทดสอบฐานชีวเคมี

s : มีนัยสำคัญทางสถิติ (statistical significance) มี p -value < 0.05

ตารางที่ 3.12 ค่าเฉลี่ย r^2 และ r^{**} จากการวิเคราะห์การถดถอยอย่างง่าย โดยในการทดสอบ Catalase

Micro-organisms	r^2	p -value	r	p -value
<i>E.coli</i> ATCC 35218	0.38	0.19	0.62	> 0.05
<i>E.coli</i> ATCC 25922	0.71 ^s	0.02	0.84 ^s	< 0.025
<i>Salmonella</i> Typhimurium	0.14	0.62	0.38	> 0.05
<i>Salmonella</i> Enteritidis	0.82 ^s	7×10^{-4}	0.91 ^s	< 0.001
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0.24	0.09	0.49	> 0.05
<i>Serratia marcescens</i>	0.73 ^s	2×10^{-4}	0.86 ^s	< 0.001
<i>Micrococcus luteus</i>	0.93 ^s	0.04	0.96 ^s	< 0.05
<i>Moraxella catarrhalis</i>	1.00 ^s	9×10^{-4}	1.00 ^s	< 0.001
<i>Bacillus cereus</i>	0.83 ^s	0.004	0.91 ^s	< 0.01
<i>Bacillus subtilis</i>	0.58 ^s	0.05	0.76 ^s	< 0.05
<i>Hafnia alvei</i>	0.82	0.28	0.91	> 0.05

* ค่า r^2 : ความเหมาะสมของสมการในการอธิบายค่าที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ (goodness-of-fit)

** ค่า r : ระดับความสัมพันธ์ของความเข้มข้นเซลล์แบคทีเรียเกี่ยวกับการตอบสนองของการทดสอบฐานชีวเคมี

s : มีนัยสำคัญทางสถิติ (statistical significance) มี p -value < 0.05

สรุปผลการตอบสนองระดับห้องปฏิบัติการ (laboratory response) ของการทดสอบ Catalase

1. ตรวจสอบการทดสอบ Catalase มีการตอบสนองที่ถูกต้อง (valid) ในลักษณะเชิงเส้น
2. ประเมินการตอบสนองต่อปริมาณแบคทีเรียเสื่อม (dose-response assessment) พบการตอบสนองเชิงปริมาณ (degree) ตามระดับความมากน้อยของการตอบสนอง
3. แบคทีเรียเสื่อมที่ให้การตอบสนอง (spoilage bacteria selection) เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ขั้นพื้นฐาน เพื่อใช้เป็นข้อมูลการคัดเลือกแบคทีเรียเสื่อมในการศึกษาความสัมพันธ์ระดับใช้งานภาคสนามต่อไป ประกอบด้วย
 1. *Pseudomonas fluorescens*
 2. *Pseudomonas putida*
 3. *Klebsiella oxytoca*
 4. *Staphylococcus aureus* (Coagulase +)
 5. *Staphylococcus aureus* (Coagulase -)
 6. *Shewanella putrifaciens*
 7. *E.coli*
 8. *Salmonella* spp.

9. *Serratia marcescens*
10. *Micrococcus luteus*
11. *Moraxella catarrhalis*
12. *Bacillus cereus*
13. *Bacillus subtilis*

4. การทดสอบ Catalase สามารถใช้ประเมินระดับความเสื่อมของเนื้อสุกร เนื่องจาก การปนเปื้อนของ

= แบคทีเรียเสื่อมหลัก (major spoilage bacteria) เช่น

- *Enterobacteriaceae* เช่น *Klebsiella* spp., *E.coli* และ *Salmonella* spp.
- *Pseudomonas* spp.

= แบคทีเรียก่อโรค เช่น

- *Staphylococcus aureus*
- *Salmonella* spp.
- *Bacillus cereus*

= แบคทีเรียเสื่อมแรกเริ่ม (initial spoilage group)

- *Staphylococcus aureus*
- กลุ่ม *Micrococcus* spp.
- กลุ่ม *Bacillus* spp.

5. การทดสอบ Catalase สามารถนำไปพัฒนาต่อเนื่อง เพื่อศึกษาการตอบสนองระดับใช้งานภาคสนาม (practical response) สำหรับแบคทีเรียเสื่อม และ แบคทีเรียก่อโรค คือ *Klebsiella* spp. *Pseudomonas* spp. และ *Staphylococcus aureus*

6. การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนแบคทีเรียเสื่อม และ แบคทีเรียก่อโรค ในการเก็บตัวอย่างรอบที่ 2 ประกอบด้วย *Klebsiella* spp. *Pseudomonas* spp. และ *Staphylococcus aureus*

7. ดังนั้น การพัฒนาต่อเนื่องในการศึกษาการตอบสนองระดับใช้งานภาคสนาม (practical response) จึงมีความสอดคล้องกับการวิเคราะห์การปนเปื้อนในการเก็บตัวอย่างรอบที่ 2 และ เท่ากับ เป็นการตรวจสอบการใช้งานได้จริงของชุดทดสอบด้วย

3.3.3 การทดสอบ Oxidase ระดับห้องปฏิบัติการ (Oxidase test at laboratory scale)

คุณสมบัติการมี Oxidase เป็นคุณสมบัติพื้นฐานของแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน หรือ ต้องการใช้ออกซิเจนเป็น final electron acceptor ในการหายใจแบบใช้ออกซิเจน (aerobic respiration)

ประวัติ

แรกเริ่มเมื่อปี ค.ศ. 1928 นาย Gordon และ นาย McLeod¹⁶ ได้ใช้การทดสอบ Oxidase เพื่อการแยก *Neisseria gonorrhoeae* ซึ่งให้ผลบวกต่อการทดสอบ Oxidase (oxidase positive) ออกจาก *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. ซึ่งให้ผลลบต่อการทดสอบ Oxidase (oxidase negative) โดย oxidase reagent ที่ใช้คือ Di-methyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride (DMPD)

และต่อมาในปี ค.ศ. 1956 นาย Kovac¹⁷ ได้พัฒนาการทดสอบให้มีการตอบสนองที่เร็วขึ้นโดยใช้ Tetra-methyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD) เป็น oxidase reagent โดยเป็นการทดสอบบนกระดาษกรอง (Filter paper method) โดยดูการเกิดสีน้ำเงินเข้ม (Dark blue)

และต่อมาในปี ค.ศ. 1957 นาย Gaby และ นาย Hadley¹⁸ ได้ปรับปรุง (modified) การทดสอบ Oxidase โดยใช้ *p*-amino dimethyl aniline oxalate ร่วมกับ α -naphthol ในการทดสอบ Oxidase ในหลอดทดลอง (test tube method) โดยดูการเกิดสีน้ำเงินเข้ม (Dark blue) เช่นเดียวกัน

ขั้นตอนสุดท้ายของการหายใจเพื่อสร้างพลังงานของแบคทีเรีย เกี่ยวข้องกับการถ่ายโอนอิเล็กตรอน (ประจุลบ) ใน electron transport system โดย cytochrome oxidase จะกระตุ้นปฏิกิริยาการให้อิเล็กตรอน (oxidation) จาก cytochrome C แล้วส่งต่อไปให้กับ oxygen รับอิเล็กตรอน (reduction) ในสภาวะที่มีโปรตรอน (ประจุบวก) ได้เป็นน้ำในที่สุด

วัตถุประสงค์

การทดสอบ Oxidase เป็นการทดสอบ เพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของ Oxidase ของแบคทีเรียในการหายใจโดยมี oxygen เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย (final electron acceptor)

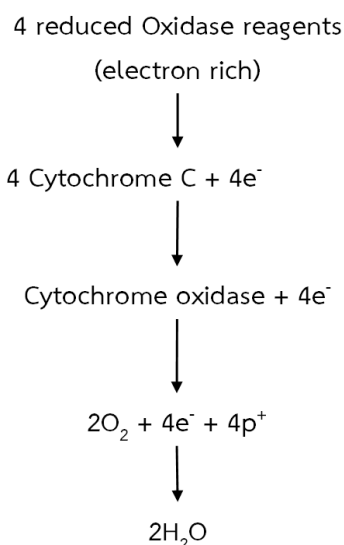
หลักการทดสอบ Oxidase

¹⁶ Gordon, J., and J. W. McLeod. 1928. The practical application of the direct oxidase reaction in bacteriology. J. Pathol. Bacteriol. 31:185–190.

¹⁷ Kovács, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature (London) 178::703.

¹⁸ Gaby, W. L., and C. Hadley. 1957. Practical laboratory test for the identification of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 74:356–358.

การใช้ Oxidase reagent ในสถานะที่มีอิเล็กตรอน ทำหน้าที่ให้เสมือนเป็น cytochrome C ในการถ่ายโอนอิเล็กตรอนให้กับ oxygen โดยการกระตุ้นปฏิกิริยานี้ด้วย cytochrome oxidase ดังภาพที่ 3.12



ภาพที่ 3.12 การเกิดปฏิกิริยาของการทดสอบ Oxidase

Oxidase reagent ที่ใช้ในการทดสอบ Oxidase นิยมใช้ 2 ชนิด คือ

1. Di-methyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride (DMPD)
2. Tetra-methyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD)

ในสถานะที่ Oxidase reagent รับ electron โดยอยู่ในรูป reduced TMPD หรือ reduced DMPD จะไม่มีสี (no color) แต่เมื่อ reduced Oxidase reagent ส่ง electron ให้กับ cytochrome C แล้ว reduced oxidase reagent จะเปลี่ยนรูปเป็น oxidised Oxidase reagent ที่มีสี (color)

ชนิดของการทดสอบ Oxidase

การทดสอบ Oxidase มี วิธี คือ

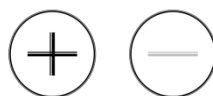
1. วิธี Filter Paper
2. วิธี Filter Paper Spot
3. วิธี Direct Plate
4. วิธี Test Tube

วิธี Filter paper (ภาพที่ 3.13)

1. แห่กระดาษกรองกระดุม (filter paper disc) ในสารละลาย 1% Kovács oxidase¹⁹ จากนั้นทิ้งไว้ให้แห้ง

¹⁹ 1% tetra-methyl-*p*-phenylenediamine (TMPD) dihydrochloride ละลายน้ำ แล้วเก็บในที่เย็น ไม่มีแสง ได้นาน 1 สัปดาห์

2. ใช้ loop เชี่ยวโคโลนีแบคทีเรียแยกเดี่ยวที่เพาะเลี้ยงใหม่ ประมาณ 18 ถึง 24 ชั่วโมง ป้ายลงบนกระดาษกรองที่เตรียมไว้
3. สังเกตการเกิดสี



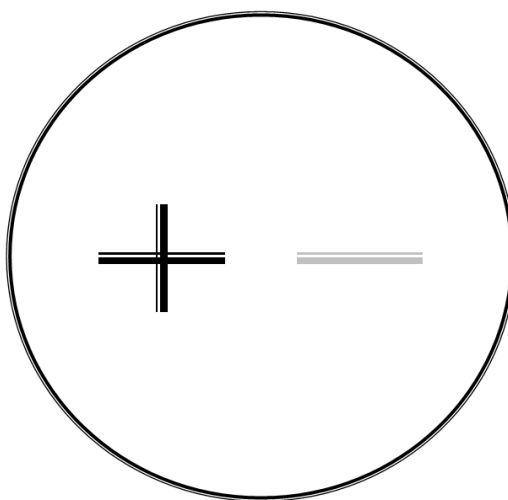
ภาพที่ 3.13 การทดสอบ Oxidase ชนิด filter paper

4. การแปลผลการทดสอบ

- ผลบวก (positive) : เกิดสีม่วงเข้ม (dark purple) ภายใน 5-10 วินาที
- ผลบวกหน่วง (delayed positive) : เกิดสีม่วงเข้ม (dark purple) ภายใน 60-90 วินาที
- ผลลบ (negative) : ไม่เกิดสี หรือ เกิดสีภายหลัง 120 วินาที

วิธี Filter Paper Spot (ภาพที่ 3.14)

1. ใช้ loop เชี่ยวโคโลนีแบคทีเรียแยกเดี่ยวที่เพาะเลี้ยงใหม่ ประมาณ 18 ถึง 24 ชั่วโมง ป้าย (smear) ลงบนกระดาษกรอง
2. หยดสารละลาย 1% Kovács oxidase ลงบนแบคทีเรียที่ป้ายไว้ที่กระดาษกรอง
3. สังเกตการเกิดสี



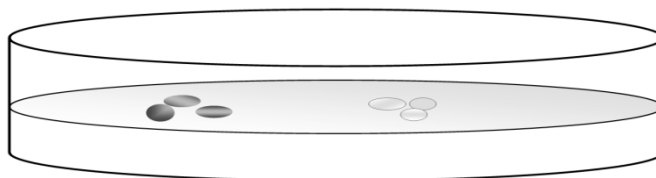
ภาพที่ 3.14 การทดสอบ Oxidase ชนิด filter paper spot

4. การแปลผลการทดสอบ

- ผลบวก (positive) : เกิดสีม่วงเข้ม (dark purple) ภายใน 5-10 วินาที
- ผลบวกหน่วง (delayed positive) : เกิดสีม่วงเข้ม (dark purple) ภายใน 60-90 วินาที
- ผลลบ (negative) : ไม่เกิดสี หรือ เกิดสีภายหลัง 120 วินาที

วิธี Direct Plate (ภาพที่ 3.15)

1. เพาะเลี้ยงแบคทีเรียใหม่ประมาณ 18 ถึง 24 ชั่วโมง บน nutrient agar โดยให้ได้แบคทีเรียแยกเดี่ยว
2. หยดสารละลาย 1% Kovács oxidase หรือ สารละลาย 1% Gordon and McLeod²⁰ ลงบน โคโลนีแบคทีเรียแยกเดี่ยว ระวังไม่คว่ำ หรือ หยดสารละลายจนท่วมจานอาหารเลี้ยงเชื้อ
3. สังเกตการเกิดสี



ภาพที่ 3.15 การทดสอบ Oxidase ชนิด direct plate

4.1 การแปลผลการทดสอบกรณีใช้ สารละลาย 1% Kovács oxidase

- ผลบวก (positive) : เกิดสีม่วงเข้ม (dark purple) ภายใน 5-10 วินาที
 ผลบวกหน่วง (delayed positive) : เกิดสีม่วงเข้ม (dark purple) ภายใน 60-90 วินาที
 ผลลบ (negative) : ไม่เกิดสี หรือ เกิดสีภายหลัง 120 วินาที

4.1 การแปลผลการทดสอบกรณีใช้ สารละลาย 1% Gordon and McLeod

- ผลบวก (positive) : เกิดสีแดง ภายใน 10-30 นาที
 หรือ : เกิดสีดำ ภายใน 60 นาที
 ผลลบ (negative) : ไม่เกิดสี

วิธี Test Tube

การศึกษาเพื่อประเมินการตอบสนองต่อปริมาณแบคทีเรียเสื่อม (dose response assessment)

ใช้วิธี Test tube เป็นวิธีการทดสอบ Oxidase ระดับห้องปฏิบัติการ

วิธี test tube ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้วิธีต้นแบบที่พัฒนาโดยนาย Gaby และ Hadley โดยใช้สารเคมีต้นแบบ²¹ และปรับลดสารเคมีลง เพื่ออาจจะช่วยลดต้นทุนและเพิ่มความสะดวกในการพัฒนาเป็นชุดทดสอบระดับใช้งานภาคสนามได้

การศึกษาวีธี test tube นี้สามารถแบ่งตามชนิดของ oxidase reagent ที่ใช้ได้เป็น 3 วิธี เพื่อเป็นทางเลือก (options) ในการพัฒนาการทดสอบ Oxidase ระดับใช้งานภาคสนาม ดังนี้

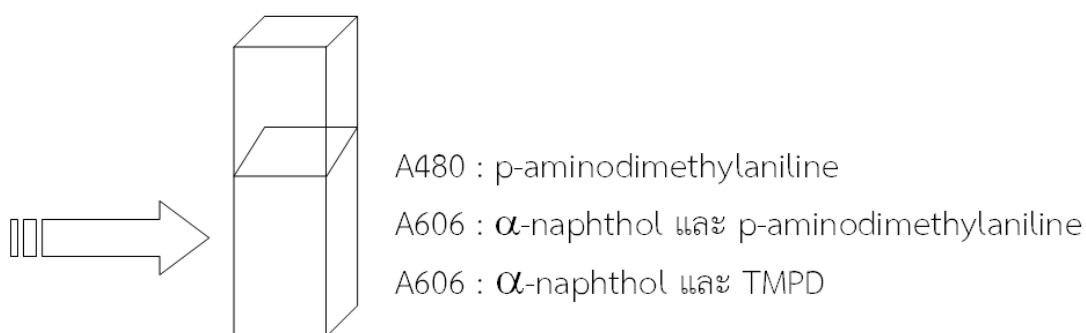
- สารละลาย 1% p-aminodimethylaniline oxalate (DMPD)
- สารละลาย 1% alpha-naphthol และ 1% p-aminodimethylaniline oxalate (DMPD)
- สารละลาย 1% alpha-naphthol และ 1% tetra-methyl-p-phenylenediamine (TMPD) dihydrochloride

²⁰ 1% dimethyl-p-phenylenediamine (DMPD) dihydrochloride ละลายในน้ำ แล้วเก็บในที่เย็น ไม่มีแสง ได้นาน 1 สัปดาห์

²¹ 0.2 ml of 1% alpha-naphthol ผสมกับ 0.3 ml of 1% p-aminodimethylaniline oxalate

วิธีทำ (methods)

1. เพาะเลี้ยงแบคทีเรียใหม่ประมาณ 18 ถึง 24 ชั่วโมง บน tryptic soy agar หรือ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่นที่ไม่มีน้ำตาล เช่น nutrient agar เนื่องจาก จะเกิดการห้ามปฏิกิริยา Oxidase
2. เลือกโคโลนีแบคทีเรียละลายใน 0.85% สารละลายน้ำเกลือ 4 มล. เพื่อปรับความเข้มข้นให้ได้ประมาณ 0.5 McFarland (ความเข้มข้นประมาณ $8 \log \text{cfu/ml}$)
3. เจือจางสารละลายแบคทีเรียลง 4 เท่าต่อเนื่อง (4-fold serial dilution) จำนวน 6 ครั้ง ด้วยสารละลายน้ำเกลือ 0.85%
4. ใช้สารละลายแบคทีเรีย 4.5 มล. ผสมกับ สารละลาย Oxidase reagent
5. รอการเกิดปฏิกิริยานาน 60 วินาที



ภาพที่ 3.16 การวัดการดูดกลืนแสงของผลผลิตที่ได้จาก oxidase reagent

6. วัดการดูดกลืนแสง (absorbance) ใน cuvette ด้วยเครื่อง spectrophotometer (ภาพที่ 3.16)
 - p-aminodimethylaniline oxalate (DMPD) ความยาวคลื่น 480 nm
 - α -naphthol + p-aminodimethylaniline oxalate (DMPD) ความยาว 606 nm
 - α -naphthol + tetra-methyl-p-phenylenediamine (TMPD) ความยาว 606 nm

ผลการประเมินการตอบสนองการทดสอบ Oxidase ต่อระดับแบคทีเรียเสื่อม

ค่าสถิติที่ได้จากการทดสอบการตอบสนองด้วย Oxidase reagent 3 ชนิดต่อระดับแบคทีเรียเสื่อม ดังแสดงในตารางที่ 3.13-3.15 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.13 ค่า r^2 และ r^{**} จากการวิเคราะห์การถดถอยอย่างง่าย โดยใช้ p-aminodimethylaniline oxalate (DMPD) เป็น oxidase reagent

Spoilage bacteria	Replication 1				Replication 2				Replication 3			
	r^2	p-value	r	p-value	r^2	p-value	r	p-value	r^2	p-value	r	p-value
<i>Pseudomonas fluorescens</i> J	0.82 ^s	0.005	0.91 ^s	< 0.010	0.49	0.081	0.70	> 0.05	0.67 ^s	0.024	0.82 ^s	< 0.025
<i>Pseudomonas fluorescens</i> K13	0.75 ^s	0.012	0.87 ^s	< 0.025	0.59 ^s	0.045	0.77 ^s	< 0.05	0.75 ^s	0.012	0.86 ^s	< 0.025
<i>Pseudomonas fluorescens</i> K27	0.71 ^s	0.018	0.84 ^s	< 0.025	0.46	0.094	0.68	> 0.05	0.89 ^s	0.001	0.94 ^s	< 0.01
<i>Pseudomonas fluorescens</i> K36	0.72 ^s	0.016	0.85 ^s	< 0.025	0.70 ^s	0.019	0.84 ^s	< 0.025	0.73 ^s	0.014	0.86 ^s	< 0.025
<i>Pseudomonas putida</i>	0.62 ^s	0.035	0.79 ^s	< 0.050	0.60 ^s	0.040	0.78 ^s	< 0.05	0.66 ^s	0.027	0.81 ^s	< 0.05
<i>Shewanella putrifaciens</i> str. 1	0.80 ^s	0.006	0.90 ^s	< 0.010	0.92 ^s	0.001	0.96 ^s	< 0.001	0.62 ^s	0.036	0.79 ^s	< 0.05
<i>Shewanella putrifaciens</i> str. 2	0.74 ^s	0.013	0.86 ^s	< 0.010	0.69 ^s	0.021	0.83 ^s	< 0.025	0.56	0.051	0.75	> 0.05
<i>Micrococcus luteus</i>	0.64 ^s	0.031	0.80 ^s	< 0.050	0.60 ^s	0.040	0.78 ^s	< 0.05	0.70 ^s	0.019	0.84 ^s	< 0.025
<i>Moraxella catarrhalis</i>	0.75 ^s	0.011	0.87 ^s	< 0.025	0.42	0.114	0.65	> 0.05	0.53	0.065	0.73 ^s	> 0.05

* ค่า r^2 : ความเหมาะสมของสมการในการอธิบายค่าที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ (goodness-of-fit)

** ค่า r : ระดับความสัมพันธ์ของความเข้มข้นเซลล์แบคทีเรียเสื่อมกับการตอบสนองของการทดสอบฐานชีวเคมี

s : มีนัยสำคัญทางสถิติ (statistical significance) มี p-value < 0.05

ตารางที่ 3.14 ค่า r^2 * และ r^{**} จากการวิเคราะห์การถดถอยอย่างง่าย โดยใช้ alpha-naphthol + p-aminodimethylaniline oxalate (DMPD) เป็น oxidase reagent

Spoilage bacteria	Replication 1				Replication 2				Replication 3			
	r^2	p-value	r	p-value	r^2	p-value	r	p-value	r^2	p-value	R	p-value
<i>Pseudomonas fluorescens</i> J	1.00 ^s	0.0003	1.00 ^s	< 0.001	0.99 ^s	0.0004	1.00 ^s	< 0.001	0.22	0.293	0.46	> 0.05
<i>Pseudomonas fluorescens</i> K13	0.99 ^s	0.0031	1.00 ^s	< 0.01	0.98 ^s	0.001	0.99 ^s	< 0.01	0.66 ^s	0.027	0.81 ^s	< 0.05
<i>Pseudomonas fluorescens</i> K27	0.96 ^s	0.0180	0.98 ^s	< 0.025	0.94 ^s	0.006	0.97 ^s	< 0.01	0.89 ^s	0.001	0.94 ^s	< 0.01
<i>Pseudomonas fluorescens</i> K36	1.00 ^s	0.0025	1.00 ^s	< 0.01	0.91 ^s	0.011	0.96 ^s	< 0.025	0.78 ^s	0.008	0.88 ^s	< 0.01
<i>Pseudomonas putida</i>	0.95 ^s	0.0263	0.97 ^s	< 0.05	0.92 ^s	0.010	0.96 ^s	< 0.01	0.76 ^s	0.011	0.87 ^s	< 0.01
<i>Shewanella</i> spp. strain 1	1.00 ^s	0.0001	1.00 ^s	< 0.001	0.95 ^s	0.004	0.98 ^s	< 0.01	0.05	0.623	0.23	> 0.05
<i>Shewanella</i> spp. strain 2	1.00 ^s	0.0002	1.00 ^s	< 0.001	0.90 ^s	0.013	0.95 ^s	< 0.025	0.89 ^s	0.001	0.94 ^s	< 0.01
<i>Micrococcus luteus</i>	1.00 ^s	0.0005	1.00 ^s	< 0.001	0.80 ^s	0.041	0.89 ^s	< 0.05	0.79 ^s	0.008	0.89 ^s	< 0.01
<i>Moraxella catarrhalis</i>	0.98 ^s	0.0077	0.99 ^s	< 0.01	0.92 ^s	0.010	0.96 ^s	< 0.025	0.31	0.197	0.55	> 0.05

* ค่า r^2 : ความเหมาะสมของสมการในการอธิบายค่าที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ (goodness-of-fit)

** ค่า r : ระดับความสัมพันธ์ของความเข้มข้นเซลล์แบคทีเรียเกี่ยวกับการตอบสนองของการทดสอบฐานชีวเคมี

s : มีนัยสำคัญทางสถิติ (statistical significance) มี p-value < 0.05

ตารางที่ 3.15 ค่า r^2 * และ r^{**} จากการวิเคราะห์การถดถอยอย่างง่าย โดยใช้ alpha-naphthol + tetra-methyl-p-phenylenediamine (TMPD) เป็น oxidase reagent

Spoilage bacteria	Replication 1				Replication 2				Replication 3			
	r^2	p-value	r	p-value	r^2	p-value	r	p-value	r^2	p-value	r	p-value
<i>Pseudomonas fluorescens</i> J	0.77 ^s	0.009	0.88 ^s	< 0.01	0.99 ^s	0.003	1.00 ^s	< 0.01	0.65	0.053	0.81	> 0.05
<i>Pseudomonas fluorescens</i> K13	0.93 ^s	0.0004	0.97 ^s	< 0.001	0.60	0.225	0.77	> 0.05	0.95 ^s	0.001	0.97 ^s	< 0.01
<i>Pseudomonas fluorescens</i> K27	0.82 ^s	0.005	0.91 ^s	< 0.01	0.98 ^s	0.010	0.99 ^s	< 0.025	0.51	0.112	0.71	> 0.05
<i>Pseudomonas fluorescens</i> K36	0.18	0.344	0.42	> 0.05	0.87	0.066	0.93	> 0.05	0.29	0.272	0.54	> 0.05
<i>Pseudomonas putida</i>	0.68 ^s	0.022	0.83 ^s	< 0.025	0.87	0.070	0.93	> 0.05	0.91 ^s	0.003	0.96 ^s	< 0.01
<i>Shewanella</i> spp. strain 1	0.70 ^s	0.018	0.84 ^s	< 0.025	0.87	0.066	0.93	> 0.05	0.97 ^s	0.0005	0.98 ^s	< 0.001
<i>Shewanella</i> spp. strain 2	0.84 ^s	0.004	0.92 ^s	< 0.01	0.99 ^s	0.003	1.00 ^s	< 0.01	0.43	0.157	0.66	> 0.05
<i>Micrococcus luteus</i>	0.62 ^s	0.036	0.79 ^s	< 0.05	0.84	0.084	0.92	> 0.05	0.72 ^s	0.033	0.85 ^s	< 0.05
<i>Moraxella catarrhalis</i>	0.77 ^s	0.009	0.88 ^s	< 0.01	0.81	0.100	0.90	> 0.05	0.87 ^s	0.007	0.93 ^s	< 0.01

* ค่า r^2 : ความเหมาะสมของสมการในการอธิบายค่าที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ (goodness-of-fit)

** ค่า r : ระดับความสัมพันธ์ของความเข้มข้นเซลล์แบคทีเรียเกี่ยวกับการตอบสนองของการทดสอบฐานชีวเคมี

s : มีนัยสำคัญทางสถิติ (statistical significance) มี p-value < 0.05

สรุปผลการตอบสนองระดับห้องปฏิบัติการ (laboratory response) ของการทดสอบ Oxidase

1. ตรวจสอบการทดสอบ Oxidase มีการตอบสนองที่ถูกต้อง (valid) ในลักษณะเชิงเส้น
2. ประเมินการตอบสนองต่อปริมาณแบคทีเรียเสื่อม (dose-response assessment) พบการตอบสนองเชิงปริมาณ (degree) ตามระดับความมากน้อยของการตอบสนอง
3. แบคทีเรียเสื่อมที่ทำให้การตอบสนอง (spoilage bacteria selection) เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ขั้นพื้นฐาน เพื่อใช้เป็นข้อมูลการคัดเลือกแบคทีเรียเสื่อมในการศึกษาความสัมพันธ์ระดับใช้งานภาคสนามต่อไป ประกอบด้วย

1. *Pseudomonas fluorescens*
2. *Pseudomonas putida*
3. *Klebsiella pneumoniae*
4. *Shewanella putrefaciens*
5. *Staphylococcus aureus*

4. ดังนั้น การทดสอบ Oxidase สามารถใช้ประเมินระดับความเสื่อมของเนื้อสุกร เนื่องจาก การปนเปื้อนของ

= แบคทีเรียเสื่อมหลัก (major spoilage bacteria) เช่น

- *Enterobacteriaceae* เช่น *Klebsiella* spp.

- *Pseudomonas* spp.

= แบคทีเรียก่อโรค เช่น

- *Staphylococcus aureus*

5. การทดสอบ Oxidase สามารถนำไปพัฒนาต่อเนื่อง เพื่อศึกษาการตอบสนองระดับใช้งานภาคสนาม (practical response) สำหรับแบคทีเรียเสื่อม และ แบคทีเรียก่อโรค คือ *Klebsiella* spp. *Pseudomonas* spp. และ *Staphylococcus aureus*

6. การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนแบคทีเรียเสื่อม และ แบคทีเรียก่อโรค ในการเก็บตัวอย่างรอบที่ 2 ประกอบด้วย *Klebsiella* spp. *Pseudomonas* spp. และ *Staphylococcus aureus*

7. ดังนั้น การพัฒนาต่อเนื่องในการศึกษาการตอบสนองระดับใช้งานภาคสนาม (practical response) จึงมีความสอดคล้องกับการวิเคราะห์การปนเปื้อนในการเก็บตัวอย่างรอบที่ 2 และ เท่ากับเป็นการตรวจสอบการใช้งานได้จริงของชุดทดสอบด้วย

3.3.4 การทดสอบ Electrical conductivity ระดับห้องปฏิบัติการ (Electrical conductivity test at laboratory scale)

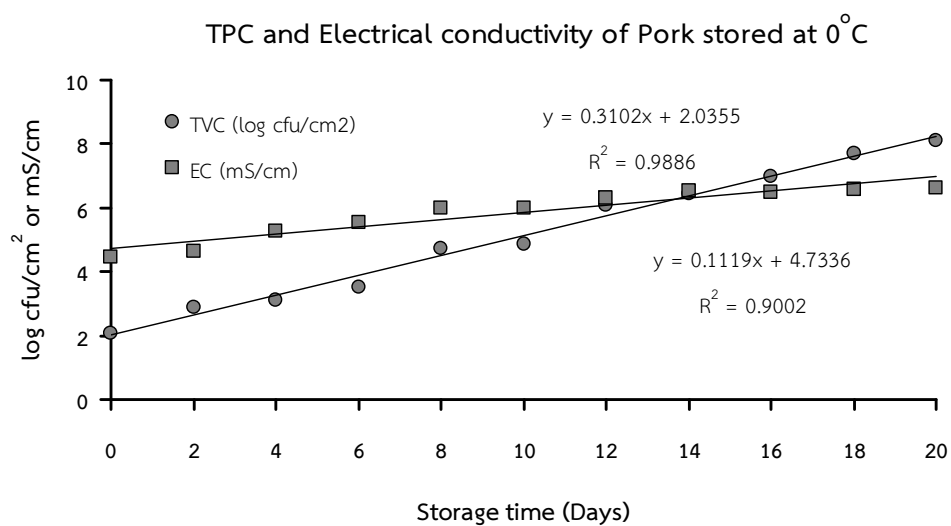
มีการศึกษาความสัมพันธ์ของ Total plate count (TPC) และการนำไฟฟ้า (Electrical conductivity: EC) ในเนื้อสุกร ซึ่งมีสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (correlation coefficient) ตลอดการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 0 °ซ และ 4 °ซ เท่ากับ 0.91 และ 0.89 (Byun et al., 2003) ดังตารางที่ 3.16

ตารางที่ 3.16 ความสัมพันธ์ปริมาณจุลินทรีย์ปนเปื้อนและการนำไฟฟ้าเนื้อสุกรเก็บรักษา 0 °ซ และ 4 °ซ

Storage time (day)	Stored at 0°C		Stored at 4°C	
	TPC (log cfu/cm ²)	Electrical conductivity (mS/cm)	TPC (log cfu/cm ²)	Electrical conductivity (mS/cm)
0	2.06	4.46	2.06	4.46
2	2.90	4.64	3.00	5.46
4	3.13	5.25	3.16	6.07
6	3.50	5.52	4.94	6.21
8	4.73	5.99	5.41	6.57
10	4.88	5.98	6.11	6.59
12	6.09	6.32	7.31	7.23
14	6.42	6.54	n/a	n/a
16	6.98	6.48	n/a	n/a
18	7.71	6.58	n/a	n/a
20	8.11	6.62	n/a	n/a

ดัดแปลงจาก Byun et al., 2003

จากตารางที่ จะเห็นได้ว่า การนำไฟฟ้าของเนื้อสุกรเริ่มต้นประมาณ 4-5 mS/cm และจะเพิ่มขึ้น สอดคล้องตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาที่ยาวนานขึ้น ไม่ว่าจะเป็นที่ 0 °ซ หรือ 4 °ซ เป็นที่น่าสังเกตว่า อัตราการเพิ่มขึ้นของการปนเปื้อนแบคทีเรียจะสูงกว่าอัตราการเพิ่มขึ้นของการนำไฟฟ้า ดังภาพที่ 3.17



ภาพที่ 3.17 ความสัมพันธ์ของอัตราการเพิ่มแบคทีเรียรวมและการนำไฟฟ้าในเนื้อสุกรเก็บรักษาที่ 0°C

ผลการประเมินการตอบสนองการทดสอบ Electrical conductivity ต่อระดับแบคทีเรียเสื่อม

ค่าสถิติที่ได้จากการทดสอบการตอบสนองด้วยการทดสอบ Electrical conductivity ต่อปริมาณแบคทีเรียเสื่อม ดังแสดงในตารางที่ 3.17

ตารางที่ 3.17 ค่า r^2 * และ r ** จากการวิเคราะห์การถดถอยอย่างง่ายของ Electrical conductivity ต่อระดับแบคทีเรียเสื่อม

Spoilage bacteria	Replication 1				Replication 2				Replication 3			
	r^2	p-value	r	p-value	r^2	p-value	r	p-value	r^2	p-value	r	p-value
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.55	0.15	0.74	> 0.05	0.03	0.76	0.19	> 0.05	0.03	0.76	0.19	> 0.05
<i>Pseudomonas putida</i>	0.07	0.66	0.27	> 0.05	0.77	0.05	0.88	> 0.05	0.77	0.05	0.88	> 0.05
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 1	0.89 ^s	0.02	0.94 ^s	< 0.025	0.57	0.14	0.76	> 0.05	0.57	0.14	0.76	> 0.05
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 2	0.94 ^s	0.01	0.97 ^s	< 0.01	0.06	0.69	0.24	> 0.05	0.06	0.69	0.24	> 0.05
<i>Staphylococcus</i> (Coagulase +)	0.48	0.19	0.69	> 0.05	0.89 ^s	0.02	0.94 ^s	< 0.025	0.89 ^s	0.02	0.94 ^s	< 0.025
<i>Staphylococcus</i> (Coagulase -)	0.92 ^s	0.01	0.96 ^s	< 0.01	0.39	0.26	0.62	> 0.05	0.39	0.26	0.62	> 0.05

* ค่า r^2 : ความเหมาะสมของสมการในการอธิบายค่าที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ (goodness-of-fit)

** ค่า r : ระดับความสัมพันธ์ของความเข้มข้นเซลล์แบคทีเรียเสื่อมกับการตอบสนองของการทดสอบฐานชีวเคมี

s : มีนัยสำคัญทางสถิติ (statistical significance) มี $p\text{-value} < 0.05$

สรุปผลการตอบสนองระดับห้องปฏิบัติการ (laboratory response) ของการทดสอบ Electrical conductivity

1. ตรวจสอบการทดสอบ Electrical conductivity มีการตอบสนองที่ถูกต้อง (valid) ในลักษณะเชิงเส้น
2. ประเมินการตอบสนองต่อปริมาณแบคทีเรียเสื่อม (dose-response assessment) พบการตอบสนองเชิงปริมาณ (degree) ตามระดับความมกน้อยของการตอบสนอง
3. แบคทีเรียเสื่อมที่ทำให้การตอบสนอง (spoilage bacteria selection) เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ขั้นพื้นฐาน เพื่อใช้เป็นข้อมูลการคัดเลือกแบคทีเรียเสื่อมในการศึกษาความสัมพันธ์ระดับใช้งานภาคสนามต่อไป ประกอบด้วย
 1. *Klebsiella pneumoniae*
 2. *Staphylococcus aureus*
4. ดังนั้น การทดสอบ Electrical conductivity สามารถใช้ประเมินระดับความเสื่อมของเนื้อสุกรเนื่องจาก การปนเปื้อนของ
 - = แบคทีเรียเสื่อมหลัก (major spoilage bacteria) เช่น
 - *Enterobacteriaceae* เช่น *Klebsiella* spp.
 - = แบคทีเรียก่อโรค เช่น
 - *Staphylococcus aureus*
5. การทดสอบ Electrical conductivity สามารถนำไปพัฒนาต่อเนื่อง เพื่อศึกษาการตอบสนองระดับใช้งานภาคสนาม (practical response) สำหรับแบคทีเรียเสื่อม และ แบคทีเรียก่อโรค คือ *Klebsiella* spp. และ *Staphylococcus aureus*
6. การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนแบคทีเรียเสื่อม และ แบคทีเรียก่อโรค ในการเก็บตัวอย่างรอบที่ 2 ประกอบด้วย *Klebsiella* spp. และ *Staphylococcus aureus*
7. ดังนั้น การพัฒนาต่อเนื่องในการศึกษาการตอบสนองระดับใช้งานภาคสนาม (practical response) จึงมีความสอดคล้องกับการวิเคราะห์การปนเปื้อนในการเก็บตัวอย่างรอบที่ 2 และ เท่ากับเป็นการตรวจสอบการใช้งานได้จริงของชุดทดสอบด้วย

3.4 การศึกษาความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์แบคทีเรียเสื่อมและระดับการตอบสนองของ test kits กับเนื้อสุกร

(Relationship of Concentration vs. Response of spoilage bacteria on pork)

ชุดทดสอบฐานชีวเคมี

ชุดทดสอบฐานชีวเคมี ประกอบด้วย 2 การทดสอบ คือ “Oxidase test” และ “Catalase test” เนื่องจาก ผ่านคุณสมบัติการทดสอบเบื้องต้นในห้องปฏิบัติการ คือ

1. การตอบสนองที่ถูกต้อง (valid) ในลักษณะเชิงเส้น
2. การตอบสนองต่อปริมาณแบคทีเรียเสื่อม (cell response assessment) พบการตอบสนองเชิงปริมาณ (degree) ตามระดับความมากน้อยของการตอบสนอง
3. การทดสอบเพิ่มเติม คือ การตอบสนองของเซลล์แบคทีเรียบนเนื้อสุกรจริง ประกอบด้วย การทดสอบทางห้องปฏิบัติการ (laboratory level) และการทดสอบภาคสนาม (practical level)

ชุดทดสอบฐานกายภาพ

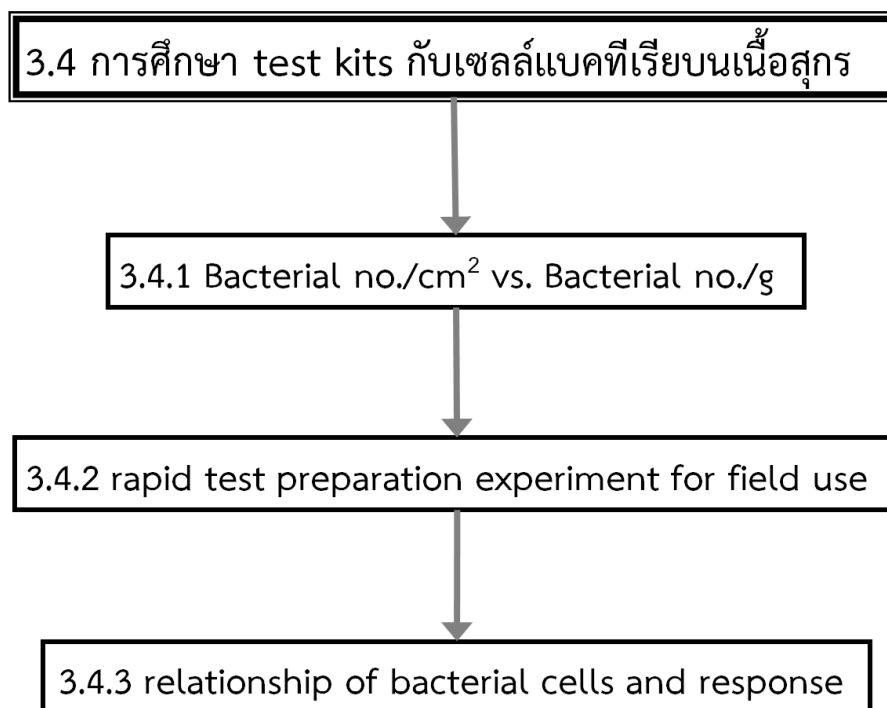
ชุดทดสอบฐานกายภาพเป็นการพิจารณา “สภาวะกายภาพของเนื้อสุกร” ที่เอื้ออำนวยหรือสนับสนุน (support) ต่อการอยู่รอดและ/หรือเจริญเติบโตของแบคทีเรียเสื่อม

กล่าวคือ เป็นการศึกษา ^{1.} สภาวะการเก็บรักษาเนื้อสุกร ณ จุดจำหน่ายที่เป็นตลาดสดทั่วไป เช่น อุณหภูมิ และ ออกซิเจน ผนวกกับ ^{2.} คุณสมบัติทางกายภาพที่ผิวเนื้อสุกร เช่น pH และ water activities ซึ่งเป็น จะขอเรียกโดยรวมทั้ง 2 ส่วนนี้ว่า “สภาวะทางกายภาพของเนื้อสุกร (physical condition)” ที่มีความสอดคล้องกับการตรวจพบแบคทีเรียเสื่อม

ดังนั้น การใช้ชุดทดสอบฐานกายภาพ ประกอบด้วย การวัด water Activity, temperature และ pH ของเนื้อสุกร และ วิเคราะห์ความสอดคล้องกับการตรวจพบหรือวัดปริมาณแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในเนื้อสุกร

เมื่อได้ rapid test kit ที่มีความเหมาะสมในการทดสอบแล้ว จึงนำ rapid test kit ไปใช้ในการทดสอบกับเซลล์แบคทีเรียบนเนื้อสุกร เพื่อตรวจสอบปัญหาที่อาจเกิดขึ้น เนื่องจาก เนื้อสุกรอาจมีสารบางชนิดหรือเป็นเนื้อเยื่อที่มีการตอบสนองคล้ายกับเซลล์ของแบคทีเรีย ดังนั้นจึงต้องมีการปรับแต่งการทดสอบให้มีความเหมาะสมที่จะใช้จริงกับเนื้อสุกร ซึ่งมีแนวทางในการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับ การศึกษา test kit กับเซลล์แบคทีเรีย ดังภาพที่ 3.18 ประกอบด้วย

1. ความสัมพันธ์ของ “จำนวนเซลล์แบคทีเรียต่อพื้นที่” และ “จำนวนเซลล์แบคทีเรียต่อกรัม”
(Bacterial no./cm² vs. Bacterial no./g)
2. การเตรียมการศึกษาลักษณะการตอบสนองของเซลล์แบคทีเรียนำไปประยุกต์ใช้จริงกับเนื้อสุกร
(rapid test preparation experiment for field use)
3. ความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์แบคทีเรียและระดับการตอบสนองของ test kits เบื้องต้น
(relationship of Bacterial cells and response)



ภาพที่ 3.18 การศึกษา test kits กับเซลล์แบคทีเรียบนเนื้อสุกร

3.4.1 ความสัมพันธ์ “จำนวนเซลล์แบคทีเรีย/พื้นที่” และ “จำนวนเซลล์แบคทีเรีย/กรัม” (Bacterial no./cm² vs. Bacterial no./g)

โดยทั่วไปแล้ว การวัดปริมาณแบคทีเรียเสื่อม (spoilage bacteria) เช่น *Pseudomonas* spp. เป็นต้น นิยมวิเคราะห์โดยใช้หน่วย “จำนวนแบคทีเรียต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่” เช่น cfu/cm² เป็นต้น เนื่องจากจุลชีววิทยาพิจารณาว่า การปนเปื้อนโดยทั่วไปมักจะเกิดขึ้นที่ผิวหน้าของผลิตภัณฑ์ (surface) มากกว่า การปนเปื้อนภายในเนื้ออาหาร ในขณะที่ การวัดปริมาณแบคทีเรียโรคอาหารเป็นพิษ (foodborne disease bacteria) เช่น *Staphylococcus aureus* กลับกำหนดมาตรฐานการปนเปื้อนด้วยหน่วย “จำนวนแบคทีเรียต่อหนึ่งหน่วยน้ำหนัก” เช่น cfu/g เป็นต้น ความแตกต่างนี้เองอาจจะทำให้การเปรียบเทียบจำนวนเซลล์แบคทีเรียเกิดความสับสนหรือใช้งานในทางปฏิบัติได้ไม่เต็มที่สมบูรณ์ ซึ่งประเด็นนี้ ก็ก่อให้เกิดปัญหาเช่นเดียวกันกับโครงการนี้ ซึ่งวิเคราะห์ทั้งแบคทีเรียเสื่อมอาหารและแบคทีเรียโรคอาหารเป็นพิษด้วย

ดังนั้น จึงมีการวิเคราะห์เพื่อหาความสัมพันธ์ของ “จำนวนเซลล์แบคทีเรียต่อพื้นที่” และ “จำนวนเซลล์แบคทีเรียต่อกรัม” (Bacteria/cm² vs. Bacteria/g) โดยการวิเคราะห์จำนวน *Klebsiella* spp. ที่ปนเปื้อนในเนื้อสุกรจำนวน 48 ตัวอย่าง

1. การปนเปื้อนต่อพื้นที่ ใช้กระดาษกรอง WhatmanTM No.1 ตัดเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัสให้มีขนาดมาตรฐาน 1”x 1” เทียบเท่ากับ 6.45 ตารางเซนติเมตร นำไปซับบนผิวหน้าของเนื้อสุกร แล้ววิเคราะห์ปริมาณ *Klebsiella* spp. รายงานเป็น log cfu/cm²
2. การปนเปื้อนต่อน้ำหนัก ตัดชิ้นเนื้อสุกรชิ้นเดียวกันกับการวิเคราะห์การปนเปื้อนต่อพื้นที่ให้ได้ 25 กรัม แล้ววิเคราะห์ปริมาณ *Klebsiella* spp. รายงานเป็น log cfu/g
3. หาความสัมพันธ์ระหว่าง จำนวนแบคทีเรีย/พื้นที่ และ จำนวนแบคทีเรีย/น้ำหนัก โดยพิจารณาจาก 2 ค่า คือ

3.1 correlation coefficient (*r*) มีค่าระหว่าง -1 ถึง +1 กล่าวคือ

- $r < 0$ หรือ ค่าลบ (negative) คือ ตัวแปรที่ 1 แปรผกผัน กับตัวแปรที่ 2 โดยระดับการแปรผกผันมากขึ้น เมื่อ r เข้าใกล้ -1
- $r = 0$ คือ ตัวแปรที่ 1 ไม่แปรผันตามตัวแปรที่ 2
- $r > 0$ หรือ ค่าบวก (positive) คือ ตัวแปรที่ 1 แปรผันตรง กับตัวแปรที่ 2 โดยระดับการแปรผันตรงมากขึ้น เมื่อ r เข้าใกล้ +1

3.2 *p*-value of *t* test statistics เป็นการทดสอบนัยสำคัญทางสถิติของ *r*

- *p*-value > 0.05 แสดงว่า ความสัมพันธ์ของจำนวนแบคทีเรีย/พื้นที่ และ จำนวนแบคทีเรีย/น้ำหนัก ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ
- *p*-value < 0.05 แสดงว่า ความสัมพันธ์ของจำนวนแบคทีเรีย/พื้นที่ และ จำนวนแบคทีเรีย/น้ำหนัก มีนัยสำคัญทางสถิติ

4. การจัดเรียงเรียงข้อมูลของ 2 ตัวแปร ที่ให้ผลการทดลองที่เป็นไปได้ 2 ทาง คือ การพบ/ไม่พบการปนเปื้อน ทำให้แบ่งผลการวิเคราะห์ได้เป็น 4 กลุ่ม ดังตารางที่ 3.18

ตารางที่ 3.8 การจัดแบ่งกลุ่มตัวอย่างที่วิเคราะห์หาจำนวน *Klebsiella* spp. ต่อพื้นที่ และ ต่อน้ำหนัก

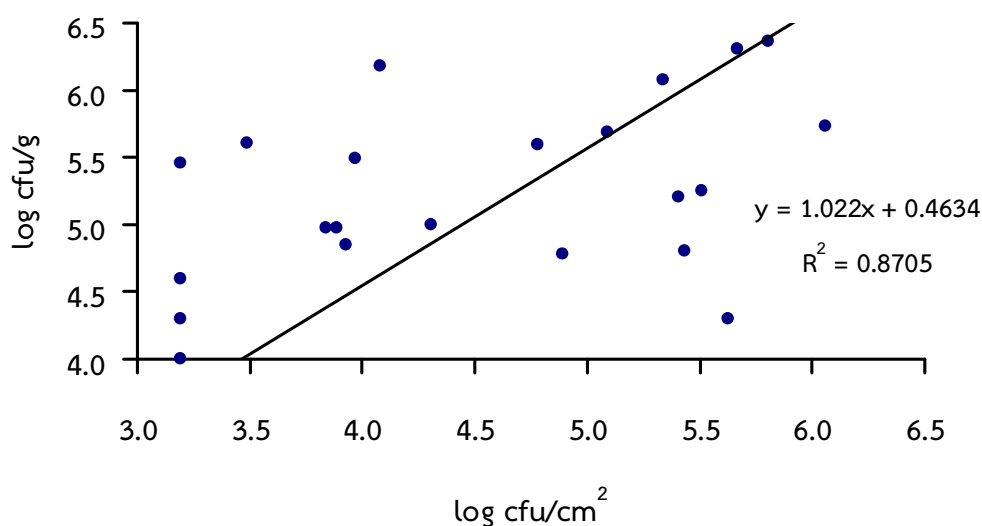
จำนวนตัวอย่างเนื้อสุกรที่วิเคราะห์ การปนเปื้อน <i>Klebsiella</i> spp.		การปนเปื้อน/พื้นที่	
		ปนเปื้อน	ไม่ปนเปื้อน
การปนเปื้อน/น้ำหนัก	ปนเปื้อน	22	9
	ไม่ปนเปื้อน	10	7

5. เมื่อนำผลการปนเปื้อน/พื้นที่ และ การปนเปื้อน/น้ำหนัก เฉพาะที่มีความสอดคล้องกัน คือ 22 ตัวอย่างที่ปนเปื้อน และ 7 ตัวอย่างที่ไม่ปนเปื้อน

5.1 ค่า r หรือ correlation coefficient ประมาณ 0.93 (หรือ ร้อยละ 93) แสดงว่า จำนวน *Klebsiella* spp./cm² มีความสัมพันธ์กับ จำนวน *Klebsiella* spp./g อย่างมาก ซึ่งสอดคล้องกับค่า $r^2 = 0.8705$ ดังภาพที่ 3.19

5.2 การทดสอบความแตกต่างระหว่าง จำนวน *Klebsiella* spp./cm² มีความสัมพันธ์กับ จำนวน *Klebsiella* spp./g พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} = 0.3669$)

Correlation of *Klebsiella* spp per sq.cm. and per g.



ภาพที่ 3.19 ความสัมพันธ์ของ “จำนวนเซลล์แบคทีเรียต่อพื้นที่” และ “จำนวนเซลล์แบคทีเรียต่อกรัม” (Bacterial no./cm² vs. Bacterial no./g)

6. สรุปผลการทดลอง พบว่า

6.1 จำนวน *Klebsiella* spp./cm² มีความสัมพันธ์กับ จำนวน *Klebsiella* spp./g เป็นอย่างมาก

6.2 จำนวน *Klebsiella* spp./cm² ไม่แตกต่างกับ จำนวน *Klebsiella* spp./g

7. แนวทางการประยุกต์ใช้ผลการทดลอง คือ

7.1 การศึกษาระดับการปนเปื้อนของแบคทีเรียโดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียเสื้อม สามารถเลือกวิเคราะห์ได้ทั้ง จำนวนปนเปื้อนต่อพื้นที่ หรือ จำนวนปนเปื้อนต่อน้ำหนักได้ เนื่องจาก ทั้งสองวิธีให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความสอดคล้องกัน

7.2 การศึกษาระดับการปนเปื้อนของแบคทีเรียโดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียเสื้อม สามารถเลือกวิเคราะห์ได้ทั้ง จำนวนปนเปื้อนต่อพื้นที่ หรือ จำนวนปนเปื้อนต่อน้ำหนักได้ และ ค่าที่ได้จากทั้งสองวิธีให้ค่าที่ไม่แตกต่างกัน ดังนั้น ผู้ใช้จึงสามารถใช้ระดับการปนเปื้อนต่อพื้นที่ เปรียบเทียบกับการปนเปื้อนต่อน้ำหนักได้โดยตรง นอกจากนี้ หากหน่วยพื้นที่และหน่วยน้ำหนักเป็น ตารางเซนติเมตรและกรัม ทรมาลำดับแล้ว อาจจะสลับหน่วยได้ทันที เนื่องจาก ทั้งสองวิธีที่วิเคราะห์ต่อหน่วยตารางเซนติเมตรและต่อหน่วยกรัมให้จำนวนการปนเปื้อนแบคทีเรียที่ไม่แตกต่างกัน

3.4.2 การเตรียมการศึกษาลักษณะการตอบสนองของเซลล์แบคทีเรียนำไปประยุกต์ใช้จริงกับ เนื่อสุกร (OXIDASE TEST)

(Rapid test preparation experiment for field use : OXIDASE TEST)

OXIDASE TEST

การเตรียมการศึกษาลักษณะการตอบสนองของเซลล์แบคทีเรียนำไปประยุกต์ใช้จริงกับเนื่อสุกร ของ
oxidase test ประกอบด้วย 3 การทดสอบ (ดังภาพที่ 3.20) คือ

3.4.2.1 การศึกษาจำนวนเซลล์แบคทีเรียขั้นต่ำในการตอบสนองของเซลล์แบคทีเรีย

(visible response cells)

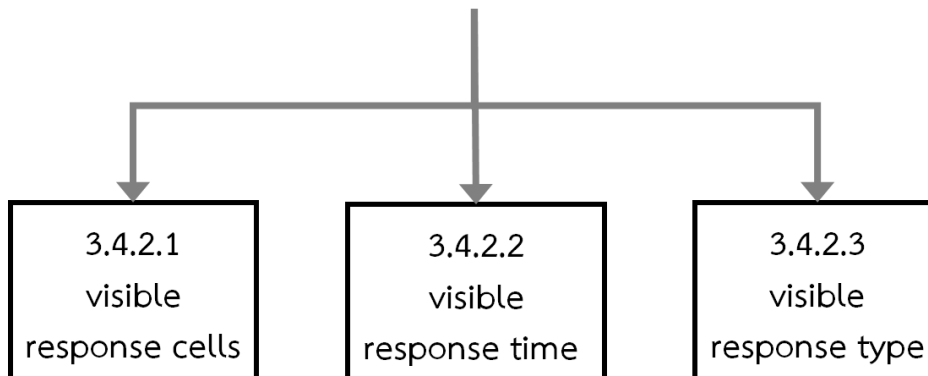
3.4.2.2 การศึกษาระยะเวลาขั้นต่ำในการสังเกตผลการตอบสนอง

(visible response time)

3.4.2.3 การศึกษาลักษณะการตอบสนองในรูปแบบที่ใกล้เคียงกับเนื่อสุกรจริง

(visible response type)

3.4.2 rapid test preparation experiment for field use (OXIDASE TEST)



ภาพที่ 3.20 การเตรียมการศึกษาลักษณะการตอบสนองของเซลล์แบคทีเรียนำไปประยุกต์ใช้จริงกับเนื่อสุกร

3.4.2.1 การศึกษาจำนวนเซลล์แบคทีเรียขั้นต่ำในการตอบสนองของเซลล์แบคทีเรีย

(visible response cells)

เพื่อให้ทราบจำนวนเซลล์ขั้นต่ำในการตอบสนองของเซลล์แบคทีเรียต่อการทดสอบ

ดังนั้น จึงทำการศึกษานับจำนวนเซลล์แบคทีเรียในรูปของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (diameter) ของ colony ที่แตกต่างกัน เพื่อสังเกตผลของการตอบสนองต่อการทดสอบ

วิธีการทดสอบ

- คัดเลือก colony ของแบคทีเรียจำนวน 3 ขนาด คือ 0.5 มม. 1.0 มม. และ 1.5 มม. ที่เจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ *Pseudomonas fluorescens*
- ใช้ loop ตักแยก colony ให้ได้มากที่สุด เพื่อเปรียบเทียบ “การตอบสนอง” กับ “จำนวนเซลล์/ขนาด colony” จึงเลือก colony ที่มีขนาดเท่ากัน แบ่งทดสอบ 2 อย่าง คือ
 - นำหนึ่ง colony มาวิเคราะห์จำนวนเซลล์/ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ colony โดยการคำนวณค่าเฉลี่ยเรขาคณิต (geometric mean) ของ *Pseudomonas fluorescens* จำนวน 2 สายพันธุ์
 - นำอีกหนึ่ง colony ที่มีขนาดเท่ากัน มาป้ายลงบนผิวของ filter disc เพื่อทำการทดสอบการตอบสนองด้วย Oxidase reagent คือ 10% Tetra-methyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD)
- วิเคราะห์ผล โดยการเปรียบเทียบ “การตอบสนอง” กับ “จำนวนเซลล์/ขนาด colony”

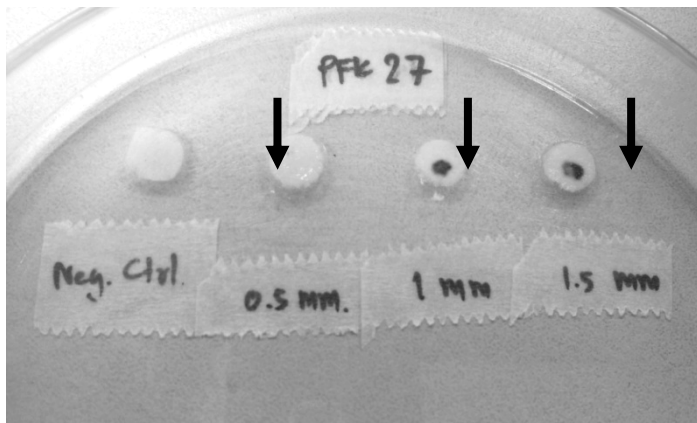
ผลการทดสอบ

- “จำนวนเซลล์/ขนาด colony” ดังแสดงในตารางที่ 3.19

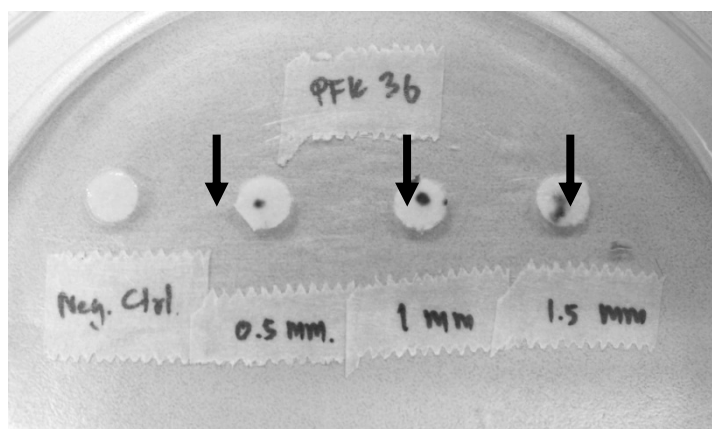
ตารางที่ 3.19 จำนวนเซลล์ ต่อ ขนาด colony ของ *Pseudomonas fluorescens*

<i>Pseudomonas fluorescens</i>	colony diameters		
	0.5 mm	1 mm	1.5 mm
Strain PFK 27	7.3×10^8	9.2×10^8	9.3×10^8
Strain PFK 36	2.0×10^8	7.4×10^8	8.2×10^8
Geometric mean	3.8×10^8	8.3×10^8	8.7×10^8
ความขุ่น เทียบเท่ากับ			
McFarland standard	1.0	2.0	3.0

- การตอบสนองของ “จำนวนเซลล์” ดังแสดงในภาพที่ 3.21-3.22



ภาพที่ 3.21 การตอบสนองของ “จำนวนเซลล์/ขนาดเส้นผ่านจุดศูนย์กลางของ colony” ของ *Pseudomonas fluorescens* สายพันธุ์ PFK 27



ภาพที่ 3.22 การตอบสนองของ “จำนวนเซลล์/ขนาดเส้นผ่านจุดศูนย์กลางของ colony” ของ *Pseudomonas fluorescens* สายพันธุ์ PFK 36

ข้อสรุปการทดสอบ (minimum cells to visible response)

- จำนวนเซลล์แบคทีเรียใน colony ของ *Pseudomonas fluorescens* ขนาดเส้นผ่านจุดศูนย์กลาง (diameter) 0.5 มม., 1.0 มม. และ 1.5 มม. มีค่าเฉลี่ยเรขาคณิต (geometric mean) เท่ากับ 3.8×10^8 , 8.3×10^8 และ 8.7×10^8 ตามลำดับ
- ขนาดเส้นผ่านจุดศูนย์กลางต่ำสุดของ colony แบคทีเรีย ประมาณ 0.5 มม. เป็นต้นไป จึงจะสังเกตเห็นการสนองได้ชัดเจน
- จำนวนเซลล์แบคทีเรียขั้นต่ำในการการตอบสนองของเซลล์แบคทีเรีย (minimum cells to response) ประมาณ 3.8×10^8 โดยสอดคล้องกับขนาดเส้นผ่านจุดศูนย์กลางต่ำสุดของ colony ประมาณ 0.5 มม. เป็นต้นไป

3.4.2.2 การศึกษาระยะเวลาขั้นต่ำในการสังเกตผลการตอบสนอง

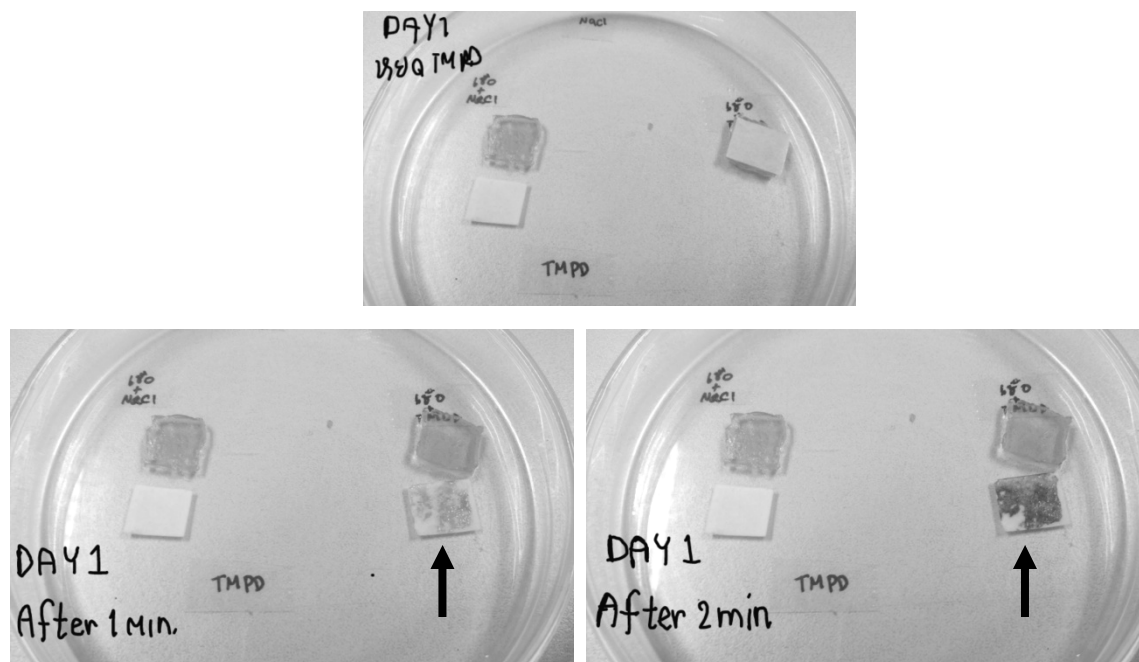
(visible response time)

เพื่อให้ทราบระยะเวลาการสังเกตผลการตอบสนองที่เหมาะสมและสามารถใช้ได้ในทางปฏิบัติ ภาคสนาม ซึ่งโดยทั่วไป คือ ใช้เวลาที่สั้นที่สุดเพื่อประหยัดเวลาในการอ่านผล

ดังนั้น จึงทำการศึกษาระยะเวลาการตอบสนองของแบคทีเรียจำนวน 3.8×10^8 เซลล์ ที่น้อยที่สุดที่สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า

วิธีการทดสอบ

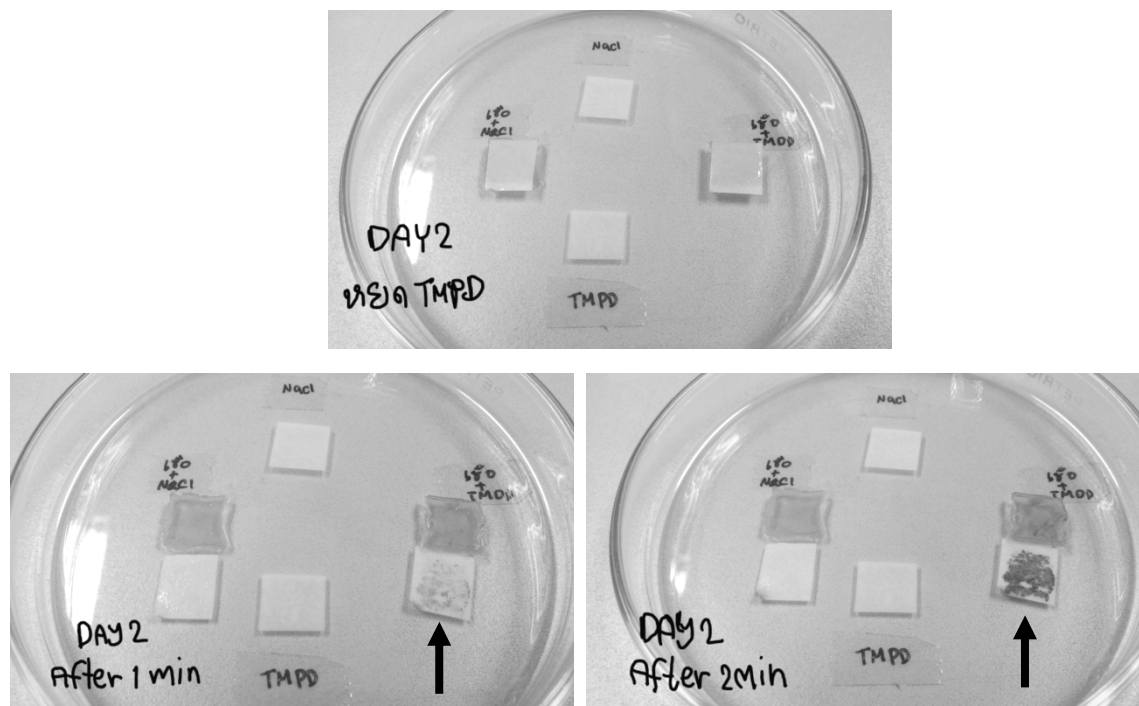
- เกลี่ย (spread) *Pseudomonas fluorescens* ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (agar) สำหรับ *Pseudomonas* เพาะบ่มที่ 25°C นาน 2 วัน
- ตัด agar ที่มีการเจริญเติบโตของ *Pseudomonas fluorescens* ขนาด 1 x 1 ซม. ออกจาก plate นำ agar สีเหลือง วางลงบน plate เปล่า
- ใช้กระดาษกรอง Whatman™ No.1 ตัดเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัสให้มีขนาด 1 x 1 ซม. ทาบลงบนผิวหน้าของ agar แล้วรอสักครู่เพื่อให้กระดาษดูดซับ *Pseudomonas fluorescence* ขึ้นมาติดบนผิวของกระดาษกรอง
- ใช้ปากคีบ (forceps) หนีบลอกกระดาษกรองออกจากผิวของ agar พลิกหงายด้านที่มีแบคทีเรียขึ้นด้านบน เพื่อให้สามารถเห็นการตอบสนองชัดเจน
- หยดน้ำยา 10% Tetra-methyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD) ลงบนกระดาษกรองให้ทั่ว จากนั้นจึงอ่านผลโดยสังเกตสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นกับ colony ของ *Pseudomonas fluorescens*
 - อ่านผลการเกิดปฏิกิริยา ครั้งที่ 1 เมื่อเกิดปฏิกิริยานาน 60 วินาที (1 นาที)
 - อ่านผลการเกิดปฏิกิริยา ครั้งที่ 2 เมื่อเกิดปฏิกิริยานาน 120 วินาที (2 นาที)
- ทำการทดลอง 2 ซ้ำ (replication)



ภาพที่ 3.23 การตอบสนองของ *Pseudomonas fluorescens* ที่เวลา 1 นาที และ 2 นาที (replication 1)

ผลการทดสอบ

- เปรียบเทียบการตอบสนอง คือ การเกิดสีน้ำเงินที่ผิวหน้าของกระดาษกรอง ณ เวลา 1 นาที และ 2 นาที ดังภาพที่ 3.23-3.24
- สังเกตการเปลี่ยนแปลงของกระดาษกรอง (แผ่นบางกว่า) ที่อยู่ด้านล่างของชิ้น agar (แผ่นหนากว่า) ทางด้านขวาของแต่ละภาพย่อย พบว่า
 - สังเกตเห็น การตอบสนองของเชื้อ ณ นาทีที่ 1
 - สังเกตเห็น การตอบสนองของเชื้อ ณ นาทีที่ 2
- เมื่อเปรียบเทียบกันแล้ว ผลการตอบสนองของ ณ นาทีที่ 2 จะชัดเจนหรือมีสีที่เข้มมากกว่าการตอบสนองของเชื้อ ณ นาทีที่ 1



ภาพที่ 3.24 การตอบสนองของ *Pseudomonas fluorescens* ที่เวลา 1 นาที และ 2 นาที (replication 2)

ข้อสรุปการทดสอบ (minimum visible response time)

- แม้ว่าผลการทดสอบการตอบสนองจะเห็นได้ตั้งแต่ นาทีที่ 1 ซึ่งอาจจะไม่ก่อให้เกิดปัญหาในกรณีที่มีจำนวนเซลล์แบคทีเรียมาก
- ในทางตรงกันข้าม ในกรณีที่จำนวนเซลล์แบคทีเรีน้อย ก็อาจจะทำให้สังเกตผลการตอบสนองได้ไม่ชัดเจน
- นอกจากนี้ ระยะเวลา 1 นาที และ 2 นาที ไม่มีความแตกต่างกันมากนักในเชิงระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยาในภาคสนาม
- ดังนั้น ระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยารวม 2 นาที ยังถือว่า มีความเหมาะสม ทั้งยังช่วยเพิ่มความไว (sensitivity) ของชุดทดสอบในการตรวจหาเชื้อด้วย

3.4.2.3 การศึกษาลักษณะการตอบสนองในรูปแบบที่ใกล้เคียงกับเนื้อสุกรจริง

(visible response type)

เพื่อศึกษารูปแบบการติดตามการตอบสนองของ *Pseudomonas fluorescens* ที่มีการเพิ่มจำนวนอย่างต่อเนื่อง

ดังนั้น จึงทำการศึกษด้วยการติดตามการตอบสนองของ *Pseudomonas fluorescens* ที่มีการเพิ่มจำนวนอย่างต่อเนื่องบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (agar) เพื่อใช้เป็นแนวทางในการติดตามการตอบสนองของ *Pseudomonas fluorescens* บนผิวหน้าเนื้อสุกรจริงต่อไป

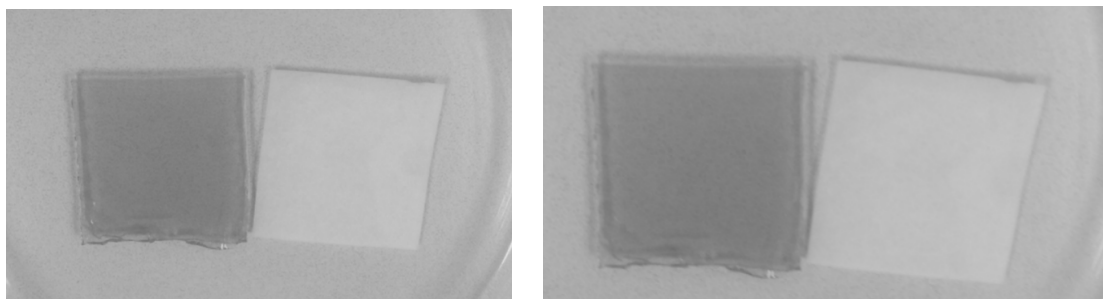
วิธีการทดสอบ

- เกลี่ย (spread) *Pseudomonas fluorescens* ความเข้มข้นประมาณ 0.5 McFarland ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (agar) สำหรับ *Pseudomonas* จำนวน 24 ชุด จากนั้นจึงนำไปเพาะบ่มที่ 25°C
- หลังการเพาะบ่มนาน 1 ชั่วโมง
- กระดาษกรอง WhatmanTM No.1 ตัดเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัสให้มีขนาดมาตรฐาน 1"× 1" เทียบเท่ากับ 6.45 ตารางเซนติเมตร (cm²) จำนวน 2 แผ่น นำไปวางบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (agar) และรอสักครู่เพื่อให้กระดาษดูดซับ *Pseudomonas fluorescence* ขึ้นมาติดบนผิวหน้าของกระดาษกรอง
 - ใช้ปากคีบ (forceps) หนีบลอกกระดาษกรองแผ่นที่ 1 ออกจากผิวหน้า agar
 - หยดน้ำยา oxidase reagent ที่เตรียมใหม่ คือ 10% Tetra-methyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD) ปริมาตร 120 µl ลงบนกระดาษกรองให้ทั่ว สังเกตการตอบสนอง เป็นสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นกับ colony ของ *Pseudomonas fluorescens*
 - อ่านผลการเกิดปฏิกิริยา ครั้งที่ 1 เมื่อเกิดปฏิกิริยานาน 60 วินาที
 - อ่านผลการเกิดปฏิกิริยา ครั้งที่ 2 เมื่อเกิดปฏิกิริยานาน 120 วินาที
 - ใช้ปากคีบ (forceps) หนีบลอกกระดาษกรองแผ่นที่ 2 ออกจากผิวหน้า agar
 - เฉพาะเมื่อการทดสอบให้ผลเป็นบวก คือ สังเกตเห็นสีน้ำเงินที่ colony ของ *Pseudomonas fluorescens* บนผิวกระดาษกรองแผ่นที่ 1
 - นำกระดาษกรองแผ่นที่ 2 ใส่ใน 0.85% NaCl ปริมาตร 5 ml จากนั้นจึงเจือจางแบบ 10-fold serial dilution ประมาณ 8-10 ซ้ำ
 - Pipette สารละลายที่ได้ปริมาตร 100 µl ของแต่ละ dilution ลงบน Nutrient agar plate แล้วทำการ spread สารละลายให้กระจายเท่าๆ กันทั่วทั้ง plate
 - บ่มเพาะ (incubate) ที่ อุณหภูมิ 25°C นาน 48 ชั่วโมง

- นับจำนวนโคโลนีของ *Pseudomonas fluorescens* ในแต่ละ plate เพื่อคำนวณจำนวน *Pseudomonas fluorescens* ต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่
- หลังการบ่มเพาะ 2 ชั่วโมง จึงทำการทดลองซ้ำเพื่อสังเกตการตอบสนองเช่นเดียวกับการทดสอบหลังการเพาะบ่ม 1 ชั่วโมง
- ติดตามการเปลี่ยนแปลงการตอบสนองของ *Pseudomonas fluorescens* ทุกชั่วโมง จนกระทั่งครบชั่วโมงที่ 24

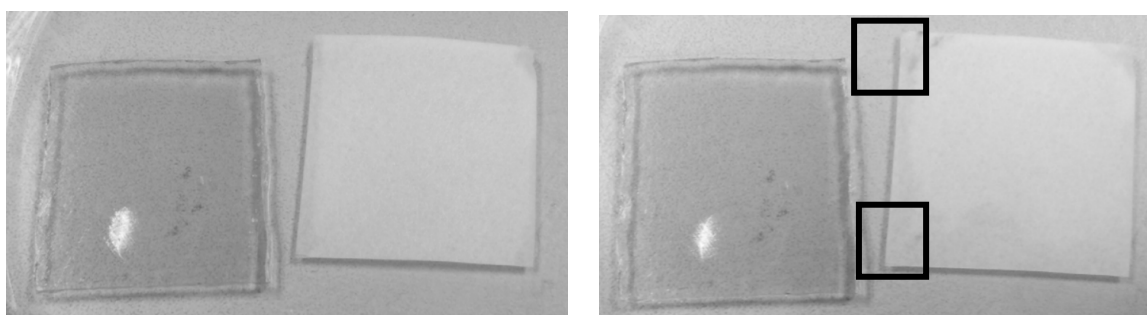
ผลการทดสอบ

- ไม่พบการตอบสนองของเซลล์ *Pseudomonas fluorescens* บนกระดาษกรอง (negative) ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 ถึง ชั่วโมงที่ 14 (ภาพที่ 3.25)

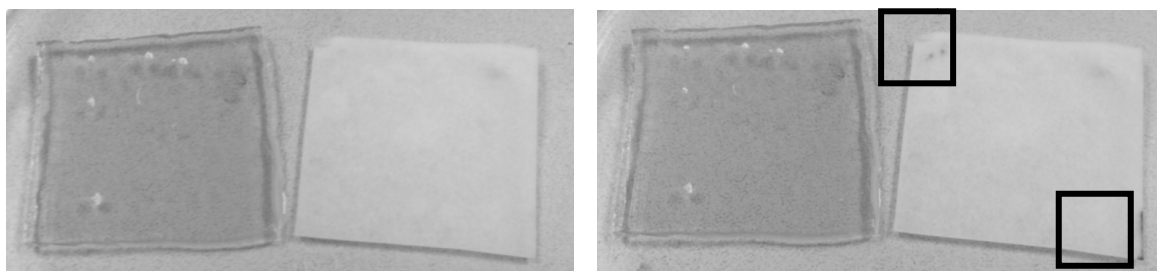


ภาพที่ 3.25 ไม่พบการตอบสนองของเซลล์แบคทีเรียบนกระดาษกรอง (negative) ชั่วโมงที่ 1-14 (ด้านซ้ายของภาพย่อยเป็น agar ด้านขวาของภาพย่อยเป็น filter paper)

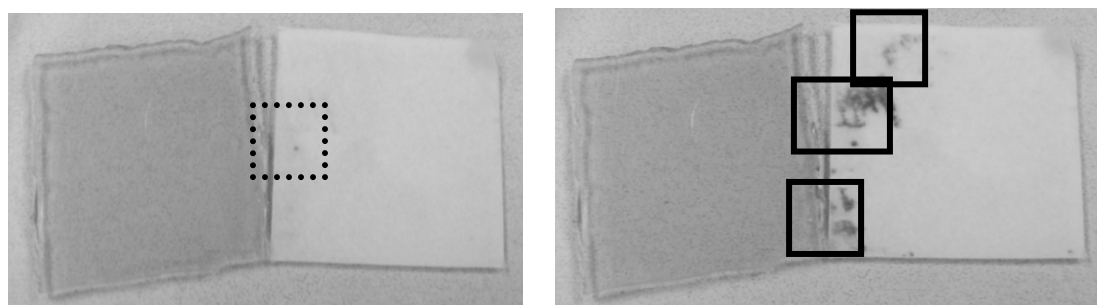
- พบการตอบสนองของเซลล์ *Pseudomonas fluorescens* บนกระดาษกรอง (positive) ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 15 ถึง ชั่วโมงที่ 19 (ภาพที่ 3.26-3.31)



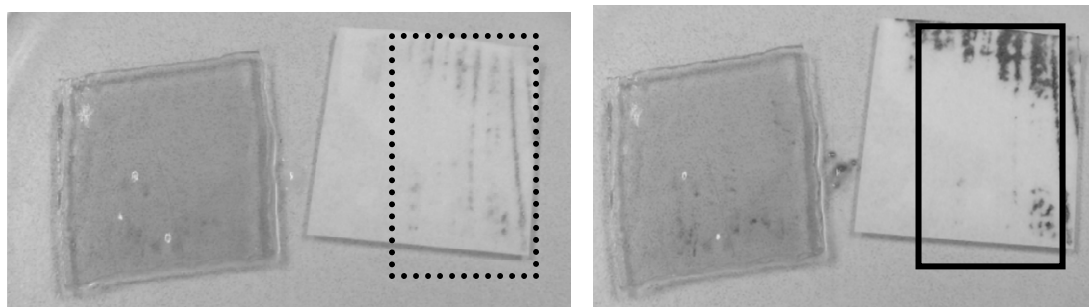
ภาพที่ 3.26 การตอบสนองของเซลล์แบคทีเรียบนกระดาษกรอง (positive) ชั่วโมงที่ 15
อ่านผล 1 นาที และ 2 นาที ตามลำดับ
(ด้านซ้ายของภาพย่อยเป็น agar ด้านขวาของภาพย่อยเป็น filter paper)



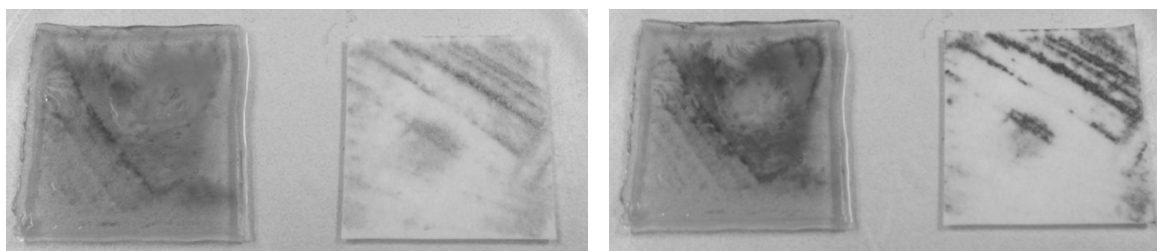
ภาพที่ 3.27 การตอบสนองของเซลล์แบคทีเรียบนกระดาษกรอง (positive) ชั่วโมงที่ 16
อ่านผล 1 นาที และ 2 นาที ตามลำดับ
(ด้านซ้ายของภาพย่อยเป็น agar ด้านขวาของภาพย่อยเป็น filter paper)



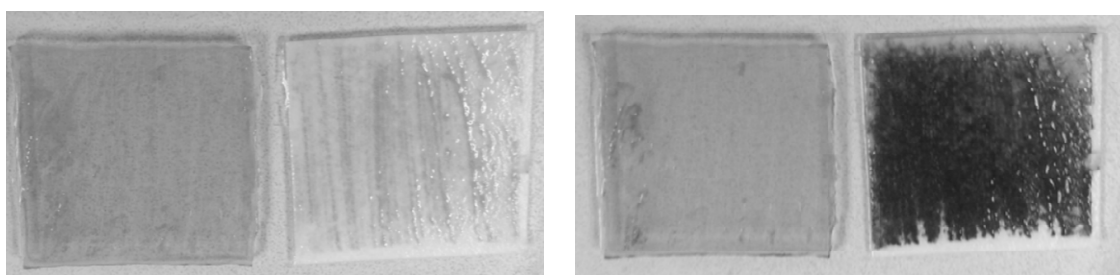
ภาพที่ 3.28 การตอบสนองของเซลล์แบคทีเรียบนกระดาษกรอง (positive) ชั่วโมงที่ 17
อ่านผล 1 นาที และ 2 นาที ตามลำดับ
(ด้านซ้ายของภาพย่อยเป็น agar ด้านขวาของภาพย่อยเป็น filter paper)



ภาพที่ 3.29 การตอบสนองของเซลล์แบคทีเรียบนกระดาษกรอง (positive) ชั่วโมงที่ 18
อ่านผล 1 นาที และ 2 นาที ตามลำดับ
(ด้านซ้ายของภาพย่อยเป็น agar ด้านขวาของภาพย่อยเป็น filter paper)



ภาพที่ 3.30 การตอบสนองของเซลล์แบคทีเรียบนกระดาษกรอง (positive) ชั่วโมงที่ 19
อ่านผล 1 นาที และ 2 นาที ตามลำดับ
(ด้านซ้ายของภาพย่อยเป็น agar ด้านขวาของภาพย่อยเป็น filter paper)



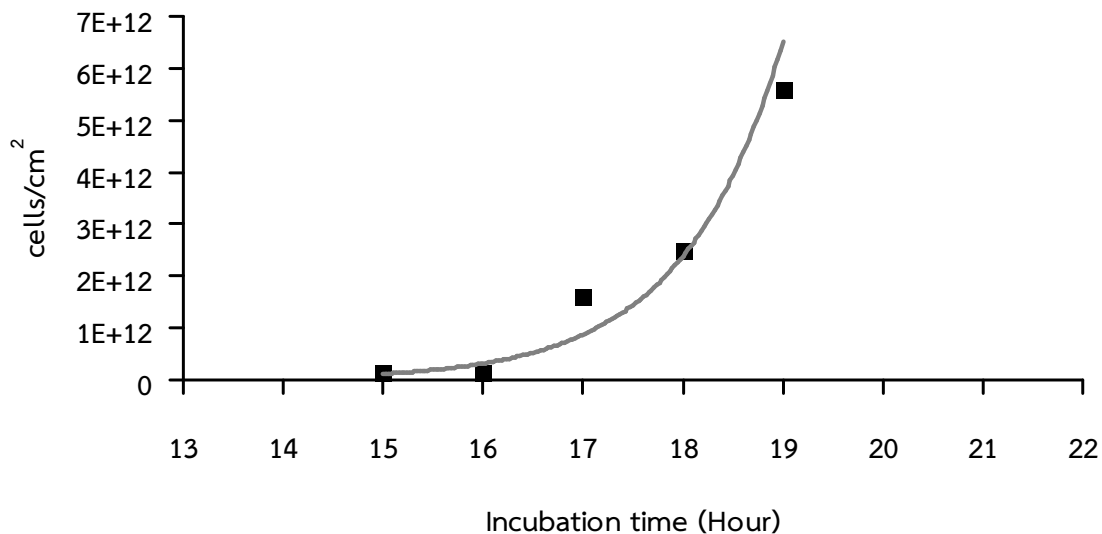
ภาพที่ 3.31 การตอบสนองของเซลล์แบคทีเรียบนกระดาษกรอง (positive) ชั่วโมงที่ 24
อ่านผล 1 นาที และ 2 นาที
(ด้านซ้ายของภาพย่อยเป็น agar ด้านขวาของภาพย่อยเป็น filter paper)

- จำนวนเซลล์/ตารางเซนติเมตร ชั่วโมงที่ 15-19 ดังตารางที่ 3.20 และ ภาพที่ 3.32

ตารางที่ 3.20 จำนวนเซลล์ *Pseudomonas fluorescens* ต่อตารางเซนติเมตรของกระดาษกรองที่ลอกจาก
ผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (agar)

ชั่วโมงการบ่มเพาะ	เซลล์/ตารางเซนติเมตร	ภาพที่	ระยะเวลาการอ่านผล	
			1 นาที	2 นาที
15	1.5×10^{11}	9	ไม่พบ	พบปริมาณน้อย
16	1.5×10^{11}	10	ไม่พบ	พบปริมาณน้อย
17	1.6×10^{12}	11	พบปริมาณน้อย	พบปริมาณปานกลาง
18	2.5×10^{12}	12	พบปริมาณน้อย	พบปริมาณมาก
19	5.6×10^{12}	13	พบปริมาณปานกลาง	พบปริมาณมาก

Pseudomonas fluorescens growth on nutrient agar



ภาพที่ 3.32 การเพิ่มจำนวนของ *Pseudomonas fluorescens* บน nutrient agar 25°ซ
สรุปผลการทดสอบ (agar surface)

- เป็นวิธีการที่สามารถใช้ในการติดตามการตอบสนองของ *Pseudomonas fluorescens* เป็นรายชั่วโมงได้
- การอ่านผล ณ เวลา 1 นาที่ (lower sensitivity)
 - ให้ผลที่ไวน้อยกว่า กล่าวคือ สามารถสังเกตเห็นการตอบสนองด้วยตาเปล่า (visual response) ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 17
 - จำนวนเซลล์ขั้นต่ำที่ให้ผลการตอบสนองที่เห็นได้ด้วยตาเปล่า (visual response) ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 17 คือ 1.6×10^{12} เซลล์ หรือ $> 12 \log \text{ cells/cm}^2$
- การอ่านผล ณ เวลา 2 นาที่ (higher sensitivity)
 - ให้ผลที่ไวมากกว่า กล่าวคือ สามารถสังเกตเห็นการตอบสนองด้วยตาเปล่า (visual response) ได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 15
 - จำนวนเซลล์ขั้นต่ำที่ให้ผลการตอบสนองที่เห็นได้ด้วยตาเปล่า (visual response) ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 15 คือ 1.5×10^{11} เซลล์ หรือ $> 11 \log \text{ cells/cm}^2$
- เพื่อการสังเกตการตอบสนองด้วยตาเปล่า (visual response) ที่ดีที่สุด จึงแนะนำให้อ่านผล ณ เวลา 2 นาที่หลังหยดน้ำยา
 - การตอบสนองที่สังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า (visual response) มีลักษณะเป็นแบบมีขั้นต่ำ หรือ threshold กล่าวคือ แบคทีเรียมีการเพิ่มจำนวนอย่างต่อเนื่อง โดยไม่สามารถสังเกตเห็นการตอบสนอง จนกระทั่ง จำนวนเซลล์เพิ่มจำนวนถึงจำนวนเซลล์ขั้นต่ำ ก็จะสามารถสังเกตเห็นการตอบสนองได้ด้วยตาเปล่า (visible response)

3.4.3 ความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์แบคทีเรียและระดับการตอบสนองของ test kits เบื้องต้น (OXIDASE TEST)

(Relationship of Bacterial cells and response : OXIDASE TEST)

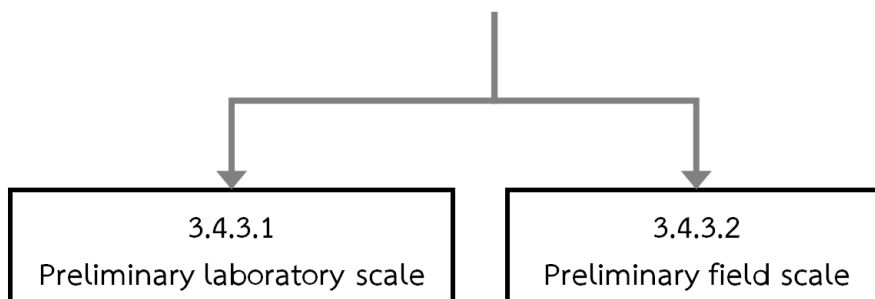
OXIDASE TEST

การศึกษาความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์แบคทีเรียและระดับการตอบสนองของ oxidase test บนเนื้อสุกร ประกอบด้วย 2 ระดับ (ภาพที่ 3.33) คือ

3.4.3.1 ระดับห้องปฏิบัติการเบื้องต้น (Preliminary laboratory scale) เป็นการศึกษาในระดับนำร่องเพื่อมุ่งหาความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์แบคทีเรียและระดับการตอบสนองของ oxidase test โดยดำเนินการในห้องปฏิบัติการที่มีการควบคุมปัจจัยผันแปรต่างๆ ได้

3.4.3.2 ระดับภาคสนามเบื้องต้น (Preliminary field scale) เป็นการศึกษาในระดับนำร่องต่อเนื่องจากระดับห้องปฏิบัติการเบื้องต้น เพื่อมุ่งหาความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์แบคทีเรียและระดับการตอบสนองของ oxidase test โดยดำเนินการในภาคสนามที่มีปัจจัยผันแปรต่างๆ ในสถานการณ์การใช้งานชุดทดสอบจริงผ่าน platform ที่ใกล้เคียงกับชุดทดสอบที่จะใช้จริงมากที่สุด

3.4.3 relationship of bacterial cells and response (OXIDASE TEST)



ภาพที่ 3.33 ขั้นตอนการศึกษาความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์แบคทีเรียและระดับการตอบสนองของ oxidase test เบื้องต้น

3.4.3.1 ระดับห้องปฏิบัติการเบื้องต้น

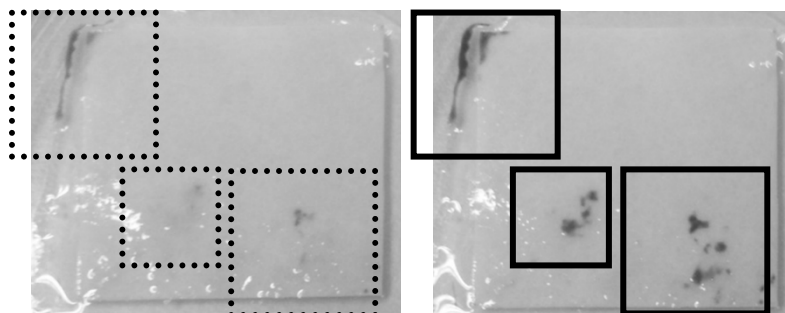
(Preliminary laboratory scale)

วิธีการทดสอบ

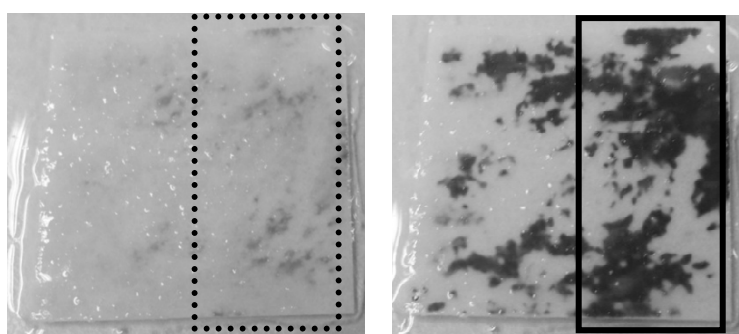
- นำเนื้อสุกร (ส่วนสันนอก) มาล้างด้วย 0.85% NaCl 200 มล. เพื่อกำจัดแบคทีเรียที่อาจจะปนเปื้อนที่ผิวหน้าของเนื้อสุกร
- ใช้มีดปลอดเชื้อ (sterile) แบ่งเนื้อสุกรเป็นชิ้นขนาดความหนาประมาณ 1-2 เซนติเมตร โดยต้องระมัดระวังมิให้มีการปนเปื้อนที่ผิวหน้าเนื้อสุกร
- ใช้ cotton swab เกลี่ย (inoculate) *Pseudomonas fluorescence* ระดับความเข้มข้น 0.5 McFarland (1×10^7 cfu/ml) ลงบนเนื้อสุกร และเพาะบ่ม (incubate) อุณหภูมิ 25°C
- กระดาษกรอง Whatman™ No.1 ตัดเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัสให้มีขนาดมาตรฐาน 1"× 1" เทียบเท่ากับ 6.45 ตารางเซนติเมตร (cm²) จำนวน 2 แผ่น นำไปวางบนผิวหน้าเนื้อสุกร และรอสักครู่เพื่อให้กระดาษดูดซับ *Pseudomonas fluorescence* ขึ้นมาติดบนผิวของกระดาษกรอง
 - ใช้ปากคีบ (forceps) หนีบลอกกระดาษกรองแผ่นที่ 1 ออกจากผิวเนื้อสุกร
 - ดำเนินการหยดน้ำยา 10% Tetra-methyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD) ปริมาตร 120 µl ลงบนกระดาษกรองให้ทั่ว อ่านผลโดยสังเกตสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นกับ colony ของ *P. fluorescens*
 - อ่านผลการเกิดปฏิกิริยา ครั้งที่ 1 เมื่อเกิดปฏิกิริยานาน 60 วินาที
 - อ่านผลการเกิดปฏิกิริยา ครั้งที่ 2 เมื่อเกิดปฏิกิริยานาน 120 วินาที
 - ใช้ปากคีบ (forceps) หนีบลอกกระดาษกรองแผ่นที่ 2 ออกจากผิวเนื้อสุกร
 - เฉพาะเมื่อการทดสอบให้ผลเป็นบวก คือ สังเกตเห็นสีน้ำเงินที่ colony ของ *Pseudomonas fluorescens*
 - นำกระดาษกรองแผ่นที่ 2 ที่ลอกออกจากผิวเนื้อสุกร นำใส่ลงใน 0.85% NaCl ปริมาตร 5 ml จากนั้นจึงเจือจางแบบ 10-fold serial dilution ประมาณ 8-10 ครั้ง
 - Pipette สารละลาย 100 µl ลงบน Nutrient agar plate แล้วทำการ spread สารละลายให้กระจายทั่วๆ กันทั่วทั้ง plate
 - บ่มเพาะ (incubate) ที่ อุณหภูมิ 25°C นาน 48 ชั่วโมง
 - นับจำนวนโคโลเนียของ *Pseudomonas fluorescens* ในแต่ละ plate แล้วคำนวณจำนวน *Pseudomonas fluorescens* ต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่
- หลังการบ่มเพาะ 2 ชั่วโมง จึงทำการทดสอบซ้ำเพื่อสังเกตการตอบสนองเช่นเดียวกับการทดสอบหลังการเพาะบ่ม 1 ชั่วโมง
- ติดตามการเปลี่ยนแปลงการตอบสนองทุกชั่วโมง จนครบชั่วโมงที่ 21 ชั่วโมง

ผลการทดสอบ

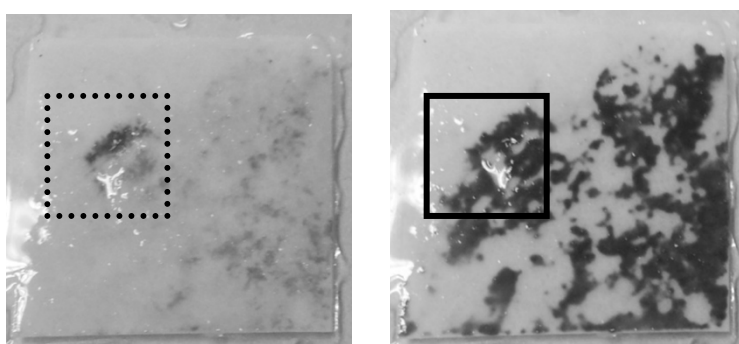
- ไม่พบการตอบสนองของ *Pseudomonas fluorescens* บนกระดาษกรอง (negative) ตั้งแต่ ชั่วโมงที่ 1 ถึง ชั่วโมงที่ 13
- พบการตอบสนองของ *Pseudomonas fluorescens* บนกระดาษกรอง (positive) ชั่วโมงที่ 14 ถึง ชั่วโมงที่ 21 ภาพที่ 3.34-3.41



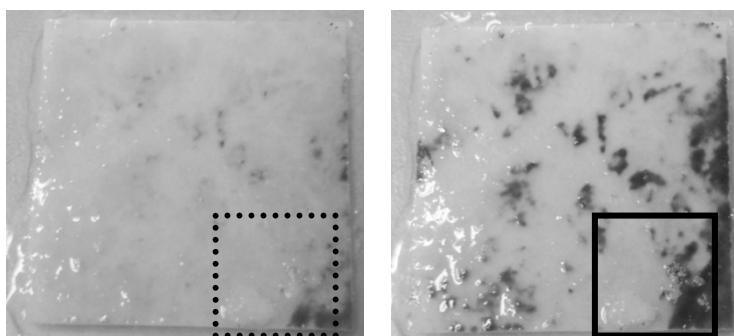
ภาพที่ 3.34 การตอบสนองของเซลล์แบคทีเรียบนกระดาษกรอง (positive) ชั่วโมงที่ 14
อ่านผล 1 นาที และ 2 นาที ตามลำดับ



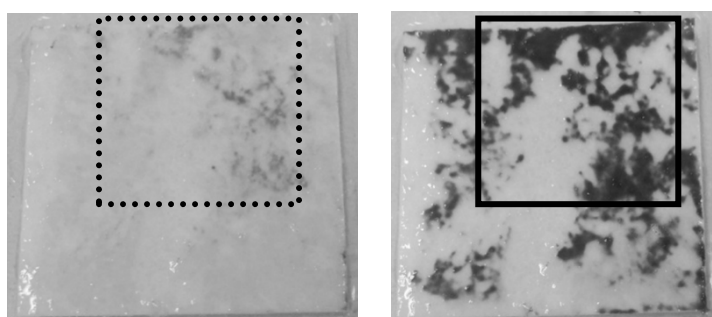
ภาพที่ 3.35 การตอบสนองของเซลล์แบคทีเรียบนกระดาษกรอง (positive) ชั่วโมงที่ 15
อ่านผล 1 นาที และ 2 นาที ตามลำดับ



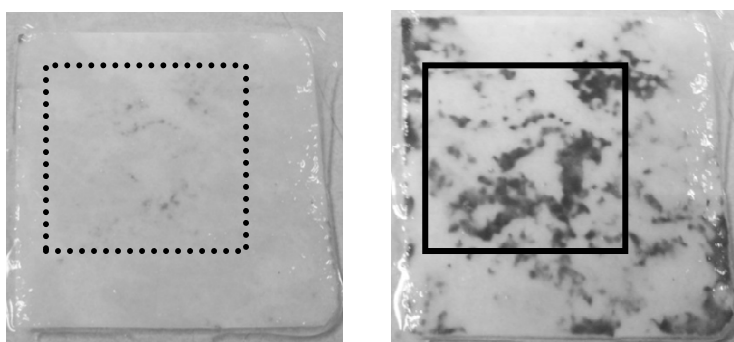
ภาพที่ 3.36 การตอบสนองของเซลล์แบคทีเรียบนกระดาษกรอง (positive) ชั่วโมงที่ 16
อ่านผล 1 นาที และ 2 นาที ตามลำดับ



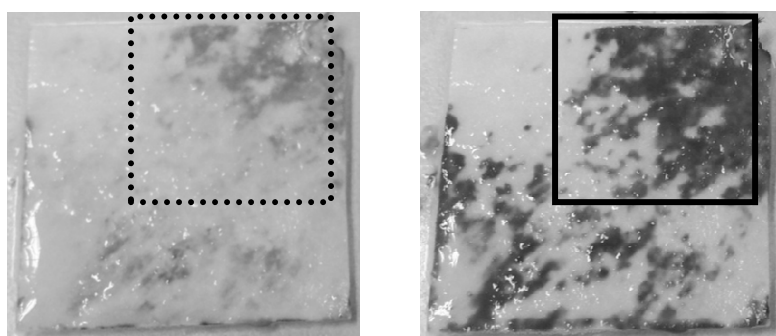
ภาพที่ 3.37 การตอบสนองของเซลล์แบคทีเรียบนกระดาษกรอง (positive) ชั่วโมงที่ 17
อ่านผล 1 นาที และ 2 นาที ตามลำดับ



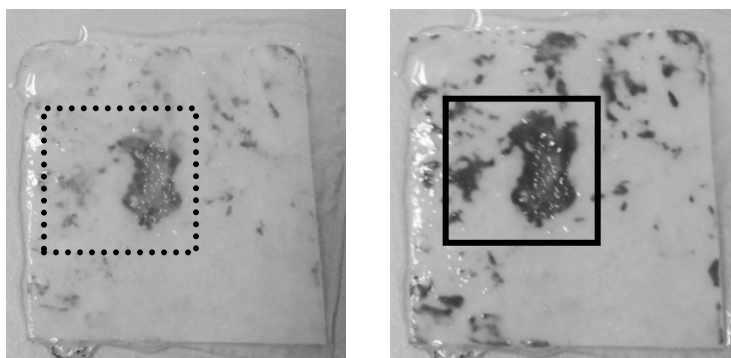
ภาพที่ 3.38 การตอบสนองของเซลล์แบคทีเรียบนกระดาษกรอง (positive) ชั่วโมงที่ 18
อ่านผล 1 นาที และ 2 นาที ตามลำดับ



ภาพที่ 3.39 การตอบสนองของเซลล์แบคทีเรียบนกระดาษกรอง (positive) ชั่วโมงที่ 19
อ่านผล 1 นาที และ 2 นาที ตามลำดับ



ภาพที่ 3.40 การตอบสนองของเซลล์แบคทีเรียบนกระดาษกรอง (positive) ชั่วโมงที่ 20
อ่านผล 1 นาที และ 2 นาที ตามลำดับ

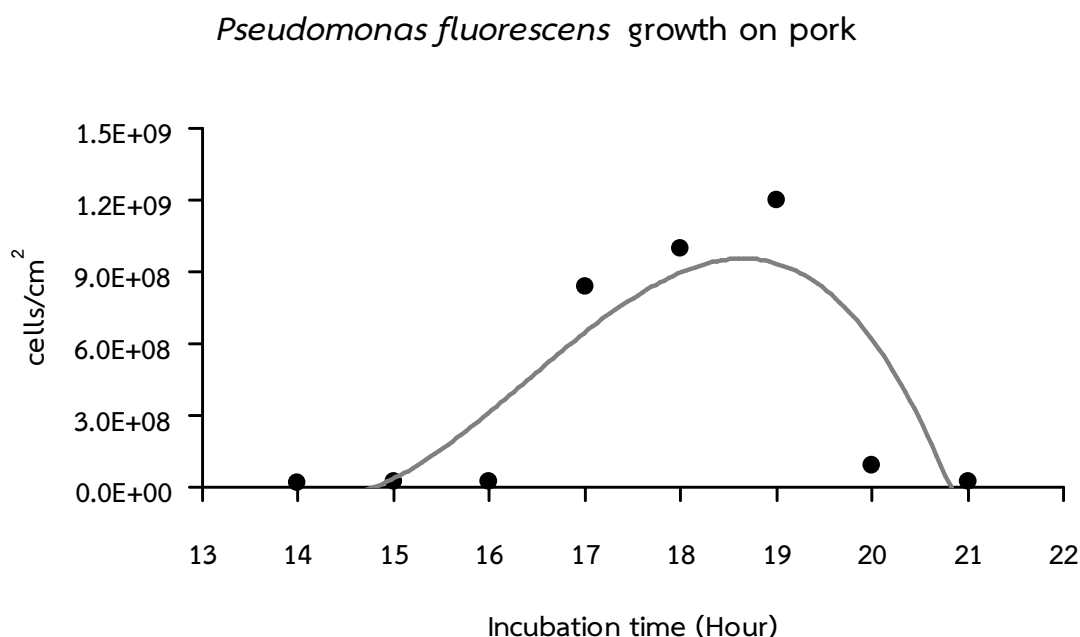


ภาพที่ 3.41 การตอบสนองของเซลล์แบคทีเรียบนกระดาษกรอง (positive) ชั่วโมงที่ 21
อ่านผล 1 นาที และ 2 นาที ตามลำดับ

- จำนวนเซลล์/ตารางเซนติเมตร ชั่วโมงที่ 14-19 (ตารางที่ 3.21 และ ภาพที่ 3.42)

ตารางที่ 3.21 จำนวนเซลล์ *Pseudomonas fluorescens* ต่อตารางเซนติเมตรของกระดาษกรองที่ลอกจากผิวเนื้อสุกร

ชั่วโมงการบ่มเพาะ	เซลล์/ตารางเซนติเมตร	ภาพที่	ระยะเวลาการอ่านผล	
			1 นาที	2 นาที
14	2.0×10^7	17	✓	✓
15	2.4×10^7	18	✓	✓✓
16	2.3×10^7	19	✓✓	✓✓✓
17	8.4×10^8	20	✓✓	✓✓✓
18	1.0×10^9	21	✓✓	✓✓✓
19	1.2×10^9	22	✓✓	✓✓✓
20	8.9×10^7	23	✓	✓✓✓
21	2.6×10^7	24	✓	✓✓



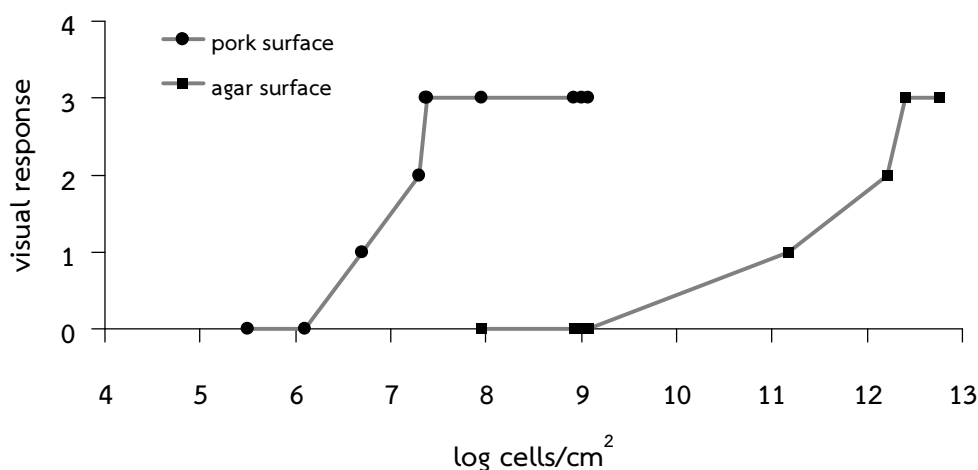
ภาพที่ 3.42 การเพิ่มจำนวนของ *Pseudomonas fluorescens* บนเนื้อสุกรที่ 25 °ซ

สรุปผลการทดสอบ (pork surface)

- การอ่านผล ณ เวลา 1 นาที (lower visibility)
 - สามารถสังเกตเห็นการตอบสนองด้วยตาเปล่า (visual response) ได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 14 แต่มีระดับการตอบสนอง (ความชัด) น้อยกว่า
 - จำนวนเซลล์ขั้นต่ำที่สามารถสังเกตเห็นการตอบสนองด้วยตาเปล่า (visual response) คือ 2.0×10^7 เซลล์ หรือ $> 7 \log \text{ cells/cm}^2$
- การอ่านผล ณ เวลา 2 นาที (higher visibility)
 - สามารถสังเกตเห็นการตอบสนองด้วยตาเปล่า (visual response) ได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 14 แต่มีระดับการตอบสนอง (ความชัด) มากกว่า
 - จำนวนเซลล์ขั้นต่ำที่สามารถสังเกตเห็นการตอบสนองด้วยตาเปล่า (visual response) คือ 2.0×10^7 เซลล์ หรือ $> 7 \log \text{ cells/cm}^2$
 - ใกล้เคียงกับการอ่านผล ณ เวลา 1 นาที
- แม้ว่า การตอบสนองด้วยตาเปล่า (visual response) ของการอ่านผลกระดาศกรงที่ลอกจากผิวเนื้อสุกร ณ เวลา 1 นาที และ ณ เวลา 2 นาที จะไม่แตกต่างกัน แต่การตอบสนอง ณ เวลา 2 นาที มีความชัดเจนมากกว่า ดังนั้น จึงแนะนำให้อ่านผลการตอบสนอง ณ เวลา 2 นาที เช่นเดียวกับการทดสอบบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (agar)
- การตอบสนองที่สังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่าจากกระดาศกรงที่ลอกจากผิวเนื้อสุกร มีลักษณะเป็นแบบมีขั้นต่ำ หรือ threshold กล่าวคือ แบคทีเรียมีการเพิ่มจำนวนอย่างต่อเนื่อง โดยไม่สามารถ

สังเกตเห็นการตอบสนอง จนกระทั่ง จำนวนเซลล์เพิ่มจำนวนถึงจำนวนเซลล์ขั้นต่ำ ก็จะสามารถสังเกตเห็นการตอบสนองได้ด้วยตาเปล่า (visible response) เช่นเดียวกับการณ์ของการทดสอบบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (agar) ดังภาพที่ 3.43 และ ตารางที่ 3.22

Visual response on pork surface & agar surface as a function of *Pseudomonas fluorescens* cell number



ภาพที่ 3.43 เปรียบเทียบการตอบสนอง (visual response) จำนวน *Pseudomonas fluorescens* บนกระดาดกรงที่ลอกจากผิวเนื้อสุกร (pork surface) และผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ (agar surface)

ตารางที่ 3.22 จำนวนเซลล์ *Pseudomonas fluorescens* ต่อตารางเซนติเมตรของกระดาดกรงที่ลอกจากผิวเนื้อสุกร (pork surface) และผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ (agar surface)

ชั่วโมงการบ่มเพาะ	ผิวเนื้อสุกร		ผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ	
	เซลล์/ซม ²	ผลการตอบสนอง*	เซลล์/ซม ²	ผลการตอบสนอง*
14	2.0×10^7	✓	$<1.5 \times 10^{11}$	✗
15	2.4×10^7	✓✓	1.5×10^{11}	✓
16	2.3×10^7	✓✓✓	1.5×10^{11}	✓
17	8.4×10^8	✓✓✓	1.6×10^{12}	✓✓
18	1.0×10^9	✓✓✓	2.5×10^{12}	✓✓✓
19	1.2×10^9	✓✓✓	5.6×10^{12}	✓✓✓

* อ่านผลการตอบสนองที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่า (visual response) ณ เวลา 2 นาทีหลังหยดน้ำยา

- *Pseudomonas fluorescens* สามารถเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่องบนผิวเนื้อสุกรในระหว่าง ชั่วโมงที่ 1-19 โดยสังเกตจากความเข้มข้นเซลล์ ในชั่วโมงที่ $14 = 7 \log \text{ cells/cm}^2$ เพิ่มขึ้นใน ชั่วโมงที่ $19 = 9 \log \text{ cells/cm}^2$ ในขณะที่ ชั่วโมงที่ 20-21 ความเข้มข้นลดลงมาเท่ากับ ความเข้มข้นในชั่วโมงที่ $14 = 7 \log \text{ cells/cm}^2$ คาดว่า อาจเกิดจากสภาวะสิ่งแวดล้อมบนผิวเนื้อสุกรไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของ *Pseudomonas fluorescens* ทำให้ไม่สามารถแข่งขันกับแบคทีเรียชนิดอื่น (ที่ให้ผลลบต่อ Oxidase) ที่เพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้นกว่า *Pseudomonas fluorescens*
- การตอบสนองของ *Pseudomonas fluorescens* บนผิวเนื้อสุกร (pork surface) มีความไวมากกว่าการตอบสนองบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ (agar surface) ทั้งนี้อาจจะเนื่องจาก *Pseudomonas fluorescens* สามารถเจริญเติบโตบนผิวเนื้อสุกรซึ่งมีปัจจัยส่งเสริมการเจริญเติบโตครบถ้วนกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง ดังตารางที่ 3.22 และ ภาพที่ 3.43

3.4.3.2 ระดับภาคสนามเบื้องต้น

(Preliminary field scale)

วิธีการทดสอบ

- เก็บตัวอย่างเนื้อสุกร (ส่วนสันนอก) จากเขียงตลาดสดจำนวน 48 ตัวอย่าง
 - นำตัวอย่างสุกรผ่านการทดสอบเพื่อเปรียบเทียบ การปนเปื้อนของ *Pseudomonas fluorescens* โดย ¹ใช้ชุดทดสอบ (test kit) และ ²ใช้การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ (laboratory test)
1. ชุดทดสอบ Oxidase test
 - ตัดกระดาษกรอง WhatmanTM No.1 เป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสให้มีขนาดมาตรฐาน 1"x1" เทียบเท่ากับ 6.45 ตารางเซนติเมตร (cm²) นำไปวางบนผิวหน้าเนื้อสุกร และรอสักครู่เพื่อให้กระดาษดูดซับ *Pseudomonas fluorescens* ขึ้นมาติดบนผิวของกระดาษกรอง
 - ใช้ปากคีบ (forceps) หนีบลอกกระดาษกรองออกจากผิวเนื้อสุกร
 - หยด 10% Tetra-methyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD) ปริมาตร 120 µl ลงบนกระดาษกรองให้ทั่ว อ่านผลโดยสังเกตสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นกับ *Pseudomonas fluorescens*
 - อ่านผลการเกิดปฏิกิริยา ครั้งที่ 1 เมื่อเกิดปฏิกิริยานาน 60 วินาที
 - อ่านผลการเกิดปฏิกิริยา ครั้งที่ 2 เมื่อเกิดปฏิกิริยานาน 120 วินาที
 2. การทดสอบทางห้องปฏิบัติการ
 - ชั่งเนื้อสุกร 25 กรัม นำมาผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันกับ Buffered peptone water (BPW) ปริมาตร 225 ml ให้ได้การเจือจางลง 10 เท่า (เจือจาง 10⁻¹) แล้วทำ serial 10-fold dilution ด้วย BPW อีกชั้นประมาณ 8-10 dilutions
 - นำสารละลายของแต่ละ dilution ปริมาตร 0.1 ml มาเพาะเชื้อด้วยวิธี spread plate ลงบน *Pseudomonas* CFC selective agar (SR0103) บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 25°C นาน 48 ชม.
 - นับจำนวน colony ของ *Pseudomonas fluorescens* ที่เรืองแสง (fluorescent) ภายใต้แสง UVA ความยาวคลื่น 500 nm
 - นับจำนวนโคโลนี *Pseudomonas fluorescens* ในแต่ละ plate แล้วคำนวณจำนวน *Pseudomonas fluorescens* ในหน่วย cfu/g
 - หาความสัมพันธ์ระหว่าง การตอบสนองของ *Pseudomonas fluorescens* โดยการใช้ชุดทดสอบ Oxidase test (visual response) และ จำนวน *Pseudomonas fluorescens* ที่วิเคราะห์ได้ทางห้องปฏิบัติการ (laboratory result) โดยพิจารณาจาก

- correlation coefficient (r) มีค่าระหว่าง -1 ถึง +1 กล่าวคือ
 - $r < 0$ หรือ ค่าลบ (negative) คือ ผลการตอบสนองจากการใช้ชุดทดสอบ (visual response) แปรผกผันกับ จำนวน *Pseudomonas fluorescens* ที่วิเคราะห์ได้ทางห้องปฏิบัติการ (laboratory result) โดยระดับการแปรผกผันมากขึ้น เมื่อ r เข้าใกล้ -1
 - $r = 0$ คือ ผลการตอบสนองจากการใช้ชุดทดสอบ (visual response) ไม่ผันแปรกับ จำนวน *Pseudomonas fluorescens* ที่วิเคราะห์ได้ทางห้องปฏิบัติการ (laboratory result)
 - $r > 0$ หรือ ค่าบวก (positive) คือ ผลการตอบสนองจากการใช้ชุดทดสอบ (visual response) แปรผันตรง กับจำนวน *Pseudomonas fluorescens* ที่วิเคราะห์ได้ทางห้องปฏิบัติการ (laboratory result) โดยระดับการแปรผันมากขึ้น เมื่อ r เข้าใกล้ +1

ผลการทดสอบ

- การจัดเรียงเรียงข้อมูลของ 2 ตัวแปร (visual response vs. laboratory result) ที่ให้ผลการทดลองที่เป็นไปได้ 2 ทาง คือ การพบ/ไม่พบการปนเปื้อน ทำให้แบ่งผลการวิเคราะห์ได้เป็น 4 กลุ่ม ดังตารางที่ 3.23

ตารางที่ 3.23 ความสอดคล้องกันของการวิเคราะห์ *Pseudomonas fluorescens* ด้วยวิธีทางห้องปฏิบัติการ และ ชุดทดสอบ Oxidase

จำนวนตัวอย่างเนื้อสุกรที่วิเคราะห์การปนเปื้อน <i>Pseudomonas fluorescens</i>		ผล Oxidase test	
		พบการปนเปื้อน (positive)	ไม่พบการปนเปื้อน (negative)
ผลการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ (laboratory result)	พบการปนเปื้อน (positive)	5	0
	ไม่พบการปนเปื้อน (negative)	28	15

- กรณีที่ visual response และ laboratory result ขัดแย้งกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง
 - Visual response ให้ผลบวก แต่ Laboratory result ให้ผลลบ หมายความว่า ชุดทดสอบมีความสามารถในการระบุการปนเปื้อน ในขณะที่ การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการกลับไม่สามารถตรวจพบการปนเปื้อนได้ ดูเหมือนว่า ชุดทดสอบให้ผลบวกหลวง (false positive)
 - คำอธิบายที่เป็นไปได้ คือ
 - การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการโดย spread plate นั้น จะมีการเจริญเติบโตของแบคทีเรียอื่นๆ จำนวนมากทับซ้อนกับ *Pseudomonas fluorescens*

- ส่งผลทำให้ plate ที่มี dilution ต่ำๆ ซึ่งมีความหนาแน่นของเชื้อมากจนกระทั่งไปบดบังการเรืองแสงของ *Pseudomonas fluorescens* แม้ว่าจะมี *Pseudomonas fluorescens* อยู่ แต่ laboratory result ก็อาจจะไม่สามารถระบุหรือนับจำนวน colony ของ *Pseudomonas fluorescens* ได้
- ในขณะที่ติดข้อจำกัดของ laboratory result กลับสร้างข้อได้เปรียบของชุดทดสอบ Oxidase test เนื่องจากการทดสอบที่จำเพาะ (specific) จากการเกิดสีน้ำเงินเฉพาะแบคทีเรียที่ให้ผลบวกกับ oxidase test เท่านั้น ดังนั้นการปนเปื้อนแม้เพียงเล็กน้อยของ *Pseudomonas fluorescens* ท่ามกลางการปนเปื้อนอย่างหนาแน่นของแบคทีเรียคู่แข่งอื่นๆ ชุดทดสอบก็ยังสามารถสังเกตเห็นการตอบสนองได้
 - อัตราการให้ผลบวกจากการใช้ชุดทดสอบสูงถึงร้อยละ 68.75 (33/48) ในขณะที่ผลบวกจากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการกลับให้ผลบวกเพียงร้อยละ 10.42 (5/48)
 - เมื่อนำผลการตอบสนองที่พบการปนเปื้อน (positive) และ ผลทางห้องปฏิบัติการที่พบการปนเปื้อน (positive) เฉพาะที่มีความสอดคล้องกัน (agreement) คือ 20 ตัวอย่างที่ปนเปื้อน และ 7 ตัวอย่างที่ไม่ปนเปื้อน
 - ค่า r หรือ correlation coefficient ประมาณ 0.9511 (หรือ ร้อยละ 95) แสดงว่า ผลการตอบสนองจากการใช้ชุดทดสอบ (visual response) แปรผันตรงกับจำนวน *Pseudomonas fluorescens* ที่วิเคราะห์ได้ทางห้องปฏิบัติการ (laboratory result) อย่างมาก ซึ่งสอดคล้องกับค่า $r^2 = 0.9048$ ดังภาพที่ 3.44
 - ความสัมพันธ์ของจำนวน *Pseudomonas fluorescens* และระดับการตอบสนองของ Catalase test kits เบื้องต้น ได้ 1 แบบจำลอง คือ

$$y_{PS1} = 0.2878x + 0.0009 \quad (\text{CR PS1})$$

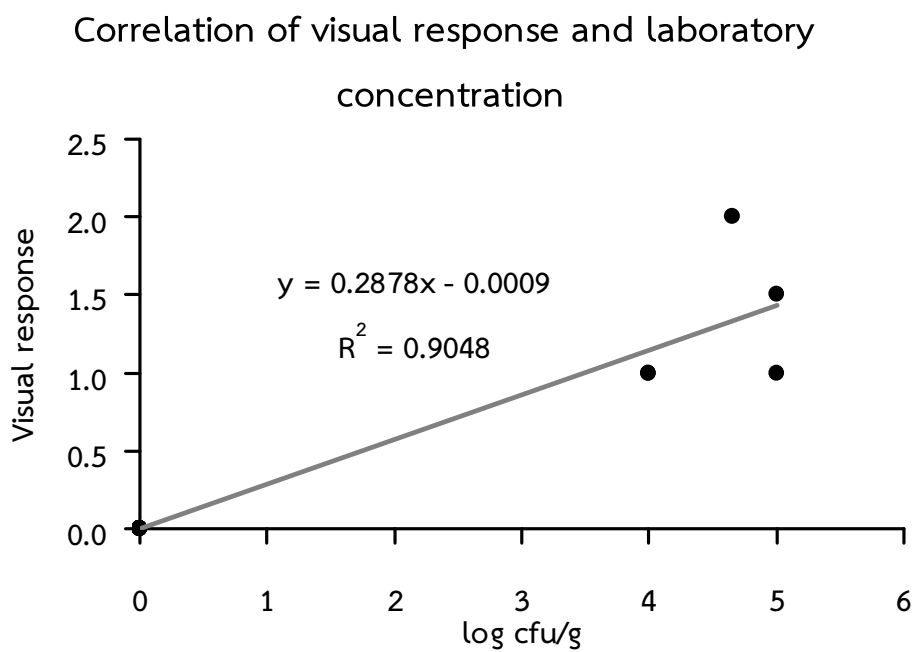
โดยที่

y คือ ระดับ Bacterial catalase activity (BCA)

x คือ ระดับการปนเปื้อน *Pseudomonas fluorescens* ($\log \text{ cfu/cm}^2$)

เมื่อปรับตำแหน่งและกำหนดค่าของตัวแปร x และ y ทำให้ได้ 2 แบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนอง response contamination (RC) models

$$Pseudomonas\ fluorescens\ (\log\ \text{cfu} / g) = \frac{\text{visual response} + 0.0009}{0.2878} \quad (\text{VC PS1})$$



ภาพที่ 3.44 ความสัมพันธ์ของ ผลการตอบสนองจากการใช้ชุดทดสอบ (visual response) แปรผันตรงกับจำนวน *Pseudomonas fluorescens* ที่วิเคราะห์ได้ทางห้องปฏิบัติการ (laboratory result)

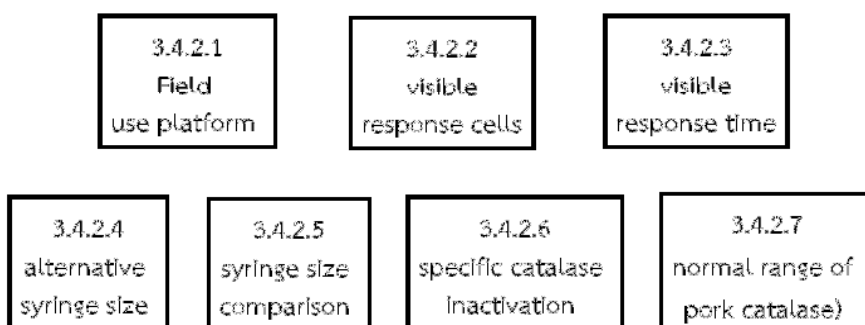
3.4.2 การเตรียมการศึกษาลักษณะการตอบสนองของเซลล์แบคทีเรียนำไปประยุกต์ใช้จริงกับ เนื้อสุกร (CATALASE TEST) (rapid test preparation experiment for field use)

CATALASE TEST

การเตรียมการศึกษาลักษณะการตอบสนองของเซลล์แบคทีเรียนำไปประยุกต์ใช้จริงกับเนื้อสุกร ของ
Catalase test ประกอบด้วย 7 การทดสอบ (ดังภาพที่ 3.45) คือ

- 3.4.2.1 การศึกษารูปแบบของชุดทดสอบที่เหมาะสมใช้ในภาคสนาม
(Field use platform)
- 3.4.2.2 การศึกษาจำนวนเซลล์แบคทีเรียขั้นต่ำในการตอบสนองของเซลล์แบคทีเรีย
(visible response cells)
- 3.4.2.3 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสังเกตผลการตอบสนอง
(visible response time)
- 3.4.2.4 การศึกษาขนาด syringe เพิ่มเติมในการสังเกตผลการตอบสนอง
(alternative syringe size)
- 3.4.2.5 การคัดเลือกขนาด syringe ในการสังเกตผลการตอบสนอง
(syringe size comparison)
- 3.4.2.6 การศึกษาการทำลาย Catalase จำเพาะ
(specific Catalase Inactivation)
- 3.4.2.7 การศึกษาพิสัยปกติของ pork catalase
(normal range of pork catalase)

3.4.2 rapid test preparation experiment for field use (CATALASE TEST)



ภาพที่ 3.45 การเตรียมการศึกษาลักษณะการตอบสนองของเซลล์แบคทีเรียนำไปประยุกต์ใช้จริงกับเนื้อสุกร

3.4.2.1 การศึกษารูปแบบของชุดทดสอบที่เหมาะสมใช้ในภาคสนาม

(Field use platform)

- ข้อจำกัดของรูปแบบการวัดการทำงานของ Catalase (Catalase activity)

1. วิธี Titrimetric (ภาพที่ 3.46)

ปี ค.ศ. 1926 นาย Von Euler และนาย Josephson ได้พัฒนาวิธี titrimetric โดยการใช้ hydrogen peroxide ที่ทราบปริมาณแน่นอน นำผสมกับ phosphate buffer แล้วทำให้เย็นที่ 0°C จากนั้นเติมสารละลาย Catalase ลงไป จากนั้นจึงหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟูริก เป็นวิธีที่ดีที่สุดในการทดสอบ Catalase

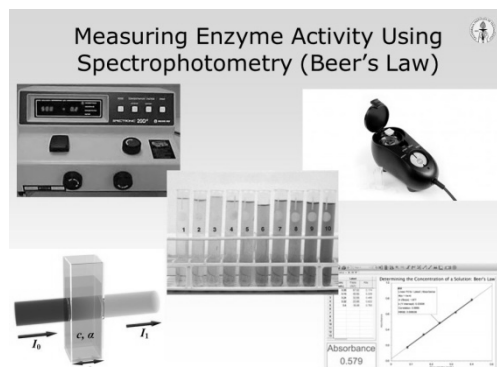


ภาพที่ 3.46 อุปกรณ์ในการวัดการทำงานของ Catalase โดยวิธี Titrimetric

ข้อจำกัด : อุปกรณ์ทางห้องปฏิบัติการซับซ้อน เครื่องแก้วแตกหักเสียหาย การติดตั้งยุ่งยาก เสียเวลา ต้องการสถานที่ สารเคมีอันตราย

2. วิธี Spectrophotometric (ภาพที่ 3.47)

ปี ค.ศ. 1950 นาย Chance และ นาย Herbert ได้พัฒนาวิธีการวัดการทำงานของ Catalase โดย spectrophotometer กล่าวคือ hydrogen peroxide ยอมให้แสงผ่านได้ที่ความยาวคลื่นแสง 230-250 nm การทดสอบโดยการวัดแสงผ่านสารละลายผสมของ Catalase 1 ul ในการสลาย 1:5,000 hydrogen peroxide 3 มล. ลดลงในเวลา 10, 20, 30, 50 และ 70 วินาที



ภาพที่ 3.47 อุปกรณ์ในการวัดการทำงานของ Catalase โดยวิธี Spectrophotometric

ข้อจำกัด : เครื่อง spectrophotometer ราคาสูง เครื่องแก้วแตกหักเสียหาย การติดตั้งยุ่งยาก เสียเวลา ต้องการสถานที่

3. วิธี Manometric (ภาพที่ 3.48)

ปี ค.ศ. 1948 นาย George ได้พัฒนาวิธีวัดการทำงานของ Catalase โดยการวัดปริมาณออกซิเจนที่เกิดขึ้นระหว่างการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง Catalase และ hydrogen peroxide วิธีนี้สามารถวัดความเร็วของการเกิดปฏิกิริยาได้ด้วย

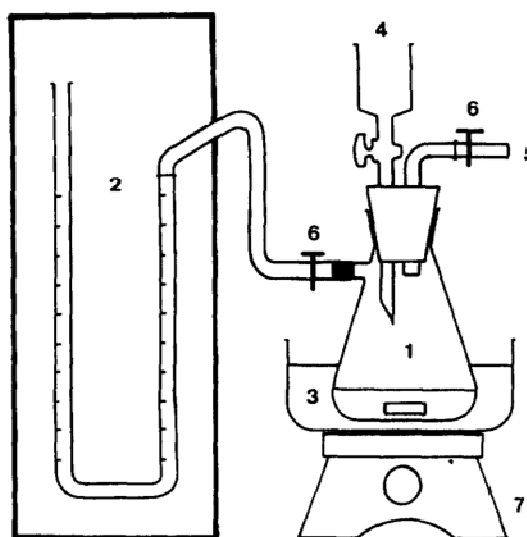


Figure 1 Experimental set-up: (1) Buchner flask; (2) water manometer; (3) water bath; (4) tap funnel; (5) gas vent; (6) clamps; (7) magnetic stirrer

ภาพที่ 3.48 อุปกรณ์ในการวัดการทำงานของ Catalase โดยวิธี Manometric

ข้อจำกัด : อุปกรณ์ทางห้องปฏิบัติการซับซ้อน เครื่องแก้วแตกหักเสียหาย การติดตั้งยุ่งยาก เสียเวลา ต้องการสถานที่ อันตรายจากความร้อน

4. วิธี Catalase meter

4.1 วิธี Catalase meter ด้วย Paper Disc System

บริษัท Bio-Engineering Group จำกัด เมือง New Haven รัฐ Cincinnati สหรัฐอเมริกา ได้พัฒนาเครื่องมือวัดเวลาการลอยตัว (floatation time) ของกระดาษกระดาษ (paper disc) ที่มี Catalase (ภาพที่ 3.49)



Fig. 2. Catalasemeter

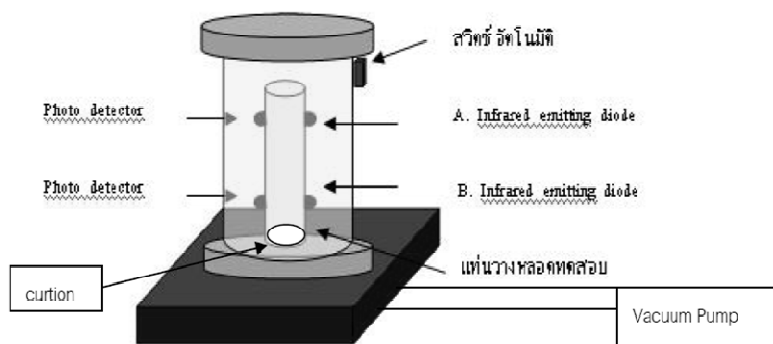
ภาพที่ 3.49 เครื่องวัดการทำงานของ Catalase จำหน่ายโดย บริษัท Bio-Engineering Group จำกัด

การทดสอบทำได้โดยเติมสารละลาย 3% hydrogen peroxide (น้ำ และ EDTA 10^{-6} M.) 5 มล. ลงในหลอดทดลองและวางลงในเครื่องมือ แล้วนำ paper disc ซุปตัวอย่างไปวางลงในหลอดทดลองที่เตรียมไว้ทันที paper disc จะตกลงสู่ผิวสารละลายด้วยแรงดึงดูดของโลก เริ่มจับเวลา ตั้งแต่เริ่มวาง paper disc ลงในหลอดทดลอง (start) หากตัวอย่างมี Catalase ก็จะเกิดปฏิกิริยากับ สารละลาย hydrogen peroxide ที่กั้นหลอด เกิดฟองอากาศ (gas bubbles) ขึ้นมา จนดันให้ paper disc ลอยตัวขึ้นมาจากผิวสารละลาย hydrogen peroxide ช่วงระยะเวลาหนึ่ง เมื่อ paper disc ตกกลับสู่ผิวสารละลาย hydrogen peroxide ให้หยุดการจับเวลา (stop) ระยะเวลาตั้งแต่เริ่มจนหยุดปฏิกิริยา เรียกว่า เวลาการลอยตัว (floatation time) โดยเวลาการลอยตัวจะแปรผกผันกับการทำงานของ Catalase ทำให้สามารถใช้เครื่องมือในการวัดการทำงานของ Catalase ได้

ข้อจำกัด : อุปกรณ์ราคาสูง เครื่องแกว่งแตกหักเสียหาย การติดตั้งยุ่งยาก เสียเวลา

4.2 วิธี vacuum Catalase meter

คณะนักวิจัย จิรวัดน์ กันต์เกรียงวงศ์, วิชัย พาชู, ประเวทย์ ด้อยเต็มวงศ์, วรพจน์ สุนทรสุข และ ขรณี ด้อยเต็มวงศ์ (Kunkriengwong et al., 2006) ได้พัฒนาวิธีการเพิ่มประสิทธิภาพและความไวของเครื่อง Catalase meter โดยใช้แรงดันสุญญากาศช่วยเป็นแรงเริ่มต้นในการลอยตัวของ paper disc เพื่อประมาณจำนวนแบคทีเรียที่มีปริมาณน้อยได้ (ภาพที่ 3.50)



ภาพที่ 3.50 แผนภูมิองค์ประกอบของเครื่อง vacuum Catalase meter โดยคณะนักวิจัยไทย

ข้อจำกัด : อุปกรณ์ทางห้องปฏิบัติการซับซ้อน เครื่องแก้วแตกหักเสียหาย การติดตั้งยุ่งยาก เสียเวลา ต้องการสถานที่

5. วิธี Test tube (ภาพที่ 3.51)

วิธีนี้สามารถวัดอัตราการเกิดปฏิกิริยาได้ โดยการใส่ตัวอย่างที่เป็นของแข็งหรือของเหลวลงในหลอดทดลองปลอดเชื้อ จากนั้นเติมสารละลาย hydrogen peroxide ลงไป บันทึกผลการทดลองเป็น ระดับชั้น คือ แรง (strong) ปานกลาง (moderate) น้อย (low) หรือ ไม่มี (no) นิยมใช้วิธีนี้ในการทดสอบการทำงานของ Catalase ในเนื้อสัตว์

ข้อจำกัด : เครื่องแก้วแตกหักเสียหาย



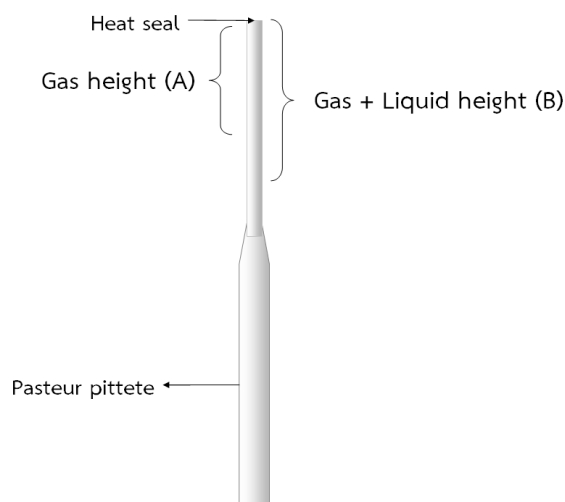
ภาพที่ 3.51 อุปกรณ์ในการวัดการทำงานของ Catalase โดยวิธี Test tube

6. วิธี Capillary tube (ภาพที่ 3.52)

ปี ค.ศ. 1985 นาย Fung ได้พัฒนาวิธีการใช้หลอด capillary อย่างง่ายๆ โดยการลนปิดปลายหลอด Pasteur pipette ด้านแคบด้วยความร้อน โดยการผสมสารละลาย hydrogen peroxide และ Catalase ให้ทำปฏิกิริยากันที่ปลาย Pasteur pipette ที่ลนปิดด้วยความร้อน เมื่อกลับหัวด้านที่ลนปิดด้วยความร้อนขึ้น ฟองอากาศ (gas bubbles) ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาก็จะลอยตัวสะสมที่

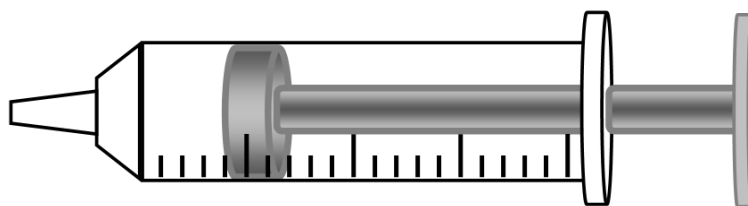
ด้านบนของ Pasteur pipette โดยปริมาณฟองอากาศที่สะสมจะแปรผันตรงกับการทำงานของ Catalase

ข้อจำกัด : 1. เครื่องแก้วแตกหักเสียหาย



ภาพที่ 3.52 การทดสอบการทำงานของ Catalase โดยวิธี Capillary tube

- เงื่อนไขของรูปแบบชุดทดสอบที่แก้ไขข้อจำกัดของการทดสอบที่ผ่านมา เป็นมีความเป็นไปได้ในการพัฒนาต่อเนื่องในภาคสนาม เช่น การใช้อุปกรณ์ที่เป็นพลาสติก วัสดุหาง่าย ราคาถูก ไม่แตกหักเสียหาย และ อ่านการตอบสนองเชิงปริมาณได้ (quantitative response)
- วิธี capillary tube มีศักยภาพที่จะพัฒนาไปเป็นชุดทดสอบภาคสนามได้ เนื่องจาก มีข้อจำกัดที่น้อยที่สุด และ ยังให้ผลการตอบสนองเชิงปริมาณได้ด้วย
- ข้อจำกัดของการแตกหักเสียหายง่ายของ capillary tube จึงเลือกพิจารณาวัสดุอุปกรณ์ที่มีลักษณะรูปแบบที่คล้ายคลึงกัน เช่น หลอดฉีดยาซึ่งปัจจุบันนิยมใช้แบบพลาสติก เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาการติดเชื่อมระหว่างผู้ป่วยจากการใช้หลอดฉีดยาร่วมกัน
- หลอดฉีดยาพลาสติกใช้ครั้งเดียวทิ้ง (plastic disposable syringe) มีคุณสมบัติเบื้องต้นที่แก้ไขข้อจำกัดของ capillary tube กล่าวคือ ไม่แตกหักเสียหายง่าย (ภาพที่ 3.53)



ภาพที่ 3.53 แผนภูมิของหลอดฉีดยาพลาสติกใช้ครั้งเดียวทิ้ง (plastic disposable syringe)

- นอกจากนี้ หลอดฉีดยาพลาสติกใช้ครั้งเดียวทิ้ง ยังมีข้อได้เปรียบหลายประการ เช่น
 - ขนาดเล็ก (small) น้ำหนักเบา (light weight) และ ปลอดเชื้อ (sterile) ทำให้สะดวกในเตรียม เก็บรักษา และการใช้งาน
 - ราคาไม่แพง (affordable) ทำให้สามารถทดสอบตัวอย่างจำนวนมากได้
 - ให้ผลการตอบสนองเชิงปริมาณได้ (quantitative response) ทำให้สามารถแยกระดับการปนเปื้อนของตัวอย่างได้
- หลอดฉีดยาพลาสติกใช้ครั้งเดียวทิ้ง ยังมีหลายขนาดให้เลือกทดสอบ เช่น 1 มล. 3 มล. 5 มล. และ 10 มล. เป็นต้น ดังนั้นจึงมีศักยภาพในการปรับเลือกให้สอดคล้องกับระดับการปนเปื้อนของแบคทีเรียในเนื้อสุกรได้ดี
- เนื่องจาก platform ของ Oxidase test เป็นการใช้กระดาษกรองในการดูดซับแบคทีเรียจากผิวเนื้อสุกร
- เพื่อให้ชุดทดสอบ Catalase test มีความสอดคล้องหรือใช้ plate form เดียวกันกับ Oxidase test ดังนั้น จึงใช้กระดาษกรอง WhatmanTM No.1 รูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสให้มีขนาดมาตรฐาน 1" x 1" เทียบเท่ากับ 6.45 ตารางเซนติเมตร (cm²) นำไปวางบนผิวหน้าเนื้อสุกร และรอสักครู่เพื่อให้กระดาษกรองดูดซับแบคทีเรียขึ้นมาติดบนผิวของกระดาษกรอง

วิธีการทดสอบ

- การเลือกขนาด/ปริมาตรของหลอดฉีดยาพลาสติกใช้ครั้งเดียวทิ้ง ขนาด 3 มล. (ภาพที่ 3.54)

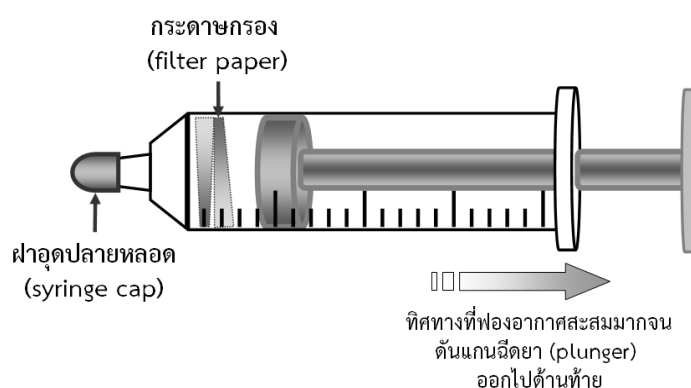


ภาพที่ 3.54 ตัวอย่าง syringe ขนาด 3 มล. ในการทดสอบ Catalase activity

- เตรียมกระดาษกรอง WhatmanTM No.1 รูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสให้มีขนาดมาตรฐาน 1" x 1" (สามารถซึมซับของเหลวได้ 100 ul ได้พอดี โดยที่ไม่เปียกโชกจนล้นกระดาษออกมา)
- คัดเลือกแบคทีเรียในการศึกษาที่ให้การตอบสนองต่อ Catalase test ดีที่สุด คือ *Serratia marcescens* เพื่อประเมินขนาดของหลอดฉีดยาที่มีขนาดความจุ (volume) เพียงพอที่จะรองรับการตอบสนองต่อ Catalase test ในรูปของฟองอากาศ (gas bubbles) ที่มากที่สุดที่แบคทีเรียปนเปื้อนเนื้อสัตว์จะสามารถสร้างได้
- เพาะบ่ม (subculture) *Serratia marcescens* ใน Brain Heart Infusion (BHI) ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้สารละลายแบคทีเรียที่มีความเข้มข้นสูงสุด เพื่อศึกษาการรองรับ Catalase activity หรือ การตอบสนองที่เกิดฟองอากาศที่มากที่สุด

- การทดสอบ Catalase activity

- นำสารละลาย *Serratia marcescens* ปริมาตร 100 ul หยดลงบนกระดาษกรอง Whatman™ No.1 รูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดมาตรฐาน 1"× 1"
- ใช้ปากคีบ (forceps) หนีบพับกระดาษกรองบรรจุลงในกระบอกฉีดยา (barrel) ทางด้านตรงข้ามกับปลายเข็มฉีดยา และประกอบแกนฉีดยา (plunger) เข้ากับกระบอกฉีดยา ขนาด 3 มล. (ภาพที่ 3.55)
- ดูดสารละลาย 3% hydrogen peroxide ปริมาตรประมาณ 400 ul เข้ามาในกระบอกฉีดยาเพื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย *Serratia marcescens* โดยให้ปลายแกนฉีดยาอยู่ที่ประมาณ 0.5 ml.
- ใช้วัสดุ เช่น ดินน้ำมัน หรือ วัสดุที่ปลายด้านเข็มฉีดยา (needle) เพื่อป้องกันมิให้สารละลายหรือฟองอากาศรั่วไหลออกจากกระบอกฉีดยา ทั้งนี้ต้องรีบใช้วัสดุอุดที่ปลายด้านเข็มฉีดยาทันทีเนื่องจากปฏิกิริยา Catalase เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วมาก



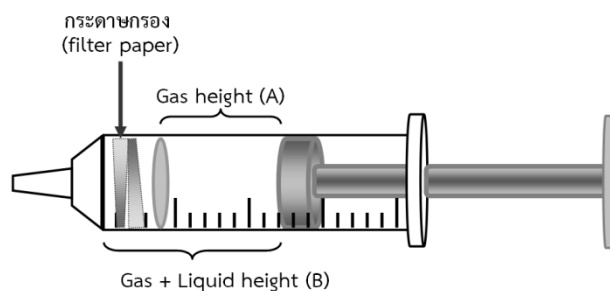
ภาพที่ 3.55 การประกอบอุปกรณ์ในการทดสอบการทำงานของ Catalase โดยวิธี syringe

- อ่านผลการตอบสนองของการทำงานของ Catalase ระยะเวลา 240 วินาที (4 นาที)
- คำนวณ Catalase activity (CA) โดย

A คือ ความสูงเฉพาะฟองอากาศสะสมรวมที่ปลายด้านแกนฉีดยา (ภาพที่ 3.56)

B คือ ความสูงรวมของเหลวและฟองอากาศสะสมรวมที่ปลายด้านแกนฉีดยา

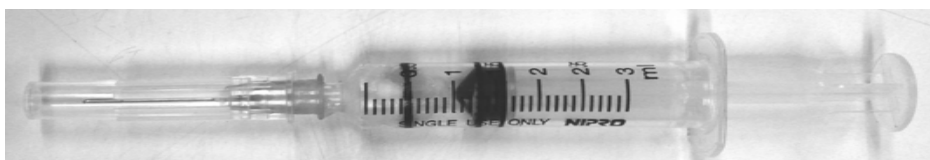
$$\% \text{ Catalase Activity} = \frac{A}{B} \times 100 \quad (3.5)$$



ภาพที่ 3.56 การทดสอบการทำงานของ Catalase โดยวิธี syringe

ผลการทดสอบ

- การคัดเลือกขนาด syringe :-
 - ขนาด 3 มล. สามารถรองรับฟองอากาศที่สร้างขึ้นมาจากปฏิกิริยาของ Catalase test ได้เพียงพอ ในขณะที่ยังสามารถคำนวณ Catalase activity ได้ด้วย ดังนั้น syringe ขนาด 3 มล. เหมาะสมในการใช้ทดสอบ ดังภาพที่ 3.57



ภาพที่ 3.57 แสดงผลการทดสอบ syringe Catalase โดยใช้ syringe ขนาด 3 มล.

- การคัดเลือกวัสดุอุดปลาย syringe :-
 - ดินน้ำมัน (oil-based clay) : สังเกตเห็นของเหลวซึมหรือหยดออกมาได้ อาจจะเนื่องจาก วัสดุมีลักษณะเป็นรูพรุนหรือมีช่องอากาศอยู่ (porous) ทำให้ของเหลวใน syringe สามารถแทรกตัวรั่วไหลออกมาได้ ดังนั้น ดินน้ำมัน ไม่เหมาะสมในการใช้ทดสอบ
 - เชื่อมฉินยาอุดปลายด้วยดินน้ำมัน (needle & oil-based clay) : สามารถอุดป้องกันมิให้ของเหลวซึมหรือหยดออกมาได้ สามารถเตรียมได้โดยการใช้ปลายเข็มกดลงในก้อนดินน้ำมันซ้ำหลายครั้ง จนกระทั่งดินน้ำมันอุดจนครบช่องว่างในปลายเข็มส่วนที่เป็นโลหะ ใช้อุปกรณ์ตัดปลายเข็มระยะประมาณกึ่งกลางของส่วนที่เป็นโลหะ ก็จะทำให้ปลายเข็มฉินยาถูกอุดและปิดช่องทางรั่วไหลได้ ดังนั้น เชื่อมฉินยาอุดปลายด้วยดินน้ำมันเหมาะสมในการใช้ทดสอบ

สรุปผลการทดสอบ

- รูปแบบการใช้ syringe มีความเหมาะสมในการศึกษาผลการตอบสนองของ *Serratia marcescens* ต่อการทดสอบ Catalase

3.4.2.2 การศึกษาจำนวนเซลล์แบคทีเรียขั้นต่ำในการตอบสนองของเซลล์แบคทีเรีย

(visible response cells)

เพื่อให้ทราบจำนวนเซลล์ขั้นต่ำในการตอบสนองของเซลล์แบคทีเรียต่อการทดสอบ

ดังนั้น จึงทำการศึกษานับจำนวนเซลล์แบคทีเรียในรูป Catalase activity เพื่อสังเกตผลของการตอบสนองต่อการทดสอบ

วิธีการทดสอบ

- เตรียมหลอดฉีดยาพลาสติกใช้ครั้งเดียวทิ้ง ขนาด 3 มล.
- เตรียมกระดาษกรอง WhatmanTM No.1 รูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสให้มีขนาดมาตรฐาน 1" x 1"
- คัดเลือกแบคทีเรียในการศึกษาที่ให้การตอบสนองต่อ Catalase test คือ
 - *Serratia marcescens*
 - *Staphylococcus aureus*
 - *Klebsiella spp.*
- เพาะบ่ม (subculture) แบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ใน Brain Heart Infusion (BHI) ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง ได้สารละลายแบคทีเรีย
 - *Serratia marcescens* ความเข้มข้นเริ่มต้น $\sim 1.09 \times 10^{12}$ cfu/ml
 - *Staphylococcus aureus* ความเข้มข้นเริ่มต้น $\sim 2.65 \times 10^{12}$ cfu/ml
 - *Klebsiella oxytoca* ความเข้มข้นเริ่มต้น $\sim 1.60 \times 10^{12}$ cfu/ml
- สารละลายแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ใน BHI ที่ได้จากการบ่มเพาะ แบ่งเป็น 2 ส่วน คือ
 - ส่วนที่ 1 : การเจือจางแบบ 10-fold serial dilution เพื่อหาระดับความเข้มข้นของสารละลายแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด
 - ส่วนที่ 2 : การทดสอบ Catalase activity
- การทดสอบ Catalase activity
 - นำสารละลายแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด มาเจือจางแบบ 2-fold serial dilution เพื่อลดจำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย เพื่อหาจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียที่น้อยที่สุดที่ทำให้ผลการทดสอบต่อ Catalase
 - นำสารละลายแบคทีเรียที่เจือจางแล้วปริมาตร 100 μ l หยดลงบนกระดาษกรอง WhatmanTM No.1 รูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดมาตรฐาน 1" x 1"
 - ใช้ปากคีบ (forceps) หนีบพับกระดาษกรองบรรจุลงในกระบอกฉีดยา (barrel) ทางด้านตรงข้ามกับปลายเข็มฉีดยา และประกอบแกนฉีดยา (plunger) เข้ากับกระบอกฉีดยา ขนาด 3 มล.

- ดูดสารละลาย 3% hydrogen peroxide ปริมาตรประมาณ 400 μ l เข้ามาในกระบอกฉีดยาเพื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย *Serratia marcescens* โดยให้ปลายแกนฉีดยาอยู่ที่ประมาณ 0.5 ml.
- ใช้เข็มฉีดยาอุดปลายด้วยดินน้ำมัน (needle & oil-based clay) จากการศึกษาในขั้นตอนที่ผ่านมา โดยนำมาอุดที่ปลายด้านเข็มฉีดยาทันทีเพื่อป้องกันมิให้สารละลายหรือฟองอากาศรั่วไหลออกจากกระบอกฉีดยา เนื่องจากปฏิกิริยา Catalase เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วมาก
- อ่านผลการตอบสนองของการทำงานของ Catalase ณ เวลา 240 วินาที (4 นาที)
- คำนวณ Catalase activity (CA)

ผลการทดสอบ

- การตอบสนองของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดต่อการทดสอบ Catalase ระยะเวลา 240 วินาที syringe ขนาด 3 มล. ให้ผลการตอบสนอง ดังตารางที่ 3.24-3.26

ตารางที่ 3.24 จำนวน *Serratia marcescens* ที่ตอบสนองในรูป Catalase activity ที่เวลา 240 วินาที syringe ขนาด 3 มล.

จำนวนเซลล์ที่ให้ผลการตอบสนอง (visible response cells)		ผลการตอบสนองในรูป Catalase activity (%)
cells	log cells	
1.09×10^{11}	11.0	77%
5.45×10^{10}	10.7	71%
2.73×10^{10}	10.4	38%
1.36×10^{10}	10.1	9%
6.81×10^9	9.8	9%
3.41×10^9	9.5	0
1.70×10^9	9.2	0

ตารางที่ 3.25 จำนวน *Staphylococcus aureus* ที่ตอบสนองในรูป Catalase activity ที่เวลา 240 วินาที syringe ขนาด 3 มล.

จำนวนเซลล์ที่ให้ผลการตอบสนอง (visible response cells)		ผลการตอบสนองในรูป Catalase activity (%)
cells	log cells	
2.65×10^{11}	11.4	38%
1.33×10^{11}	11.1	23%
6.63×10^{10}	10.8	0
3.31×10^{10}	10.5	0
1.66×10^{10}	10.2	0
8.28×10^9	9.9	0
4.14×10^9	9.6	0

ตารางที่ 3.26 จำนวน *Klebsiella oxytoca* ที่ตอบสนองในรูป Catalase activity ที่เวลา 240 วินาที syringe ขนาด 3 มล.

จำนวนเซลล์ที่ให้ผลการตอบสนอง (visible response cells)		ผลการตอบสนองในรูป Catalase activity (%)
Cells	log cells	
1.60×10^{11}	11.2	9%
8.00×10^{10}	10.9	0
4.00×10^{10}	10.6	0
2.00×10^{10}	10.3	0
1.00×10^{10}	10.0	0
5.00×10^9	9.7	0
2.50×10^9	9.4	0

- จำนวนเซลล์ขั้นต่ำของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดต่อการทดสอบ Catalase ระยะเวลา 240 วินาที ให้ผลการตอบสนอง ดังตารางที่ 3.27

ตารางที่ 3.27 จำนวนเซลล์แบคทีเรียขั้นต่ำที่ทำให้การตอบสนองในรูป Catalase activity ระยะเวลา 240 วินาที syringe ขนาด 3 มล.

แบคทีเรีย	จำนวนเซลล์ <u>ขั้นต่ำ</u> ที่ให้ผลการตอบสนอง (visible response cells)		Catalase activity (CA)
	cells	log cells	percent (%)
<i>Serratia marcescens</i>	6.81×10^9	9.8	9%
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.3×10^{11}	11.1	23%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1.6×10^{11}	11.2	9%

- แบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดที่ผ่านการทดสอบ Catalase ในระยะเวลาการสังเกตผลการตอบสนองนาน 240 วินาที พบว่าให้ผล visible response cells ที่แตกต่างกัน กล่าวคือ *Serratia marcescens* มี visible response cells ที่น้อยที่สุด ประมาณ 10 log cells ในขณะที่ *Staphylococcus aureus* และ *Klebsiella* spp. มี visible response cells ที่มากที่สุด ประมาณ 11 log cells ซึ่งสูงกว่า *Serratia marcescens* ถึงประมาณ 1 log (10 เท่า) ดังนั้น *Serratia marcescens* มีความไวต่อ Catalase test syringe ขนาด 1 มล. มากกว่า (higher sensitivity) ในขณะที่ *Staphylococcus aureus* และ *Klebsiella oxytoca* มีความไว ต่อ Catalase test syringe ขนาด 1 มล. น้อยกว่า (lower sensitivity)
- แบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดที่ผ่านการทดสอบ Catalase ในระยะเวลาการสังเกตผลการตอบสนองนาน 240 วินาที ให้น visible response cells เดียวกัน ให้ระดับการตอบสนอง (response) ในรูป Catalase activity ที่แตกต่างกัน กล่าวคือ *Staphylococcus aureus* มี %CA ที่สูงกว่า (23%) ในขณะที่ *Serratia marcescens* และ *Klebsiella oxytoca* มี %CA ที่ต่ำกว่า (9%)
- แม้จะดูเหมือนว่า จะมีความแตกต่างกันของ Catalase activity ระหว่าง 9% และ 23% อย่างไรก็ตาม Catalase activity ที่ 9% และ 23% คำนวณได้จากปริมาตรอากาศใน syringe เทียบเท่ากับ 0.05 มล. และ 0.15 มล. ตามลำดับ ดังนั้นจะเห็นได้ว่า ความแตกต่างดังกล่าว อาจจะไม่มีนัยสำคัญมากนักเมื่อนำไปใช้งานจริงในภาคสนาม

สรุปผลการทดสอบ

- จำนวนเซลล์ขั้นต่ำในการตอบสนองของเซลล์แบคทีเรียต่อการทดสอบ Catalase test syringe ขนาด 3 มล. (visible response cells) อยู่ในช่วงระหว่าง 10-11 log cells ขึ้นอยู่กับชนิดแบคทีเรีย โดยสามารถเรียงลำดับความไวต่อการตอบสนอง (response sensitivity) จากมากไปน้อย คือ *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* และ *Klebsiella oxytoca* ตามลำดับ

3.4.2.3 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสังเกตผลการตอบสนอง

(visible response time)

เพื่อให้ทราบระยะเวลาการสังเกตผลการตอบสนองที่เหมาะสมและสามารถใช้ได้ในทางปฏิบัติ ภาคสนาม ซึ่งโดยทั่วไป คือ ใช้เวลาที่สั้นที่สุดเพื่อความคล่องตัวในการใช้จริง ในขณะเดียวกัน ข้อพิจารณาที่ควรคำนึงถึงด้วย คือ ความครอบคลุมถึงกลุ่มแบคทีเรียที่ตอบสนองหน่วง (Delayed Catalase group) และกรณีระดับการปนเปื้อนของแบคทีเรียต่ำๆ (low contamination) อีกด้วย

ดังนั้น จึงศึกษาระยะเวลาการตอบสนองต่อ Catalase test ของแบคทีเรียทั้งกลุ่มตอบสนองทันที และกลุ่มตอบสนองหน่วง ณ ระดับการปนเปื้อนต่างๆ ที่สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า

วิธีการทดสอบ

- เตรียมหลอดฉีดยาพลาสติกใช้ครั้งเดียวทิ้ง ขนาด 3 มล.
- เตรียมกระดาษกรอง Whatman™ No.1 รูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสให้มีขนาดมาตรฐาน 1" x 1"
- คัดเลือกแบคทีเรียในการศึกษาที่ให้การตอบสนองต่อ Catalase test คือ
 - กลุ่มตอบสนองทันที คือ *Serratia marcescens*
 - กลุ่มตอบสนองหน่วง คือ *Staphylococcus aureus* และ *Klebsiella oxytoca*
- เพาะบ่ม (subculture) แบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ใน Brain Heart Infusion (BHI) ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง ได้สารละลายแบคทีเรีย
 - *Serratia marcescens* ความเข้มข้นเริ่มต้น ~ 1.09×10^{12} cfu/ml
 - *Staphylococcus aureus* ความเข้มข้นเริ่มต้น ~ 2.65×10^{12} cfu/ml
 - *Klebsiella oxytoca* ความเข้มข้นเริ่มต้น ~ 1.60×10^{12} cfu/ml
- สารละลายแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ใน BHI ที่ได้จากการบ่มเพาะ แบ่งเป็น 2 ส่วน คือ
 - ส่วนที่ 1 : การเจือจางแบบ 10-fold serial dilution เพื่อหาระดับความเข้มข้นของสารละลายแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด
 - ส่วนที่ 2 : การทดสอบ Catalase activity
- การทดสอบ Catalase activity
 - นำสารละลายแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด มาเจือจางแบบ 2-fold serial dilution เพื่อลดจำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย
 - นำสารละลายแบคทีเรียที่เจือจางแล้วปริมาตร 100 μ l หยดลงบนกระดาษกรอง Whatman™ No.1 รูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดมาตรฐาน 1" x 1"
 - ใช้ปากคีบ (forceps) หนีบพับกระดาษกรองบรรจุลงในกระบอกฉีดยา (barrel) ทางด้านตรงข้ามกับปลายเข็มฉีดยา และประกอปก้านฉีดยา (plunger) เข้ากับกระบอกฉีดยา ขนาด 3 มล.

- ดูดสารละลาย 3% hydrogen peroxide ปริมาตรประมาณ 400 μ l เข้ามาในกระบอกฉีดยาเพื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด โดยให้ปลายแกนฉีดยาอยู่ที่ประมาณ 0.5 ml.
- ใช้เข็มฉีดยาอุดปลายด้วยดินน้ำมัน (needle & oil-based clay) จากการศึกษาในขั้นตอนที่ผ่านมา โดยนำมาอุดที่ปลายด้านเข็มฉีดยาทันทีเพื่อป้องกันมิให้สารละลายหรือฟองอากาศรั่วไหลออกจากกระบอกฉีดยา เนื่องจากปฏิกิริยา Catalase เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วมาก
- อ่านผลการตอบสนองของการทำงานของ Catalase ทุก 30 วินาที เป็นเวลา 240 วินาที (4 นาที)
- คำนวณ Catalase activity (CA)

ผลการทดสอบ

- การตอบสนองของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดต่อการทดสอบ Catalase ทุก 30 วินาที เป็นเวลา 240 วินาที syringe ขนาด 3 มล. ให้ผลการตอบสนอง ดังตารางที่ 3.28-3.30

ตารางที่ 3.28 Catalase activity ของจำนวน *Serratia marcescens* ระยะเวลาสังเกตปฏิกิริยาทุก 30 วินาที syringe ขนาด 3 มล.

ระยะเวลาสังเกตการเกิดปฏิกิริยา (วินาที)	Log cells					
	11.0	10.7	10.4	10.1	9.8	9.5
30	38%	17%	0	0	0	0
60	62%	38%	9%	9%	0	0
90	72%	50%	17%	9%	0	0
120	77%	55%	23%	9%	0	0
150	77%	62%	29%	17%	0	0
180	77%	67%	29%	17%	0	0
210	77%	69%	38%	23%	9%	0
240	77%	71%	38%	23%	9%	0

ตารางที่ 3.29 Catalase activity ของจำนวน *Staphylococcus aureus* เวลาสังเกตปฏิกิริยาทุก 30 วินาที syringe ขนาด 3 มล.

ระยะเวลาสังเกตการเกิดปฏิกิริยา (วินาที)	Log cells					
	11.4	11.1	10.8	10.5	10.2	9.9
30	0	0	0	0	0	0
60	17%	17%	0	0	0	0
90	29%	17%	0	0	0	0
120	29%	17%	0	0	0	0
150	29%	17%	0	0	0	0
180	33%	17%	0	0	0	0
210	33%	17%	0	0	0	0
240	38%	23%	0	0	0	0

ตารางที่ 3.30 Catalase activity ของจำนวน *Klebsiella oxytoca* สังเกตปฏิกิริยาทุก 30 วินาที syringe ขนาด 3 มล.

ระยะเวลาสังเกตการเกิดปฏิกิริยา (วินาที)	Log cells					
	11.2	10.9	10.6	10.3	10.0	9.7
30	0	0	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0	0
90	0	0	0	0	0	0
120	0	0	0	0	0	0
150	9%	0	0	0	0	0
180	9%	0	0	0	0	0
210	9%	0	0	0	0	0
240	9%	0	0	0	0	0

- การตอบสนองต่อ Catalase test ของแบคทีเรีย สามารถแบ่งได้ 2 กลุ่ม ตามระยะเวลาในการตอบสนอง²² คือ
 - กลุ่มตอบสนองทันที (Immediate Catalase group) เช่น *Hafnia*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Serratia* และ *Yersinia*
 - กลุ่มตอบสนองหน่วง (Delayed Catalase group) เช่น *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* และ *Staphylococcus aureus*
- หากต้องการเปรียบเทียบระยะเวลาในการตอบสนองของแบคทีเรีย ดังนั้นจึงต้องพิจารณาเปรียบเทียบเวลาในการทดสอบจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่เท่ากันหรือใกล้เคียงกัน เงื่อนไขพื้นฐานคือ *Klebsiella oxytoca* มีความไวในการตอบสนองน้อยที่สุด (ต้องการจำนวนเซลล์ขั้นต่ำเพื่อตอบสนองมากที่สุด) จากตารางที่ 13 พบว่า *Klebsiella oxytoca* ให้การตอบสนองด้วยจำนวนเซลล์ขั้นต่ำ ประมาณ 11.2 log cells ดังนั้น จะใช้จำนวนเซลล์นี้ในการเปรียบเทียบการตอบสนองกับ *Staphylococcus aureus* และ *Serratia marcescens* ด้วย
- ระยะเวลาเริ่มต้นการตอบสนองของ *Serratia marcescens* *Staphylococcus aureus* และ *Klebsiella oxytoca* ต่อ Catalase test ที่ประมาณ 11.2 log cells เท่ากับ 30, 60 และ 150 วินาที ตามลำดับ
- ผลการทดสอบนี้มีความสอดคล้องกับรายงานโดย Chester and Moskowitz (1987) คือ
 - คุณสมบัติการตอบสนองของแบคทีเรียต่อ Catalase test มีความแตกต่างกัน
 - การตอบสนองของแบคทีเรียต่อ Catalase test แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ
 - กลุ่มตอบสนองทันที คือ *Serratia marcescens*
 - กลุ่มตอบสนองหน่วง คือ
 - *Staphylococcus aureus* และ
 - *Klebsiella oxytoca*
- การตอบสนองต่อ Catalase test ของ *Serratia marcescens* และ *Staphylococcus aureus* ที่จำนวนเซลล์ประมาณ 10-11 log (ตารางที่ 11-12) จะสังเกตได้ว่า การตอบสนองต่อ Catalase หรือ ลักษณะของการเกิดปฏิกิริยายังไม่จบ แม้ว่าจะระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยานานถึง 240 วินาที (4 นาที) ก็ตาม
 - ดังนั้น หากต้องการให้ Catalase test¹ สามารถครอบคลุมถึงแบคทีเรียกลุ่มตอบสนองหน่วง (Delayed Catalase group) กอปรกับ² กรณีที่ระดับการปนเปื้อนของแบคทีเรียมีจำนวนไม่มากนัก (ระหว่าง 10-11 log cells) อาจจะมีการพิจารณาขยายระยะเวลา

²² Chester, B. and Moskowitz, Lee. 1987. Rapid Catalase Supplemental Test for Identification of Members of the Family *Enterobacteriaceae* J. of Clinical Microbiology 25 (2) : 439-441

การสังเกตการตอบสนองให้นานขึ้น เช่น 5 นาที หรือกล่าวอีกอย่างหนึ่งได้ว่า ระยะเวลาที่นานขึ้น จะทำให้สามารถสังเกตผลการตอบสนองได้ดีขึ้น

- ข้อสังเกตถึงความแตกต่างกันของ visible response time ของ Catalase test และ oxidase test กล่าวคือ

- Catalase test สามารถหอดเวลาการทดสอบออกไปได้จนกระทั่งปฏิกิริยาสิ้นสุดเอง ซึ่งมีความเหมาะสมในการทดสอบเพื่อให้ครอบคลุมชนิดแบคทีเรียให้มากชนิดและกรณีที่จำนวนเซลล์แบคทีเรียปนเปื้อนน้อย (low contamination) ด้วย

- oxidase test ไม่สามารถหอดเวลาการทดสอบออกไปได้ กล่าวคือ ต้องมีการกำหนดระยะเวลาในการทดสอบ เนื่องจาก การหอดระยะเวลาการทดสอบออกไป จะทำให้เกิดผลบวกлож (false positive) กับแบคทีเรียทุกชนิดที่ทดสอบ เนื่องจาก สีน้ำเงินที่เกิดขึ้นมากจากการทำปฏิกิริยาของ oxidase reagent กับอากาศ

สรุปผลการทดสอบ

- เมื่อทดสอบ Catalase test กับแบคทีเรีย 3 ชนิดด้วยจำนวนเซลล์ที่เท่ากัน พบว่าระยะเวลาที่น้อยที่สุดที่ *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* และ *Klebsiella oxytoca* ตอบสนอง คือ 30, 60 และ 150 วินาที ตามลำดับ
- ดังนั้น เพื่อให้การทดสอบ Catalase test สามารถครอบคลุมการตอบสนองของแบคทีเรียทั้งกลุ่มตอบสนองทันที และ กลุ่มตอบสนองหน่วง จะต้องใช้เวลาขั้นต่ำในการสังเกตปฏิกิริยา (visible response time) ประมาณ 150 วินาที (3 นาที)

3.4.2.4 การศึกษาขนาด syringe เพิ่มเติมในการสังเกตผลการตอบสนอง

(alternative syringe size)

การทบทวนผลการศึกษาระดับการปนเปื้อนแบคทีเรียเสื่อมเนื้อสุกในการเก็บตัวอย่างระยะที่ 1 เพื่อหาระดับการปนเปื้อนพื้นฐาน (background contamination) พบว่า พิสัย (range) ของการปนเปื้อน *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas fluorescens* ในเนื้อสุกที่เก็บจากตลาดสดอยู่ระหว่าง 3.4-5.4 log cfu/g และ 4.0-7.7 log cfu/g ตามลำดับ

โดยเมื่อเปรียบเทียบระดับการปนเปื้อนดังกล่าวกับผลการศึกษาจาก หัวข้อ “visible response cells” และ “visible response time” จะสังเกตพบว่า การปนเปื้อน *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas fluorescens* ในเนื้อสุกจากตลาดสดอยู่ในระดับที่ต่ำกว่า ระดับที่ชุดทดสอบจะสามารถสังเกตเห็นการตอบสนองด้วยตาเปล่าได้

ดังนั้น แนวทางหนึ่งในการเพิ่มระดับความไว (sensitivity) ของการตอบสนองของ Catalase test คือ การศึกษา Catalase test ด้วย syringe ขนาด 1 มล. (เดิม syringe ขนาด 3 มล.) ทั้งนี้ยังอาจช่วยประหยัดต้นทุนชุดทดสอบในทางปฏิบัติภาคสนามได้อีกด้วย

วิธีการทดสอบ

- เตรียมหลอดฉีดยาพลาสติกใช้ครั้งเดียวทิ้ง ขนาด 1 มล. (ภาพที่ 3.58)



ภาพที่ 3.58 แสดงผลการทดสอบ syringe Catalase โดยใช้ syringe ขนาด 1 มล.

- เตรียมกระดาษกรอง WhatmanTM No.1 รูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสให้มีขนาดมาตรฐาน 1" x 1"
- คัดเลือกแบคทีเรียในการศึกษาที่ให้การตอบสนองต่อ Catalase test คือ
 - กลุ่มตอบสนองทันที คือ *Pseudomonas fluorescens*
 - กลุ่มตอบสนองหน่วง คือ
 - *Staphylococcus aureus* และ
 - *Klebsiella oxytoca*
- เพาะบ่ม (subculture) แบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ใน Brain Heart Infusion (BHI) ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง ได้สารละลายแบคทีเรีย
 - *Pseudomonas fluorescens* ความเข้มข้นเริ่มต้น ~ 1.09×10^{12} cfu/ml

- *Staphylococcus aureus* ความเข้มข้นเริ่มต้น $\sim 2.65 \times 10^{12}$ cfu/ml
- *Klebsiella oxytoca* ความเข้มข้นเริ่มต้น $\sim 1.60 \times 10^{12}$ cfu/ml
- สารละลายแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ใน BHI ที่ได้จากการบ่มเพาะ แบ่งเป็น 2 ส่วน คือ
 - ส่วนที่ 1 : การเจือจางแบบ 10-fold serial dilution เพื่อหาระดับความเข้มข้นของสารละลายแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด
 - ส่วนที่ 2 : การทดสอบ Catalase activity
- การทดสอบ Catalase activity
 - นำสารละลายแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด มาเจือจางแบบ 2-fold serial dilution เพื่อลดจำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย
 - นำสารละลายแบคทีเรียที่เจือจางแล้วปริมาตร 100 μ l หยดลงบนกระดาษกรอง WhatmanTM No.1 รูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดมาตรฐาน 1" x 1"
 - ใช้ปากคีบ (forceps) หนีบพับกระดาษกรองบรรจุลงในกระบอกฉีดยา (barrel) ทางด้านตรงข้ามกับปลายเข็มฉีดยา และประกอบแกนฉีดยา (plunger) เข้ากับกระบอกฉีดยาขนาด 3 มล.
 - ดูดสารละลาย 3% hydrogen peroxide เข้ามาในกระบอกฉีดยาเพื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด โดยให้ปลายแกนฉีดยาอยู่ที่ประมาณ 0.5 ml.
 - ใช้เข็มฉีดยาอุดปลายด้วยดินน้ำมัน (needle & oil-based clay) จากการศึกษาในขั้นตอนที่ผ่านมา โดยนำมาอุดที่ปลายด้านเข็มฉีดยาทันทีเพื่อป้องกันมิให้สารละลายหรือฟองอากาศรั่วไหลออกจากกระบอกฉีดยา เนื่องจากปฏิกิริยา Catalase เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วมาก
 - อ่านผลการตอบสนองของการทำงานของ Catalase ทุก 30 วินาที เป็นเวลา 240 วินาที (4 นาที)
 - คำนวณ Catalase activity (CA)

ผลการทดสอบ : จำนวนเซลล์ขึ้นต่ำ (visible response cells) กรณี syringe 1 มล.

- จำนวนเซลล์ขึ้นต่ำของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดต่อการทดสอบ Catalase ระยะเวลา 240 วินาที syringe ขนาด 1 มล. ให้ผลการตอบสนอง ดังตารางที่ 3.32

ตารางที่ 3.32 จำนวนเซลล์แบคทีเรียขั้นต่ำที่ให้การตอบสนองในรูป Catalase activity ระยะเวลา 240 วินาที syringe ขนาด 1 มล.

แบคทีเรีย	จำนวนเซลล์ <u>ขั้นต่ำ</u> ที่ให้ผลการตอบสนอง (visible response cells)		Catalase activity (CA)
	cells	log cells	percent (%)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2.35×10^{12}	12.35	9%
<i>Staphylococcus aureus</i>	5.38×10^{11}	11.73	9%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3.40×10^{11}	11.53	17%

- แบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดที่ผ่านการทดสอบ Catalase ในระยะเวลาการสังเกตผลการตอบสนองนาน 240 วินาที พบว่าให้ผล visible response cells ที่แตกต่างกัน กล่าวคือ ทั้ง *Staphylococcus aureus* และ *Klebsiella oxytoca* มี visible response cells ที่น้อยในระดับใกล้เคียงกัน ในช่วง 11.53-11.73 log cells ในขณะที่ *Pseudomonas fluorescens* กลับมี visible response cells ที่มากที่สุด ~12.35 log cells ซึ่งสูงกว่า *Staphylococcus aureus* และ *Klebsiella oxytoca* < 1 log (<10 เท่า) ดังนั้น แบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด จึงมีความไวต่อ Catalase test syringe ขนาด 1 มล. ในระดับที่ใกล้เคียงกัน (similar sensitivity)
- แบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดที่ผ่านการทดสอบ Catalase ในระยะเวลาการสังเกตผลการตอบสนองนาน 240 วินาที ให้น visible response cells เดียวกัน ให้ระดับการตอบสนอง (response) ในรูป Catalase activity ที่แตกต่างกัน กล่าวคือ *Klebsiella oxytoca* มี %CA ที่สูงกว่า (17%) ในขณะที่ *Pseudomonas fluorescens* และ *Staphylococcus aureus* มี %CA ที่ต่ำกว่า (9%)
- แม้จะดูเหมือนว่า จะมีความแตกต่างกันของ Catalase activity ระหว่าง 9% และ 17% อย่างไรก็ตาม Catalase activity ที่ 9% และ 17% คำนวณได้จากปริมาตรอากาศใน syringe เทียบเท่ากับ 0.01 มล. และ 0.02 มล. ตามลำดับ ดังนั้นจะเห็นได้ว่า ความแตกต่างดังกล่าว อาจจะไม่มีความสำคัญมากนักเมื่อนำไปใช้งานจริงในภาคสนาม

สรุปผลการทดสอบ : จำนวนเซลล์ขั้นต่ำ (visible response cells) กรณี syringe 1 มล.

- จำนวนเซลล์ขั้นต่ำในการตอบสนองของเซลล์แบคทีเรียต่อการทดสอบ Catalase test syringe ขนาด 1 มล. (visible response cells) อยู่ในช่วงระหว่าง 11.53-12.35 log cells ขึ้นอยู่กับชนิดแบคทีเรีย โดยสามารถเรียงลำดับความไวต่อการตอบสนอง (response sensitivity) จากมากไปน้อย คือ *Klebsiella oxytoca*, *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas fluorescens* ตามลำดับ

ผลการทดสอบ : ระยะเวลาการตอบสนอง (visible response time) กรณี syringe 1 มล.

- การตอบสนองของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดต่อการทดสอบ Catalase ทุก 30 วินาที เป็นเวลา 240 วินาที syringe ขนาด 1 มล. ให้ผลการตอบสนอง ดังตารางที่ 3.33-3.35

ตารางที่ 3.33 Catalase activity ของจำนวน *Pseudomonas fluorescens* สังเกตปฏิกิริยาทุก 30 วินาที syringe ขนาด 1 มล.

ระยะเวลาสังเกตการเกิดปฏิกิริยา (วินาที)	Log cells					
	13.26	12.95	12.65	12.35	12.05	11.75
30	50%	17%	0	0	0	0
60	64%	41%	0	0	0	0
90	71%	50%	9%	0	0	0
120	76%	57%	17%	0	0	0
150	80.0%	62%	23%	9%	0	0
180	80.4%	64%	29%	9%	0	0
210	80.4%	67%	33%	9%	0	0
240	80.8%	69%	38%	9%	0	0

ตารางที่ 3.34 Catalase activity ของจำนวน *Staphylococcus aureus* เวลาสังเกตปฏิกิริยาทุก 30 วินาที syringe ขนาด 1 มล.

ระยะเวลาสังเกตการเกิดปฏิกิริยา (วินาที)	Log cells					
	12.63	12.33	12.03	11.73	11.43	11.13
30	9%	0	0	0	0	0
60	23%	9%	9%	0	0	0
90	33%	17%	17%	0	0	0
120	41%	23%	17%	0	0	0
150	44%	33%	23%	9%	0	0
180	50%	38%	29%	9%	0	0
210	55%	41%	33%	9%	0	0
240	57%	44%	33%	9%	0	0

ตารางที่ 3.35 Catalase activity ของจำนวน *Klebsiella oxytoca* สังเกตปฏิกิริยาทุก 30 วินาที syringe ขนาด 1 มล.

ระยะเวลาสังเกตการเกิดปฏิกิริยา (วินาที)	Log cells					
	11.83	11.53	11.23	10.93	10.63	10.33
30	0	0	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0	0
90	9%	9%	0	0	0	0
120	17%	9%	0	0	0	0
150	23%	9%	0	0	0	0
180	23%	17%	0	0	0	0
210	29%	17%	0	0	0	0
240	33%	17%	0	0	0	0

- หากต้องการเปรียบเทียบระยะเวลาในการตอบสนองของแบคทีเรีย ดังนั้นจึงต้องพิจารณาเปรียบเทียบเวลาในการทดสอบจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่เท่ากันหรือใกล้เคียงกัน เงื่อนไขพื้นฐานคือ การใช้ *Klebsiella oxytoca* จากการศึกษา syringe ขนาด 3 มล. จากตารางที่ -1- พบว่า *Klebsiella oxytoca* ให้การตอบสนองด้วยจำนวนเซลล์ขั้นต่ำ ประมาณ 11.53 log cells ดังนั้น จะใช้จำนวนเซลล์นี้ในการเปรียบเทียบการตอบสนองกับ *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas fluorescens* ด้วย
- ระยะเวลาเริ่มต้นการตอบสนองของ *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* และ *Klebsiella oxytoca* ต่อ Catalase test ที่ประมาณ 11.53 log cells เท่ากับ >240, 150 และ 90 วินาที ตามลำดับ
- ผลการทดสอบนี้พบความสอดคล้องเพียงบางส่วนกับรายงานโดย Chester and Moskowitz (1987) กล่าวคือ
 - คุณสมบัติการตอบสนองของแบคทีเรียต่อ Catalase test มีความแตกต่างกัน
 - การตอบสนองของแบคทีเรียต่อ Catalase test แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ
 - กลุ่มตอบสนองทันที คือ *Pseudomonas fluorescens* แต่ผลการศึกษาพบว่า *Pseudomonas fluorescens* เป็นกลุ่มตอบสนองหน่วง
 - กลุ่มตอบสนองหน่วง คือ
 - *Staphylococcus aureus* และ
 - *Klebsiella oxytoca*

สรุปผลการทดสอบ : ระยะเวลาการตอบสนอง (visible response time) กรณี syringe 1 มล.

- เมื่อทดสอบ Catalase test กับแบคทีเรีย 3 ชนิดด้วยจำนวนเซลล์ที่เท่ากัน syringe ขนาด 1 มล. พบว่าระยะเวลาที่น้อยที่สุดที่ *Klebsiella oxytoca*, *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas fluorescens* ตอบสนอง คือ 90, 150 และ >240 วินาที ตามลำดับ
- ดังนั้น เพื่อให้การทดสอบ Catalase test syringe ขนาด 1 มล. สามารถครอบคลุมการตอบสนองของแบคทีเรียทั้งกลุ่มตอบสนองทันที และ กลุ่มตอบสนองหน่วง จะต้องใช้เวลาขั้นต่ำในการสังเกตปฏิกิริยา (visible response time) มากกว่า 240 วินาที (> 4 นาที)

3.4.2.5 การคัดเลือกขนาด syringe ในการสังเกตผลการตอบสนอง

(syringe size comparison)

นำผลการทดสอบของ Catalase test ขนาด 1 และ 3 มล. (ข้อ 1.2.3 และ ข้อ 1.2.4) มาเปรียบเทียบกัน เพื่อพิจารณาคัดเลือกขนาด syringe ที่มีความเหมาะสมในการนำไปใช้งานภาคสนาม

ผลการทดสอบ : เปรียบเทียบ syringe 1 และ 3 มล.

- จำนวนเซลล์ขั้นต่ำและระยะเวลาเริ่มต้นการตอบสนองของแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดต่อการทดสอบ Catalase ระยะเวลา 240 วินาที syringe ขนาด 1 และ 3 มล. ให้ผลการตอบสนอง ดังตารางที่ 3.36

ตารางที่ 3.36 จำนวนเซลล์ขั้นต่ำและระยะเวลาเริ่มต้นการตอบสนองของแบคทีเรีย 4 ชนิดต่อ Catalase test syringe ขนาด 1 และ 3 มล.

แบคทีเรีย	visible response cells		visible response time	
	(log cells)		(sec)	
	ขนาด 1 มล.	ขนาด 3 มล.	ขนาด 1 มล.	ขนาด 3 มล.
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	12.35	N/A*	150	N/A
<i>Serratia marcescens</i>	N/A	9.8	N/A	210
<i>Staphylococcus aureus</i>	11.73	11.1	150	60
<i>Klebsiella oxytoca</i>	11.53	11.2	90	150

* N/A : Not applicable ไม่ได้ทดสอบ

- จำนวนเซลล์ขั้นต่ำของ *Staphylococcus aureus* ให้การตอบสนองต่อ Catalase test ขนาด 1 และ 3 มล. เท่ากับ 11.73 และ 11.1 log cells ตามลำดับ ในลักษณะเดียวกันกับ จำนวนเซลล์ขั้นต่ำของ *Klebsiella oxytoca* ให้การตอบสนองต่อ Catalase test ขนาด 1 และ 3 มล. เท่ากับ 11.53 และ 11.2 log cells ตามลำดับ ดังนั้น Catalase test ขนาด 3 มล. มีความไวต่อการตอบสนองมากกว่า Catalase test ขนาด 1 มล.
- ถึงแม้ว่า Catalase test ขนาด 1 มล. จะสามารถสังเกตการตอบสนองได้ละเอียดกว่า (มาตราส่วนมีความละเอียดกว่า) แต่ Catalase test ขนาด 1 มล. กลับมีความไวในการตอบสนองของทั้ง *Staphylococcus aureus* และ *Klebsiella oxytoca* น้อยกว่า Catalase ขนาด 3 มล.
- ระยะเวลาเริ่มต้นการตอบสนองของแบคทีเรียต่อ Catalase test ในรูปของ Catalase activity โดยใช้ syringe ขนาด 1 และ 3 มล. ต่ำที่สุดเท่ากับ 90 และ 30 วินาที ดังนั้น Catalase test ขนาด 3 มล. มีแนวโน้มจะสิ้นสุดปฏิกิริยาเร็วกว่าและระยะเวลาโดยรวมในการทดสอบด้วย Catalase test ขนาด 3 มล. สั้นกว่า

- ข้อสังเกตของระยะเวลาเริ่มต้นการตอบสนองของแบคทีเรีย คือ
 - *Klebsiella oxytoca* ให้ผลการตอบสนองช้าที่สุดใน Catalase test ขนาด 3 มล. (150 วินาที) แต่กลับให้ผลการตอบสนองเร็วที่สุดใน Catalase test ขนาด 1 มล. (90 วินาที) โดยระยะเวลาเริ่มต้นการตอบสนองแตกต่างกัน 60 วินาที
 - *Staphylococcus aureus* ให้ผลการตอบสนองอยู่ระหว่างกลางทั้ง Catalase test ขนาด 3 มล. (60 วินาที) และ ขนาด 1 มล. (150 วินาที) แต่ระยะเวลาเริ่มต้นการตอบสนองแตกต่างกัน 90 วินาที

สรุปผลการทดสอบ : เปรียบเทียบ syringe 1 และ 3 มล.

- Catalase test ขนาด 3 มล. มีความไวในการตอบสนองมากกว่า (higher sensitivity) Catalase test ขนาด 1 มล.
- Catalase test ขนาด 3 มล. มีระยะเวลาเริ่มต้นการตอบสนองเร็วกว่า (faster reaction) Catalase test ขนาด 1 มล.
- Catalase test syringe ขนาด 3 มล. จึงมีความเหมาะสมมากกว่า Catalase test syringe ขนาด 1 มล.

3.4.2.6 การศึกษาการทำลาย Catalase จำเพาะ

(specific Catalase inactivation)

เนื่องจาก เซลล์สิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่ที่มีระบบการสร้างพลังงานโดยการหายใจแบบใช้ออกซิเจน (aerobic respiration) จะอาศัยระบบ electron transport system ในการรับ-ส่ง electron ก่อให้เกิดพลังงานขึ้นมา ซึ่งออกซิเจน (O_2) จะทำหน้าที่รับ electron เป็นโมเลกุลสุดท้าย (final electron acceptor) แปรสภาพจากโมเลกุลออกซิเจนปกติที่ไม่เป็นพิษกลายเป็นโมเลกุลออกซิเจนที่เป็นพิษ (superoxide radical) ดังนั้นเซลล์สิ่งมีชีวิตจึงต้องมีระบบการกำจัดออกซิเจนในรูปสารพิษนี้ผ่านกลุ่มเอนไซม์หลายชนิด เช่น superoxide dismutase, peroxidase และ Catalase เป็นต้น

กล้ามเนื้อ (muscle) หรือ เนื้อสัตว์ (meat) ประกอบด้วย เส้นใยกล้ามเนื้อ (muscle fiber) เป็นเซลล์รูปร่างทรงกระบอกยาวซึ่งมีการสร้างพลังงานผ่านการหายใจแบบใช้ออกซิเจน ดังนั้น จึงสามารถตรวจพบ Catalase ได้ในเนื้อสัตว์หรือเนื้อสุกรปกติทั่วไป หมายความว่า แม้เนื้อสุกรที่สะอาด (asepsis) ปราศจากการปนเปื้อนของแบคทีเรีย (no Bacterial contamination) เมื่อนำมาทดสอบด้วยชุดทดสอบ Catalase test ก็ยังสามารถให้ค่า Catalase activity ได้ ดังนั้น ค่า Catalase activity ที่ได้จากการทดสอบเนื้อสุกรจริง จึงเป็นค่า Catalase activity รวมของ Catalase จากเนื้อสุกร (pork catalase) บวกกับ Catalase จากแบคทีเรีย (Bacterial catalase) ถ้าเนื้อสุกรมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์

เพื่อให้ชุดทดสอบ Catalase test สามารถวัดระดับหรือทดสอบ Catalase ที่แท้จริงของแบคทีเรีย (Bacterial catalase) ที่ปนเปื้อนในเนื้อสุกร โดยปราศจาก Catalase จากเนื้อสุกร (pork catalase) ที่เป็นค่าพื้นฐาน (background Catalase) จึงอาจจะต้องมีเทคนิคพิเศษเพิ่มเติม ที่สามารถกำจัดหรือทำลายเฉพาะ (specific inactivation) pork catalase ในเนื้อสุกร แต่ยังคงรักษา Bacterial catalase ไว้ ก่อนจะใช้ชุดทดสอบ Catalase test

การทำลาย Catalase สามารถแบ่งได้ 2 กลุ่ม (ภาพที่ 3.59) คือ

1. การทำลายโดยวิธีกายภาพ (Physical inactivation)

1.1 รังสี ยู.วี. (UV radiation inactivation)^{23,24} เป็นรังสีชนิด UVA

1.2 ความร้อน (thermal inactivation)^{25,26} ณ อุณหภูมิประมาณ 65-70°C

²³ Aminuddin, Farzian, et al. "Effect of Ultraviolet-A Radiation on Water Disinfection and the Activity of Catalase and Superoxide Dismutase in *Escherichia coli* B23." *Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI)* Vol 12 (2004): 57-61.

²⁴ Morgulis, Sergius. "Studies on the inactivation of Catalase II. Inactivation by ultra-violet radiation at different hydrogen ion concentrations." *Journal of Biological Chemistry* 86.1 (1930): 75-85.

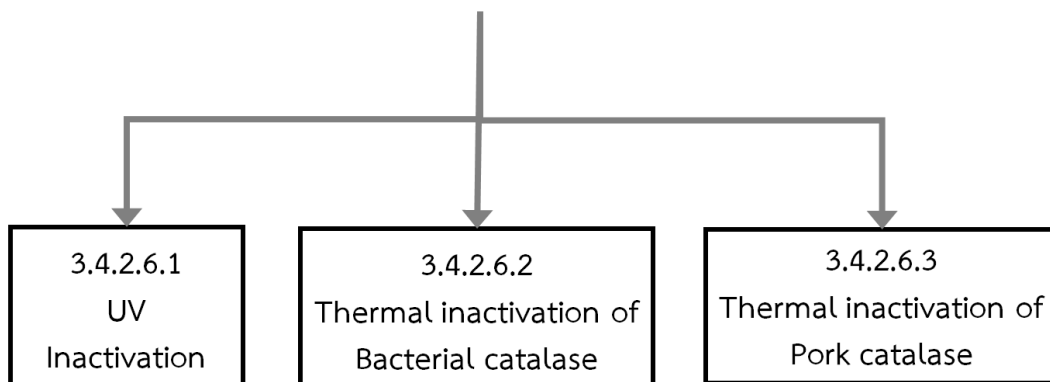
²⁵ Morgulis, Sergius, and M. Beber. "Studies on the effect of temperature on the Catalase reaction VI. Heat inactivation of Catalase at different hydrogen ion concentrations." *Journal of Biological Chemistry* 77.1 (1928): 115-126.

²⁶ Morgulis, Sergius, M. Beber and I.Rabkin. "Studies on the effect of temperature on the Catalase reaction II. Lose of Catalase acitivity" *Journal of Biological Chemistry* 68 (1926) : 535-545.

2. การทำลายโดยวิธีเคมี (Chemical inactivation)

2.1 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide)²⁷ เป็นสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาปฏิกิริยา Catalase ในการศึกษาครั้งนี้แล้ว ดังนั้น จึงไม่สามารถใช้ในการทำลาย pork catalase ได้

3.4.2.6 Specific catalase inactivation



ภาพที่ 3.59 การทำลาย Catalase จำเพาะ

²⁷ Morgulis, Sergius. "Studies on the inactivation of Catalase III. Destruction of Catalase by hydrogen peroxide." *Journal of Biological Chemistry* 92.2 (1931): 377-383.

3.4.2.6.1 การทำลาย Catalase ด้วยรังสี ยู.วี.

(UV radiation inactivation of Catalase)

Morgulis, Sergius (1930) รายงานการทำลาย Catalase โดยใช้ UVA ความยาวคลื่น ระหว่าง 30-400 nanometers ช่วง pH ระหว่าง 7-11 ภายในระยะเวลาตั้งแต่ 5-60 นาที

วิธีการทดสอบ

- เตรียมหลอดฉีดยาพลาสติกใช้ครั้งเดียวทิ้ง ขนาด 3 มล.
- เตรียมกระดาษกรอง WhatmanTM No.1 รูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสให้มีขนาดมาตรฐาน 1" x 1"
- คัดเลือกแบคทีเรียในการศึกษาที่ให้การตอบสนองต่อ Catalase test คือ กลุ่มตอบสนองหนอง คือ *Staphylococcus aureus*
- เพาะบ่ม (subculture) แบคทีเรีย ใน Brain Heart Infusion (BHI) ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง
- หยดสารละลายแบคทีเรียปริมาตร 100 ul ลงบนกระดาษกรองที่เตรียมไว้
- นำกระดาษกรองที่ชุ่มด้วยสารละลายแบคทีเรียส่องด้วย รังสี UVA (black light) นาน 5 และ 10 นาที
- ทดสอบและคำนวณ Catalase activity

ผลการทดสอบ

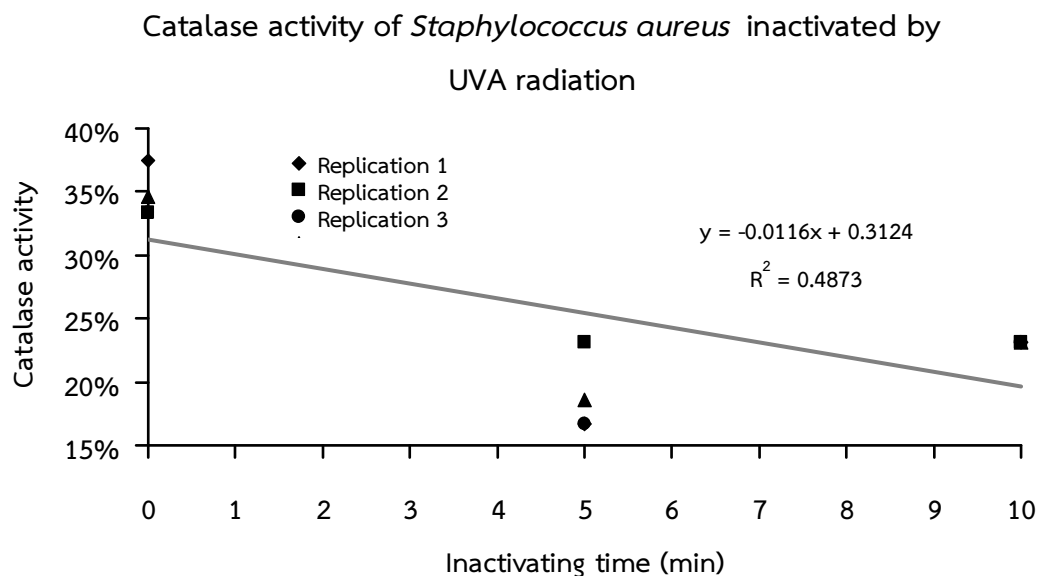
- การตอบสนองของ *Staphylococcus aureus* ต่อการทดสอบ Catalase หลังผ่านรังสี UVA นาน 5 และ 10 นาที syringe ขนาด 3 มล. ให้ผลการตอบสนอง ดังตารางที่ 3.37

ตารางที่ 3.37 ค่า Catalase activity ของ *Staphylococcus aureus* หลังผ่านรังสี UVA

UVA Inactivating time (min)	Replication			Geometric mean
	1	2	3	
0	38%	33%	33%	34.7%
5	17%	23%	17%	18.6%
10	23%	23%	23%	23.1%

- เมื่อพิจารณาจาก ค่าเริ่มต้น Catalase activity = 34.7% และเมื่อผ่านรังสี UVA นาน 5 นาที ค่า CA ลดลงเหลือ 18.6% ก่อน CA จะเพิ่มขึ้นเป็น 23.1% เมื่อเวลาผ่านรังสี UVA นาน 10 นาที

- แม้ว่า ค่า Catalase activity จะมีการลดลงในช่วงแรกและเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงสุดท้าย อย่างไรก็ตาม เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี regression พบว่า แนวโน้มของ %CA มีการลดลงตามลำดับ ($r = 0.698$) ดังภาพที่ 3.60
- รังสี UVA สามารถทำลาย Bacterial catalase ของ *Staphylococcus aureus* ได้
- นอกจากนี้ ข้อจำกัดโดยทั่วไป อีกอย่างหนึ่งของรังสี UV คือ รังสีไม่สามารถทะลุผ่านวัตถุที่ทึบแสงได้ ดังนั้น การประยุกต์ใช้งานต่อไปของรังสี UV กับเนื้อสุกรจึงมีโอกาสน้อยด้วย



ภาพที่ 3.60 ค่า Catalase activity ของ *Staphylococcus aureus* หลังผ่านรังสี UVA

สรุปผลการทดสอบ

- เนื่องจาก การรังสี UVA สามารถทำลาย Bacterial catalase ได้ด้วย ดังนั้น เทคนิคการใช้รังสี UVA จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในชุดทดสอบ Catalase ได้

3.4.2.6.2 การทำลาย Bacterial catalase ด้วยความร้อน

(thermal inactivation of Bacterial catalase)

แม้ว่า Catalase จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาได้ดีขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูง (เช่น ระดับใกล้เคียงอุณหภูมิร่างกาย เป็นต้น) อย่างไรก็ตาม กลไกการทำลาย Catalase ด้วยความร้อน เกิดขึ้นเนื่องจาก Catalase เป็นเอนไซม์ ซึ่งมีองค์ประกอบพื้นฐานเป็นโปรตีน (protein) ดังนั้น พลังงานในรูปของความร้อนจะทำให้โครงสร้างโปรตีน (protein conformation) เกิดการเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งเมื่อได้พลังงานความร้อนในปริมาณมากเกินไป (เช่น อุณหภูมิสูงกว่า 65°C) จะส่งผลให้โครงสร้างโปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างมากและไม่สามารถคืนกลับสู่โครงสร้างเอนไซม์ก่อนได้รับความร้อนได้ (irreversible) เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า การเสียสภาพของโปรตีน (protein denaturation) จนทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาเคมีได้

เนื่องจาก โปรตีนหรือเอนไซม์ชนิดเดียวกัน อาจจะมีโครงสร้างบางส่วนที่แตกต่างกัน ดังนั้น ความทนทานต่อความร้อนจึงมีความแตกต่างกันด้วย เช่น กรณีของ bovine Catalase มีความทนทานมากกว่า Bacterial catalase เมื่อผ่านความร้อนที่ 65°C นาน 2 นาที²⁸

วิธีการทดสอบ

- เตรียมหลอดฉีดยาพลาสติกใช้ครั้งเดียวทิ้ง ขนาด 3 มล.
- เตรียมกระดาษกรอง WhatmanTM No.1 รูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสให้มีขนาดมาตรฐาน 1" x 1"
- คัดเลือกแบคทีเรียในการศึกษาที่ให้การตอบสนองต่อ Catalase test คือ
 - กลุ่มตอบสนองทันที คือ *Serratia marcescens*
 - กลุ่มตอบสนองหน่วง คือ
 - *Staphylococcus aureus* และ
 - *Klebsiella oxytoca*
- เพาะบ่ม (subculture) แบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ใน Brain Heart Infusion (BHI) ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง ได้สารละลายแบคทีเรีย
- ให้ความร้อนสารละลายแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดในหลอดแก้วที่แช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 60°C, 65°C และ 70°C นาน 2 และ 10 นาที
- หยดสารละลายแบคทีเรียปริมาตร 100 ul ลงบนกระดาษกรองที่เตรียมไว้
- ทดสอบและคำนวณ Catalase activity

ผลการทดสอบ

²⁸ Fung, D. 2013 Rapid methods for measurement and enumeration of microbial contamination In "Quality attributes and their measurement in meat, poultry and fish products" editor : Pearson, Albert Marchant. Vol. 9. Springer, 2013.

- การตอบสนองของ *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* และ *Klebsiella oxytoca* ต่อการทดสอบ Catalase หลังผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 60°C, 65°C และ 70°C นาน 2 และ 10 นาที syringe ขนาด 3 มล. ให้ผลการตอบสนอง ดังตารางที่ 20 และภาพที่ 3.61-3.63
- ค่า Catalase activity ของ *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* และ *Klebsiella oxytoca* ที่อุณหภูมิ 60°C, 65°C และ 70°C มีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาการผ่านความร้อนที่นานมากขึ้น (ตารางที่ 3.38)

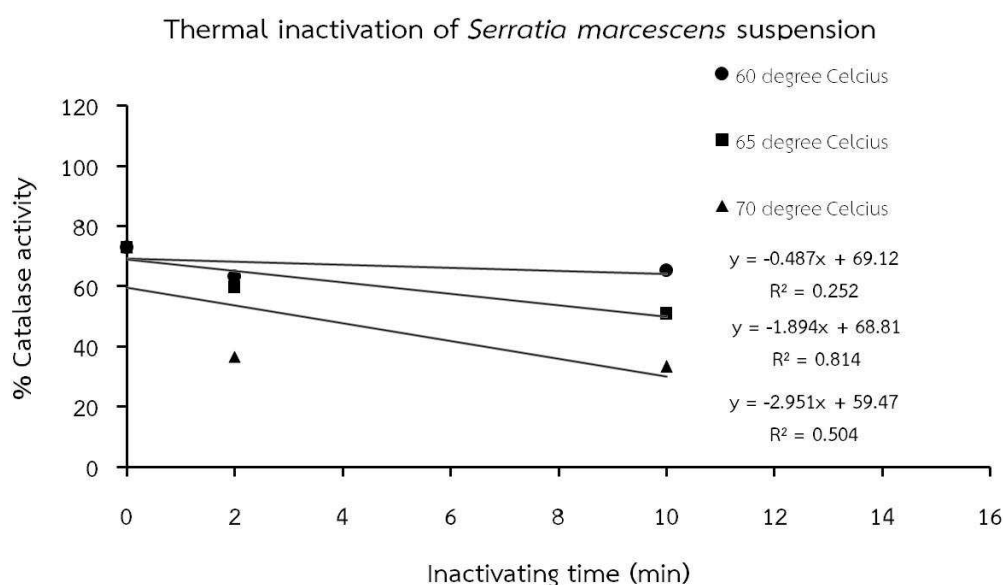
ตารางที่ 3.38 ค่า Catalase activity ของแบคทีเรียหลังผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 60°C, 65°C และ 70°C

แบคทีเรีย	ระยะเวลา (นาที)	อุณหภูมิ (°C)		
		60	65	70
<i>Serratia marcescens</i>	0	73.0	73.0	73.0
	2	63.3	59.8	36.7
	10	65.2	50.9	33.3
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	8.3	8.3	8.3
	2	2.6	5.8	7.1
	10	3.1	6.9	1.5
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	2.5	2.5	2.5
	2	1.6	7.7	2.8
	10	0.2	1.6	2.5

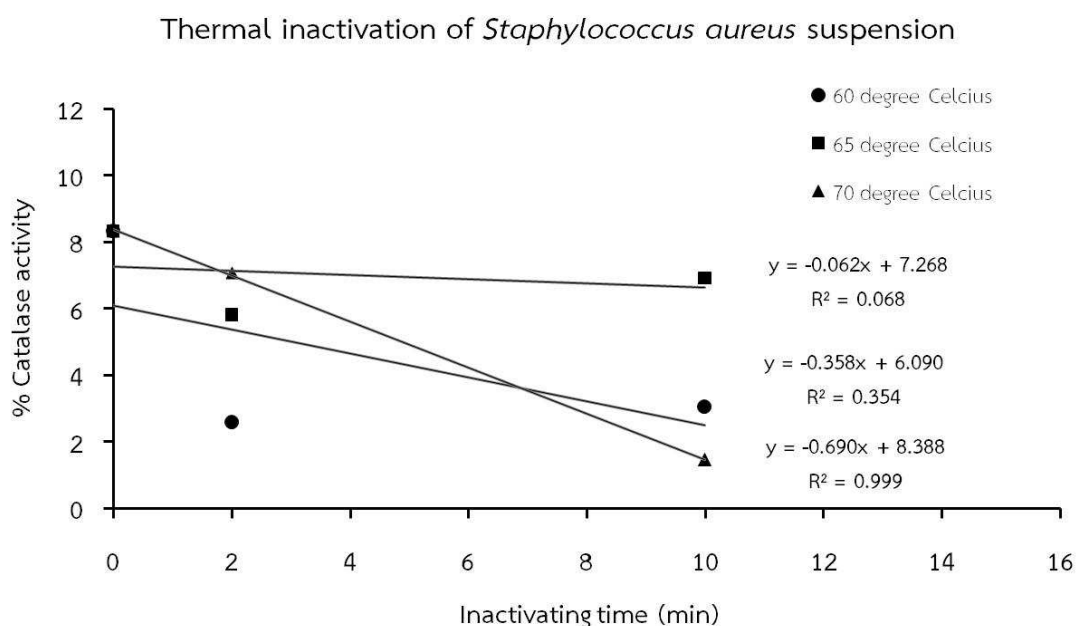
- ค่า Catalase activity เริ่มต้นของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ไม่มีผลต่อการทดสอบ เนื่องจากผลของความร้อนต่อการลดลงของค่า Catalase activity นั้น ประเมินจากอัตราการลดลงของค่า Catalase activity ต่อหนึ่งหน่วยเวลา หรือ ความชัน (slope) ของสมการเส้นตรง (linear regression) กล่าวคือ ความชันของสมการเส้นตรงทำหน้าที่เป็นดัชนีวัดอัตราการเปลี่ยนแปลงค่า Catalase activity โดยค่าความชันมาก ก็จะมีอัตราการเปลี่ยนแปลงค่า Catalase activity มาก ด้วย อย่างไรก็ตาม เนื่องจาก การเปลี่ยนแปลงของค่า Catalase activity เป็นลักษณะลดลง ดังนั้น ความชันสมการจึงมีค่าเป็นลบ (negative) สรุปโดยรวม คือ ความชันสมการมีค่าลบมากกว่า ก็จะมีอัตราการลดลงของค่า Catalase activity มากกว่า
- ตัวอย่างเช่น (ภาพที่ 3.62) ความชันของอัตราการทำลาย Bacterial catalase ของสารละลาย *Serratia marcescens* ที่อุณหภูมิ 65°C และ 70°C เท่ากับ -1.8 และ -2.9 ตามลำดับ แสดงว่า

ค่า Catalase activity ของ *Serratia marcescens* ถูกทำลายที่อุณหภูมิ 65°C ได้น้อยกว่าหรือมีประสิทธิภาพน้อยกว่าที่อุณหภูมิ 65°C

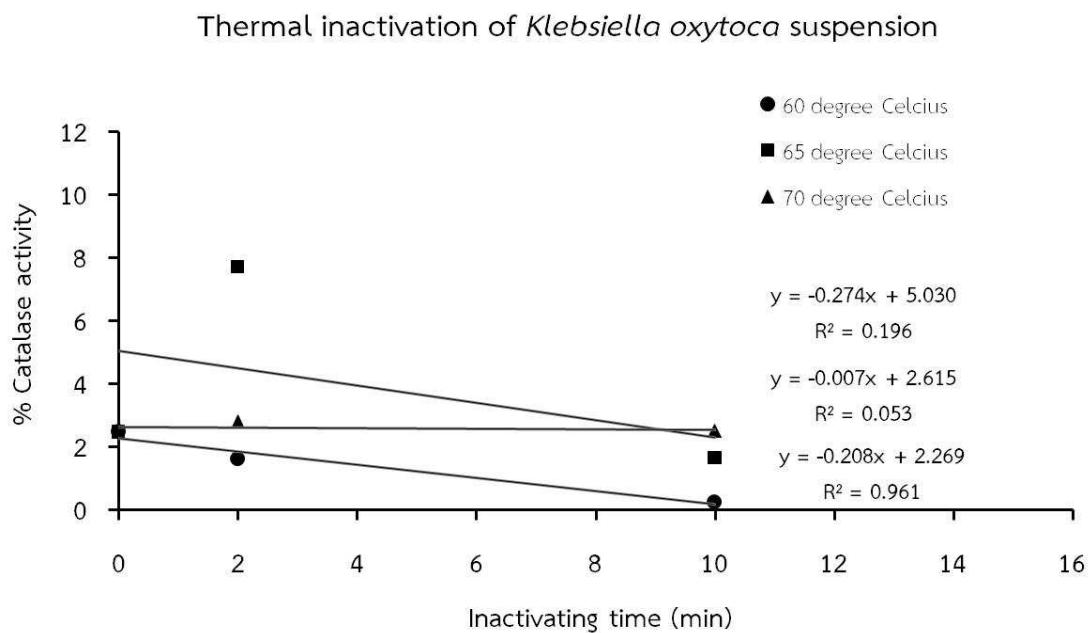
- อย่างไรก็ตาม ผลการทดสอบอัตราการทำลาย Bacterial catalase ของ *Staphylococcus aureus* และ *Klebsiella oxytoca* อาจจะไม่สอดคล้องกับหลักการทางทฤษฎี เนื่องจาก เป็นการทดสอบนำร่อง (preliminary test) เพื่อทดสอบการเปลี่ยนแปลงของ Bacterial catalase ที่เกิดจากความร้อนเท่านั้น ดังนั้นหากต้องการทราบผลการทดสอบที่ชัดเจนมากขึ้น อาจจะต้องเพิ่มจำนวนซ้ำ (replication) ของการทดสอบ



ภาพที่ 3.61 ค่า Catalase activity ของ *Serratia marcescens* หลังผ่านความร้อน



ภาพที่ 3.62 ค่า Catalase activity ของ *Staphylococcus aureus* หลังผ่านความร้อน



ภาพที่ 3.63 ค่า Catalase activity ของ *Klebsiella oxytoca* หลังผ่านความร้อน

สรุปผลการทดสอบ

- ความร้อนที่อุณหภูมิ 60°C, 65°C และ 70°C สามารถทำลาย Bacterial catalase ของ *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* และ *Klebsiella oxytoca* ได้ด้วยอัตราการทำลาย (inactivation rate) ที่แตกต่างกัน
- อย่างไรก็ตาม ข้อสรุปเบื้องต้นของอัตราการลดลงของ Bacterial catalase อาจจะยังมีความเป็นไปได้ในการพัฒนาต่อเพื่อนำไปใช้ในภาคสนาม โดยมีเงื่อนไขว่า pork catalase ควรจะต้องมีอัตราการลดลงมากกว่า Bacterial catalase จึงจะทำให้เทคนิคการใช้ความร้อนสามารถนำมาใช้ในชุดทดสอบ Catalase ได้

3.4.2.6.3 การทำลาย Pork catalase ด้วยความร้อน

(thermal inactivation of Pork catalase)

แม้ว่า Bacterial catalase จากการทดสอบที่ผ่านมาจะถูกทำลายด้วยความร้อน หากแต่ว่าความร้อนทำให้ pork catalase ถูกทำลายมากกว่า Bacterial catalase ก็อาจจะสามารถพัฒนาต่อเพื่อนำไปใช้ในภาคสนามได้

วิธีการทดสอบ

- หั่นเนื้อหมูโดยใช้ aseptic technique ให้ได้เนื้อชิ้นขนาดเล็กๆ บรรจุใน plastic bag
- เติมสารละลาย saline (น้ำเกลือ) ลงในถุงให้เนื้อสุกมีลักษณะชุ่มน้ำพอสมควร
- นวดเนื้อสุกกับสารละลายน้ำเกลือเพื่อคั้นแยกให้ได้น้ำเนื้อ (meat juice) ภาพที่ 3.64



ภาพที่ 3.64 น้ำเนื้อ (meat juice) ที่คั้นจากเนื้อสุกด้วยน้ำเกลือเพื่อทดสอบ Catalase activity

- ให้ความร้อนกับน้ำเนื้อ (meat juice) ในหลอดแก้วที่แช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 60°C, 65°C และ 70°C นาน 2 และ 10 นาที
- ทดสอบ %CA โดยใช้ Pasteur pipette ที่อุดปลาย โดยใช้ 3% H_2O_2 สัดส่วน = 30:30 ul
- อ่านผลการตอบสนองของ pork catalase ที่ 5 นาที
- คำนวณ Catalase activity

ผลการทดสอบ

- การทดสอบไม่สามารถดำเนินการได้จนเสร็จสิ้น เนื่องจาก เมื่อ meat juice ซึ่งมีโปรตีนเป็นส่วนประกอบในสัดส่วนที่สูง เมื่อได้รับความร้อนจึงเกิดการเสียสภาพ (denaturation) เกิดการจับตัวกันแน่น (curd หรือ clot) ดังภาพที่ 3.65



ภาพที่ 3.65 การจับตัวกันแน่น (clot) ของน้ำเนื้อ (meat juice) หลังผ่านความร้อน

สรุปผลการทดสอบ

- เนื่องจาก ความร้อนที่อุณหภูมิ 60°C, 65°C และ 70°C สามารถทำลาย Bacterial catalase ของ *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* และ *Klebsiella oxytoca* ได้
- ในขณะเดียวกัน ความร้อนยังทำให้ meat juice ในการทดสอบ pork catalase เกิด clot ขึ้นมาก ทำให้ไม่สามารถทดสอบ Catalase activity
- ดังนั้น เทคนิคการใช้ความร้อนในการทำลายเฉพาะ pork catalase จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในชุดทดสอบ Catalase ได้

3.4.2.7 การศึกษาพิสัยปกติของ pork catalase

(normal range of pork catalase)

เนื่องจาก ข้อจำกัดเรื่องค่า Catalase activity ของชุดทดสอบที่เป็นผลรวม (total) ของทั้ง pork catalase และ Bacterial catalase ซึ่งอาจจะทำให้การประเมินระดับการปนเปื้อนแบคทีเรียมีค่าสูงเกินจริง กอปรกับข้อจำกัดของเทคนิคการทำลาย pork catalase ที่ไม่สามารถปฏิบัติได้จริง (จากผลการทดสอบที่ผ่านมาด้วยรังสี UVA และ ความร้อน) ดังนั้น จึงมีการใช้แนวคิดการวัดค่า Catalase activity รวมของ total catalase แล้วหักด้วยค่า Catalase activity เฉพาะของ pork catalase เพื่อให้ได้ค่า Catalase activity เฉพาะของ Bacterial catalase ดังสมการ (3.6)

$$\text{Bacterial catalase} = \text{Total catalase} - \text{Pork catalase} \quad (3.6)$$

โดยคาดว่า pork catalase ของเนื้อสุกร (โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เนื้อสันนอกที่เก็บตัวอย่างตามปกติ) จะมีความไม่แน่นอน (uncertainty) ที่ไม่กว้างมากเกินไป ดังนั้น จึงศึกษาพิสัยปกติของ pork catalase ที่ดูดซับได้บนกระดาษกรอง WhatmanTM No.1 ขนาดมาตรฐาน 1" x 1"

การคำนวณ Bacterial catalase โดยการหัก pork catalase ออกจาก total catalase ตามแนวคิดดังสมการข้างต้น สามารถคำนวณหาค่าปกติของ pork catalase ตามหลักการคณิตศาสตร์ได้ 2 ฐาน คือ

1. พิสัยปกติฐาน % Catalase activity (CA-based normal range)

วิธีนี้จะเป็นการคำนวณโดยใช้ %CA เป็นฐาน กล่าวคือ การคำนวณค่าของทั้ง total catalase และ pork catalase ในรูปของ %CA ก่อน แล้วจึงนำ %CA ของ pork catalase ไปหักออกจาก %CA ของ total catalase ก็จะได้ %CA ของ Bacterial catalase ดังสมการ (3.7)

$$\%CA \text{ of Bacterial catalase} = \%CA \text{ of Total catalase} - \%CA \text{ of Pork catalase} \quad (3.7)$$

ข้อจำกัดของ ฐาน %CA คือ ถึงแม้ว่าปริมาตร Gas จาก pork catalase จะคงที่ (ตามสมมุติฐานความคิดของนักวิจัย) แต่ %CA ของ pork catalase ที่คำนวณได้จากการนำไปใช้จริงในภาคสนาม ก็จะมีค่าที่ผันแปรตลอดเวลา เนื่องจาก ปริมาตร Gas ที่วัดได้จากชุดทดสอบจริงจะมีปริมาตร Gas จาก Bacterial catalase ปนอยู่ด้วยเสมอ ดังนั้น เมื่อ ปริมาตร Gas รวม (จาก pork + bacteria) ในการคำนวณมีค่าผันแปรตลอดเวลาขึ้นอยู่กับระดับการปนเปื้อน bacteria ในเนื้อสุกร

ดังนั้น ในทางปฏิบัติจริง จึงไม่สามารถใช้แนวคิดค่าปกติของ pork catalase ในรูปของ %CA ได้ หรือกล่าวได้อีกอย่างหนึ่งว่า ไม่สามารถรายงานพิสัยปกติของ pork catalase ในรูปของ %CA ได้ เนื่องจาก %CA ของ pork catalase จะผันแปรตามระดับการปนเปื้อน bacteria ในเนื้อสุกร

2. พิสัยปกติฐาน Gas volume (Gas volume-based normal range)

วิธีนี้จะเป็นการคำนวณโดยใช้ปริมาตร Gas เป็นฐาน กล่าวคือ การนำปริมาตร Gas ของเนื้อสุกรที่เกิดจาก pork catalase นำไปหักออกจากปริมาตร Gas รวมจาก total catalase (จาก pork + bacteria)

ก็จะได้ ปริมาตร Gas ที่เกิดจาก Bacterial catalase จากนั้นจึงนำผลต่างของปริมาตร Gas ที่ได้นี้ไปคำนวณเป็น %CA ของ Bacterial catalase ดังสมการ (3.8)

$$\%Catalase\ Activity\ of\ Bacterial\ catalase = \frac{(Total\ Catalase\ Gas - Pork\ Catalase\ Gas)}{Total\ Catalase\ Gas + reagent} \times 100 \quad (3.8)$$

ซึ่งสามารถเทียบเคียงสมการนี้ได้กับสมการคำนวณ % Catalase activity

$$\% Catalase\ Activity = \frac{A}{B} \times 100 \quad (3.9)$$

โดยที่

A คือ ปริมาตร Gas ของ Bacterial catalase (total catalase gas – pork catalase gas)

B คือ ปริมาตร Gas รวมและสารเคมีในการทดสอบ (total catalase gas + reagent)

วิธีการคำนวณโดยฐานปริมาตร Gas มีความสอดคล้องกับแนวคิดวิธีการทดสอบหาพิษภัยปกติของ pork catalase ที่จะนำไปใช้ในภาคสนามได้ เนื่องจาก ปริมาตร Gas ที่ผลิตจาก pork catalase สามารถนำไปใช้หักจากปริมาตร Gas รวมจาก total catalase (จาก pork + bacteria) เป็นอิสระจากปริมาตร Gas ที่ผลิตจาก Bacterial catalase ดังนั้น ปริมาตร Gas จาก pork catalase ที่จะนำไปใช้ในการคำนวณ %CA จึงไม่ค่าผันแปรตามระดับการปนเปื้อน bacteria ในเนื้อสุกร

ดังนั้น ในทางปฏิบัติจริง จึงสามารถใช้แนวคิดค่าปกติของ pork catalase ในรูปของปริมาตร Gas ได้ หรือกล่าวได้อีกอย่างหนึ่งว่า สามารถรายงานพิษภัยปกติของ pork catalase ในรูปของปริมาตร Gas ได้ เนื่องจาก ปริมาตร Gas ของ pork catalase จะไม่ผันแปรตามระดับการปนเปื้อน bacteria ในเนื้อสุกร

ก. การเปรียบเทียบ pork catalase แล่ตัดแบบ cross-section และ long-section ของเนื้อสุกร
(comparing pork catalase from cross vs. long section pork)

วิธีการทดสอบ

- เตรียมหลอดฉีดยาพลาสติกใช้ครั้งเดียวทิ้ง ขนาด 3 มล.
- เตรียมกระดาษกรอง WhatmanTM No.1 รูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสให้มีขนาดมาตรฐาน 1" x 1"
- แล่ตัดเนื้อสุกรในส่วนเนื้อสันนอก ด้วยวิธี aseptic technique เพื่อป้องกันมิให้มีการปนเปื้อน จุลินทรีย์ที่ผิวหนังหน้าตัดของชิ้นเนื้อสุกร
- แล่ตัดเนื้อสุกร 2 แนว (direction) คือ
 - ตัดขวางเส้นใยกล้ามเนื้อ (cross section)
 - ตัดขนานเส้นใยกล้ามเนื้อ (long section)
- ใช้กระดาษกรองทาบที่ผิวหนังหน้าตัดของเนื้อสุกรเฉพาะด้านหน้าตัดใหม่ เพื่อลดการปนเปื้อนของ Bacterial catalase
- หยด sterile saline ปริมาตร 100 ul บนกระดาษกรอง เพื่อดูดซับ pork catalase ขึ้นมาบนกระดาษกรอง
- ทดสอบและวัดปริมาตร gas ใช้ syringe ขนาด 3 มล. 6 ซ้ำ (replication) และอ่านผลการตอบสนองระยะเวลา 60 และ 120 วินาที ตามลำดับ

ผลการทดสอบ : เปรียบเทียบ CA ของ cross-section และ long-section ของเนื้อสุกร

- ผลการตอบสนองของ pork catalase ในรูปของ Gas ที่ผลิตได้จาก Catalase activity ดังแสดงในตารางที่ 3.39

ตารางที่ 3.39 ปริมาตร Gas (มล.) pork catalase ในเนื้อสุกรที่ตัดแล้ว 2 แนว

Replication	ระยะเวลาตอบสนอง 60 วินาที		ระยะเวลาตอบสนอง 120 วินาที	
	ตัดขวาง	ตัดขนาน	ตัดขวาง	ตัดขนาน
1	0.05	0.10	0.10	0.15
2	0.10	0.10	0.20	0.20
3	0.20	0.35	0.35	0.60
4	0.10	0.25	0.20	0.45
5	0.50	0.45	0.75	0.70
6	0.20	0.45	0.30	0.80
Average	0.147*	0.237*	0.261**	0.407**

* ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} = 0.1742$)

** ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} = 0.1360$)

- ค่าเฉลี่ยปริมาตร gas ของ pork catalase ที่วัดได้ใน 60 วินาที น้อยกว่า ที่วัดได้ 120 วินาที สอดคล้องกันทั้ง 2 แนวการแล่ตัดเนื้อสุกร
- ค่าเฉลี่ยปริมาตร gas ของ pork catalase ที่วัดได้จากแนวตัดขวางเส้นใยกล้ามเนื้อไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ ค่าเฉลี่ยปริมาตร gas ของ pork catalase ที่วัดได้จากแนวตัดขนานเส้นใยกล้ามเนื้อ ทั้งที่ระยะเวลา 60 วินาที ($p\text{-value} = 0.1742$) และ 120 วินาที ($p\text{-value} = 0.1360$)

สรุปผลการทดสอบ : เปรียบเทียบ CA ของ cross-section และ long-section ของเนื้อสุกร

- ค่า pork catalase ที่ได้จากการแล่ตัดเนื้อสุกรแนวขวางและแนวยาวไม่แตกต่างกัน หรือ
- วิธีการแล่ตัดเนื้อสุกรไม่ได้มีผลต่อค่า pork catalase

ข. ค่าพิสัยปกติของ pork catalase
(normal range)

วิธีการทดสอบ

- เตรียมหลอดฉีดยาพลาสติกใช้ครั้งเดียวทิ้ง ขนาด 3 มล.
- เตรียมกระดาษกรอง WhatmanTM No.1 รูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสให้มีขนาดมาตรฐาน 1" x 1"
- แล่ตัดเนื้อสุกรส่วนเนื้อสันนอกด้วยวิธี aseptic technique เพื่อให้ปลอดจากการปนเปื้อนของ จุลินทรีย์ (Bacterial contamination) ที่ผิวหนังตัดชิ้นเนื้อสุกร (pork surface)
- ใช้กระดาษกรองทาบที่ผิวหนังตัดของเนื้อสุกรเฉพาะด้านหน้าตัดใหม่ เพื่อลดการปนเปื้อนของ Bacterial catalase
- หยด sterile saline ปริมาตร 100 ul บนกระดาษกรอง เพื่อดูดซับ pork catalase ขึ้นมาบนกระดาษกรอง
- ทดสอบและคำนวณ Catalase activity ใช้ syringe ขนาด 3 มล. อ่านผลการตอบสนอง ระยะเวลา 5 นาที
- ทดสอบและคำนวณ Catalase activity
 - ตัดชิ้นเนื้อสุกร 4 ชิ้น จำนวน 3 ซ้ำ (Replication)
 - หน้าตัดชิ้นเนื้อ จำนวน 3 ครั้ง (repeat)

ผลการทดสอบ

- ผลการตอบสนองของ pork catalase ในรูปของ Catalase activity ดังแสดงในตารางที่ 3.40

ตารางที่ 3.40 ปริมาตร Gas (มล.) จาก pork catalase จากผิวหน้าตัดของในเนื้อสุกรส่วนเนื้อสันนอก

Piece	repeat	Replication		
		1	2	3
1	1	0.50	0.60	0.45
	2	0.45	0.70	0.65
	3	1.00	0.60	0.75
2	1	0.50	0.80	0.40
	2	0.50	0.85	0.50
	3	0.70	0.60	0.45
3	1	0.60	0.40	0.50
	2	0.60	0.60	0.50
	3	0.50	0.50	0.50
4	1	0.40	0.60	0.70
	2	0.60	1.10	0.40
	3	0.70	0.80	0.10
Mean		0.57	0.65	0.45

สรุปผลการทดสอบ

- ค่าพิสัยปกติของ pork catalase (normal range) 0.45-0.67 มล.
- ค่าเฉลี่ยรวมของ pork catalase 0.55 มล.

3.4.3 ความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์แบคทีเรียและระดับการตอบสนองของ test kits เบื้องต้น (CATALASE TEST)

(relationship of Bacterial cells and response : CATALASE TEST)

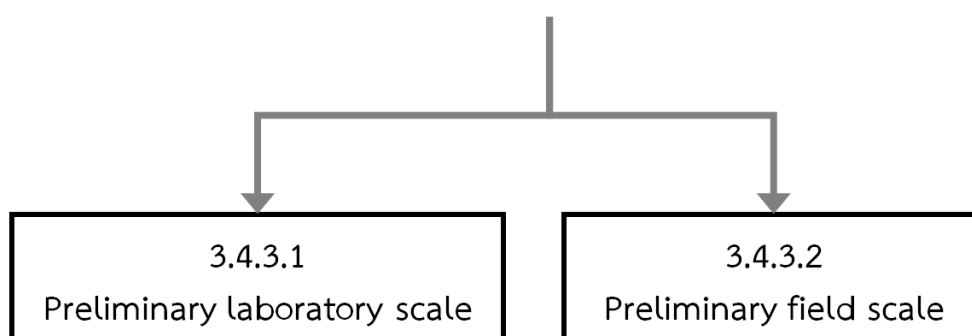
CATALASE TEST

การศึกษาความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์แบคทีเรียและระดับการตอบสนองของ Catalase test บนเนื้อสุกร ประกอบด้วย 2 ระดับ (ภาพที่ 3.66) คือ

1.3.1 ระดับห้องปฏิบัติการเบื้องต้น (Preliminary laboratory scale) เป็นการศึกษาในระดับนำร่องเพื่อมุ่งหาความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์แบคทีเรียและระดับการตอบสนองของ Catalase test โดยดำเนินการในห้องปฏิบัติการที่มีการควบคุมปัจจัยผันแปรต่างๆ ได้

1.3.2 ระดับภาคสนามเบื้องต้น (Preliminary field scale) เป็นการศึกษาในระดับนำร่องต่อเนื่องจากระดับห้องปฏิบัติการเบื้องต้น เพื่อมุ่งหาความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์แบคทีเรียและระดับการตอบสนองของ Catalase test โดยดำเนินการในภาคสนามที่มีปัจจัยผันแปรต่างๆ ในสถานการณ์การใช้งานชุดทดสอบจริงผ่าน platform ที่ใกล้เคียงกับชุดทดสอบที่จะใช้จริงมากที่สุด

3.4.3 relationship of bacterial cells and response (OXIDASE TEST)



ภาพที่ 3.66 ขั้นตอนการศึกษาความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์แบคทีเรียและระดับการตอบสนองของ Catalase test เบื้องต้น

3.4.3.1 ระดับห้องปฏิบัติการเบื้องต้น

(Preliminary laboratory scale)

การทดสอบที่ 1

วิธีการทดสอบ

- เตรียมเนื้อสุกรแล้วตัดแนวขวาง (cross section) แบบ aseptic technique เพื่อป้องกันมิให้เกิดการปนเปื้อนที่ผิวหนังตัดเนื้อสุกร
- เตรียมหลอดฉีดยาพลาสติกใช้ครั้งเดียวทิ้ง ขนาด 3 มล.
- เตรียมกระดาษกรอง Whatman™ No.1 รูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสให้มีขนาดมาตรฐาน 1"× 1"
- เพาะบ่ม (subculture) *Staphylococcus aureus* ใน Brain Heart Infusion (BHI) ที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง ได้สารละลายแบคทีเรีย
- สารละลายแบคทีเรียใน BHI ที่ได้จากการบ่มเพาะ แบ่งเป็น 2 ส่วน คือ
 - ส่วนที่ 1 : การเจือจางแบบ 10-fold serial dilution เพื่อหาระดับความเข้มข้นของสารละลายแบคทีเรียใน nutrient agar ที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 18 ชั่วโมง
 - ส่วนที่ 2 : การทดสอบ Catalase activity
- การทดสอบ Catalase activity
 - นำสารละลายแบคทีเรีย มาเจือจางแบบ 2-fold serial dilution เพื่อลดจำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย ปริมาตร 3 มล. หยดและเกลี่ยให้ทั่วผิวหนังตัดเนื้อสุกร
 - ใช้ปากคีบ (forceps) หนีบพับกระดาษกรองบรรจุลงในกระบอกฉีดยา (barrel) ทางด้านตรงข้ามกับปลายเข็มฉีดยาและประกอบแกนฉีดยา (plunger) เข้ากับกระบอกฉีดยา ขนาด 3 มล.
 - ดูดสารละลาย 3% hydrogen peroxide เข้ามาในกระบอกฉีดยาเพื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายแบคทีเรียโดยให้ปลายแกนฉีดยาอยู่ที่ประมาณ 0.5 ml.
 - ใช้เข็มฉีดยาอุดปลายด้วยดินน้ำมัน (needle & oil-based clay) จากการศึกษาในขั้นตอนที่ผ่านมา โดยนำมาอุดที่ปลายด้านเข็มฉีดยาทันทีเพื่อป้องกันมิให้สารละลายหรือฟองอากาศรั่วไหลออกจากกระบอกฉีดยา เนื่องจากปฏิกิริยา Catalase เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วมาก
 - อ่านผลการตอบสนองของการทำงานของ Catalase ที่เวลา 60 และ 120 วินาที ในรูปของ % Catalase activity

ผลการทดสอบ

- การตอบสนองของแบคทีเรียต่อการทดสอบ Catalase ในรูปของ % Catalase activity ของ total catalase ที่ผิวหนังตัดเนื้อสุกรสันนอก และ *Staphylococcus aureus* ระยะเวลาสังเกต

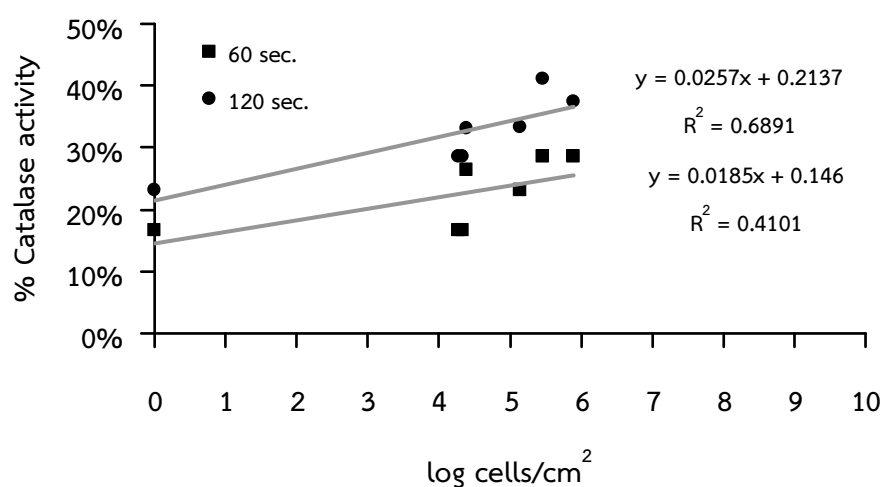
ปฏิกิริยา 60 และ 120 วินาที syringe ขนาด 3 มล. ให้ผลการตอบสนอง ดังตารางที่ 23 และ ภาพที่ 3.67

- % Catalase activity ของ total catalase และจำนวนเซลล์ของ *Staphylococcus aureus* ที่ปนเปื้อนในเนื้อสุกมีความสัมพันธ์ในลักษณะทางเดียวกัน ที่ 60 วินาที และ 120 วินาที โดยมีค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.640 และ 0.830 ตามลำดับ (ตารางที่ 3.41)

ตารางที่ 3.41 % Catalase activity ของ total catalase ที่ผิวหน้าตัดเนื้อสุกรสันนอก และ *Staphylococcus aureus* ระยะเวลาสังเกตปฏิกิริยา 60 และ 120 วินาที syringe ขนาด 3 มล.

<i>Staphylococcus aureus</i> Log cells/cm ²	% Catalase activity	
	60 sec.	120 sec.
Control	17%	23%
4.3	17%	29%
5.1	23%	33%
4.3	17%	29%
4.4	26%	33%
5.5	29%	41%
5.9	29%	38%

% Catalase activity of total catalase inoculated with
Staphylococcus aureus on x-section pork surface



ภาพที่ 3.67 % Catalase activity ของ total catalase ที่ผิวหน้าตัดเนื้อสุกรสันนอก และ *Staphylococcus aureus* ระยะเวลาสังเกตปฏิกิริยา 60 และ 120 วินาที syringe ขนาด 3 มล.

สรุปผลการทดสอบ

- ผลการทดสอบพบความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์ *Staphylococcus aureus* และระดับการตอบสนองของ Catalase ที่ระยะเวลาสังเกตปฏิกิริยา 120 วินาที
- ชุดทดสอบ Catalase test สามารถนำไปใช้วัดปริมาณเซลล์ *Staphylococcus aureus* ที่ปนเปื้อนที่ผิวเนื้อสุกรได้ ที่ระยะเวลาสังเกตปฏิกิริยา 120 วินาที
- ความสัมพันธ์ของจำนวน *Staphylococcus aureus* และระดับการตอบสนองของ Catalase test kits เบื้องต้น ได้ 2 สมการ คือ

$$y_{SA1} = 0.0257x + 0.2137 \quad (\text{CR SA1})$$

$$y_{SA2} = 0.0185x + 0.146 \quad (\text{CR SA2})$$

โดยที่

y คือ ระดับ Bacterial catalase activity (BCA)

x คือ ระดับการปนเปื้อน *Staphylococcus aureus* ($\log \text{cfu/cm}^2$)

เมื่อปรับตำแหน่งและกำหนดค่าของตัวแปร x และ y ทำให้ได้ 2 แบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนอง response contamination (RC) models

$$Staphylococcus aureus_1 (\log \text{cfu} / \text{cm}^2) = \frac{BCA - 0.2137}{0.0257} \quad (\text{RC SA1})$$

$$Staphylococcus aureus_2 (\log \text{cfu} / \text{cm}^2) = \frac{BCA - 0.146}{0.0185} \quad (\text{RC SA2})$$

การทดสอบที่ 2

วิธีการทดสอบ

- เตรียมเนื้อสุกรแล้วตัดแนวขวาง (cross section) แบบ aseptic technique เพื่อป้องกันมิให้เกิดการปนเปื้อนที่ผิวหนังที่ตัดเนื้อสุกร
- เตรียมหลอดฉีดยาพลาสติกใช้ครั้งเดียวทิ้ง ขนาด 3 มล.
- เตรียมกระดาษกรอง WhatmanTM No.1 รูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสให้มีขนาดมาตรฐาน 1" x 1"
- คัดเลือกแบคทีเรียในการศึกษาที่ให้การตอบสนองต่อ Catalase test คือ
 - กลุ่มตอบสนองทันที คือ *Serratia marcescens*

- กลุ่มตอบสนองหนึ่ง คือ *Staphylococcus aureus* และ *Klebsiella oxytoca*
- เพาะบ่ม (subculture) แบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ใน Brain Heart Infusion (BHI) ที่อุณหภูมิ 37°C ได้สารละลายแบคทีเรีย ความเข้มข้นเริ่มต้น $\sim 10^7 - 10^8$ cfu/ml
- สารละลายแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ใน BHI ที่ได้จากการบ่มเพาะ แบ่งเป็น 2 ส่วน คือ
 - ส่วนที่ 1 : การเจือจางแบบ 10-fold serial dilution เพื่อหาระดับความเข้มข้นของสารละลายแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ใน nutrient agar อุณหภูมิ 37°C นาน 18 ชั่วโมง
 - ส่วนที่ 2 : การทดสอบ Catalase activity
- การทดสอบ Catalase activity
 - นำสารละลายแบคทีเรีย มาเจือจางแบบ 2-fold serial dilution เพื่อลดจำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย ปริมาตร 3 มล. หยดและเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าตัดเนื้อสุก
 - ใช้ปากคีบ (forceps) หนีบพับกระดาษกรองบรรจุลงในกระบอกฉีดยา (barrel) ทางด้านตรงข้ามกับปลายเข็มฉีดยาและประกอบแกนฉีดยา (plunger) เข้ากับกระบอกฉีดยา ขนาด 3 มล.
 - ดูดสารละลาย 3% hydrogen peroxide เข้ามาในกระบอกฉีดยาเพื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายแบคทีเรียโดยให้ปลายแกนฉีดยาอยู่ที่ประมาณ 0.5 ml.
 - ใช้เข็มฉีดยาอุดปลายด้วยดินน้ำมัน (needle & oil-based clay) จากการศึกษาในขั้นตอนที่ผ่านมา โดยนำมาอุดที่ปลายด้านเข็มฉีดยาทันทีเพื่อป้องกันมิให้สารละลายหรือฟองอากาศรั่วไหลออกจากกระบอกฉีดยา เนื่องจากปฏิกิริยา Catalase เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วมาก
 - อ่านผลการตอบสนองของการทำงาน Catalase เวลา 5 นาที
 - ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ (Replication)

ผลการทดสอบ

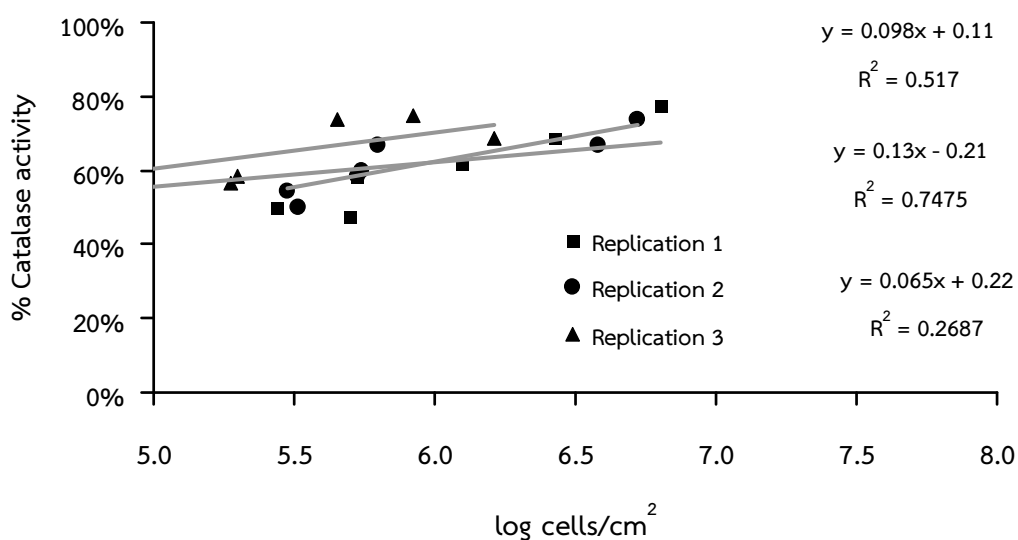
- การตอบสนองของแบคทีเรียต่อการทดสอบ Catalase ของ total catalase ที่ผิวหน้าตัดเนื้อสุกสันนอก และแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ระยะเวลาสังเกตปฏิกิริยา 5 นาที syringe ขนาด 3 มล. ให้ผลการตอบสนอง ดังตารางที่ 3.42-3.44
- % Catalase activity ของ total catalase และจำนวนเซลล์ของ *Serratia marcescens* ที่ปนเปื้อนในเนื้อสุกมีความสัมพันธ์ในลักษณะทางเดียวกัน ที่ 5 นาที โดยมีค่า correlation coefficient (r) ระหว่าง 0.601-0.886 ดังภาพที่ 3.68

ตารางที่ 3.42 % Catalase activity ของ total catalase ที่ผิวหน้าตัดเนื้อสุกรสันนอก และ *Serratia marcescens* ระยะเวลาสังเกตปฏิกิริยา 5 นาที syringe ขนาด 3 มล.

Replication 1		Replication 2		Replication 3	
log cells/cm ²	%CA	log cells/cm ²	%CA	log cells/cm ²	%CA
4.27	62%	5.48	55%	4.46	58%
5.44	50%	5.51	50%	5.27	57%
5.70	47%	5.73	58%	5.30	58%
6.10	62%	5.74	60%	5.65	74%
5.72	58%	5.80	67%	5.92	75%
6.43	69%	6.58	67%	6.21	69%
6.80	77%	6.72	74%	N/A	N/A

N/A : ไม่มีการทดสอบ

% Catalase activity of total catalase inoculated with
Serratia marcescens on x-section pork surface



ภาพที่ 3.68 % Catalase activity ของ total catalase ที่ผิวหน้าตัดเนื้อสุกรสันนอก และ *Serratia marcescens* ระยะเวลาสังเกตปฏิกิริยา 5 นาที syringe ขนาด 3 มล.

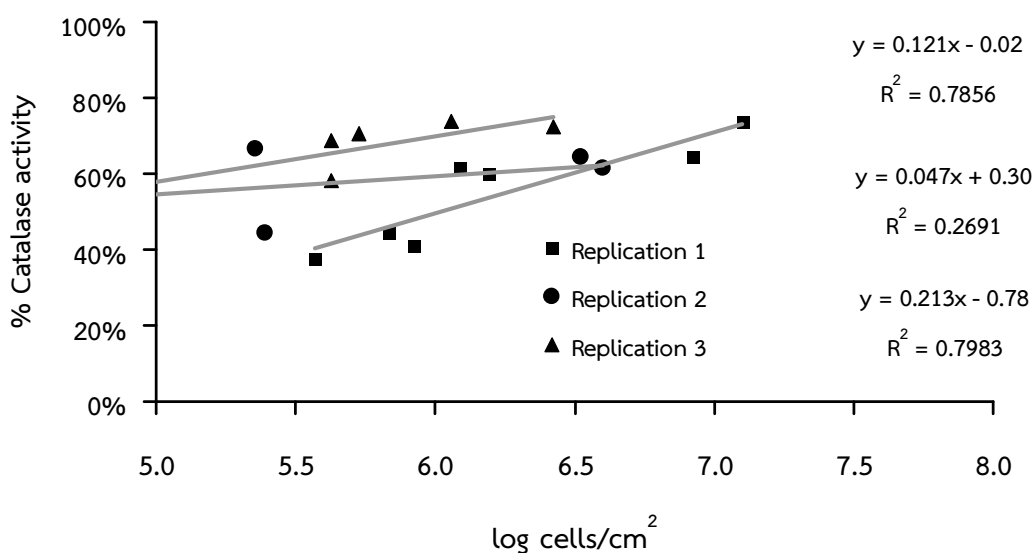
- % Catalase activity ของ total catalase และจำนวนเซลล์ของ *Serratia marcescens* ที่ปนเปื้อนในเนื้อสุกรมีความสัมพันธ์ในลักษณะทางเดียวกัน ที่ 5 นาที โดยมีค่า correlation coefficient (r) ระหว่าง 0.540-0.915 ดังภาพที่ 3.69

ตารางที่ 3.43 % Catalase activity ของ total catalase ที่ผิวหน้าตัดเนื้อสุกรสันนอก และ *Staphylococcus aureus* ระยะเวลาสั่งเกิดปฏิกิริยา 5 นาที syringe ขนาด 3 มล.

Replication 1		Replication 2		Replication 3	
log cells/cm ²	%CA	log cells/cm ²	%CA	log cells/cm ²	%CA
5.92	41%	4.77	50%	4.39	50%
5.57	38%	4.30	55%	5.63	69%
5.84	44%	4.96	55%	5.73	71%
6.09	62%	5.39	44%	5.63	58%
6.19	60%	5.35	67%	6.42	72%
6.92	64%	6.60	62%	6.06	74%
7.10	74%	6.52	64%	N/A	N/A

N/A : ไม่มีการทดสอบ

% Catalase activity of total catalase inoculated with *Staphylococcus aureus* on x-section pork surface



ภาพที่ 3.69 % Catalase activity ของ total catalase ที่ผิวหน้าตัดเนื้อสุกรสันนอก และ *Staphylococcus aureus* ระยะเวลาสั่งเกิดปฏิกิริยา 5 นาที syringe ขนาด 3 มล.

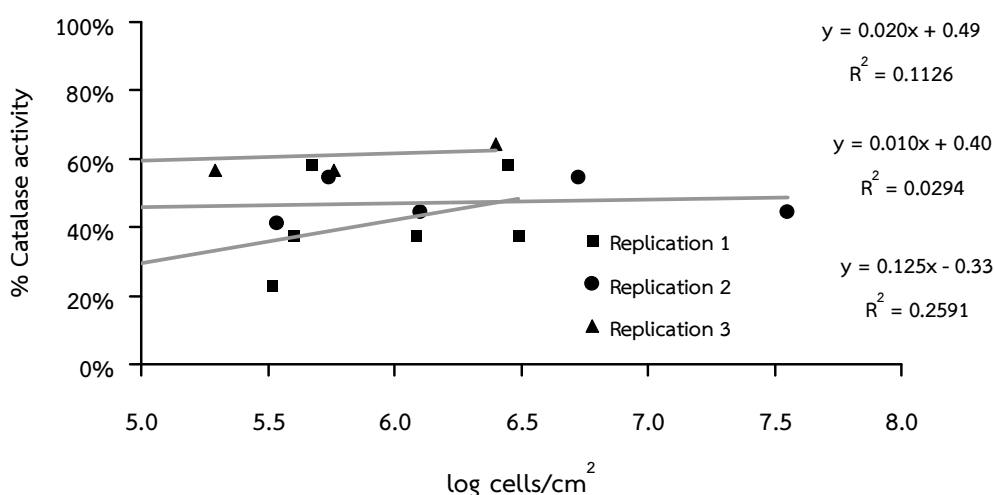
- % Catalase activity ของ total catalase และจำนวนเซลล์ของ *Klebsiella oxytoca* ที่ปนเปื้อนในเนื้อสุกรมีความสัมพันธ์ในลักษณะทางเดียวกัน ที่ 5 นาที โดยมีค่า correlation coefficient (r) ระหว่าง 0.160-0.326 ดังภาพที่ 3.70

ตารางที่ 3.44 % Catalase activity ของ total catalase ที่ผิวหน้าตัดเนื้อสุกรสันนอก และ *Klebsiella oxytoca* ระยะเวลาสังเกตปฏิกิริยา 5 นาที syringe ขนาด 3 มล.

Replication 1		Replication 2		Replication 3	
log cells/cm ²	%CA	log cells/cm ²	%CA	log cells/cm ²	%CA
4.92	27%	4.93	44%	4.04	55%
5.52	23%	5.54	41%	4.32	58%
5.60	38%	5.74	55%	4.92	69%
5.67	58%	6.10	44%	5.29	57%
6.08	38%	6.73	55%	5.76	57%
6.49	38%	7.55	44%	6.40	64%
6.45	58%	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A : ไม่มีการทดสอบ

% Catalase activity of total catalase inoculated with
Klebsiella oxytoca on x-section pork surface



ภาพที่ 3.70 % Catalase activity ของ total catalase ที่ผิวหน้าตัดเนื้อสุกรสันนอก และ *Klebsiella oxytoca* ระยะเวลาสังเกตปฏิกิริยา 5 นาที syringe ขนาด 3 มล.

สรุปผลการทดสอบ

- ผลการทดสอบพบความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์และระดับการตอบสนองของ Catalase ของแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ
 - กลุ่มตอบสนองทันที คือ *Serratia marcescens*
 - กลุ่มตอบสนองหน่วง คือ *Staphylococcus aureus* และ *Klebsiella oxytoca*
- การทดสอบระดับห้องปฏิบัติการเบื้องต้น (Preliminary laboratory scale) ของชุดทดสอบ Catalase test สามารถนำไปใช้วัดปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่ปนเปื้อนที่ผิวเนื้อสุกรได้
- ความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์แบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และระดับการตอบสนองของ Catalase test kits เบื้องต้น ได้ 3 สมการ คือ

$$y_{SA3} = 0.121x - 0.02 \quad (\text{CR SA3})$$

$$y_{SA4} = 0.047x + 0.30 \quad (\text{CR SA4})$$

$$y_{SA5} = 0.213x - 0.78 \quad (\text{CR SA5})$$

โดยที่

y คือ ระดับ Bacterial catalase activity (BCA)

x คือ ระดับการปนเปื้อน *Staphylococcus aureus* ($\log \text{cfu}/\text{cm}^2$)

เมื่อปรับตำแหน่งและกำหนดค่าของตัวแปร x และ y ทำให้ได้ 3 แบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนอง response contamination (RC) models

$$\text{Staphylococcus aureus}_3 (\log \text{cfu} / \text{cm}^2) = \frac{BCA + 0.02}{0.121} \quad (\text{RC SA3})$$

$$\text{Staphylococcus aureus}_4 (\log \text{cfu} / \text{cm}^2) = \frac{BCA - 0.30}{0.047} \quad (\text{RC SA4})$$

$$\text{Staphylococcus aureus}_5 (\log \text{cfu} / \text{cm}^2) = \frac{BCA + 0.78}{0.213} \quad (\text{RC SA5})$$

- ความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์แบคทีเรีย *Klebsiella oxytoca* และระดับการตอบสนองของ Catalase test kits เบื้องต้น ได้ 3 สมการ คือ

$$y_{KO1} = 0.020x + 0.49 \quad (\text{CR KO1})$$

$$y_{SA4} = 0.01x + 0.40 \quad (\text{CR KO2})$$

$$y_{SA5} = 0.125x + 0.33 \quad (\text{CR KO3})$$

โดยที่

y คือ ระดับ Bacterial catalase activity (BCA)

x คือ ระดับการปนเปื้อน *Klebsiella oxytoca* (log cfu/cm²)

เมื่อปรับตำแหน่งและกำหนดค่าของตัวแปร x และ y ทำให้ได้ 3 สมการหรือแบบจำลอง response contamination (RC) models

$$Klebsiella \ oxytoca_1 (\log cfu / cm^2) = \frac{BCA - 0.49}{0.020} \quad (\text{RC KO1})$$

$$Klebsiella \ oxytoca_2 (\log cfu / cm^2) = \frac{BCA - 0.40}{0.01} \quad (\text{RC KO2})$$

$$Klebsiella \ oxytoca_3 (\log cfu / cm^2) = \frac{BCA - 0.33}{0.125} \quad (\text{RC KO3})$$

3.4.3.2 ระดับภาคสนามเบื้องต้น (Preliminary field scale)

วิธีการทดสอบ

- เก็บตัวอย่างเนื้อสุกร (ส่วนสันนอก) จากเชียงใหม่ตลาดสดจำนวน 48 ตัวอย่าง
- นำตัวอย่างสุกรผ่านการทดสอบเพื่อเปรียบเทียบ การปนเปื้อนแบคทีเรียทั้งหมด Total viable count (TVC) และ *Klebsiella* spp. โดย ¹ใช้ชุดทดสอบ (test kit) และ ²ใช้การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ (laboratory test)
- กระดาษกรอง WhatmanTM No.1 ตัดเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัสให้มีขนาดมาตรฐาน 1" x 1" เทียบเท่ากับ 6.45 ตารางเซนติเมตร (cm²) จำนวน 2 แผ่น นำไปวางบนผิวหน้าตัดเนื้อสุกร และรอสักครู่เพื่อให้กระดาษดูดซับแบคทีเรียทั้งหมด และ *Klebsiella* spp. ขึ้นมาติดบนผิวหน้าของกระดาษกรอง
 - ใช้ปากคีบ (forceps) หนีบลอกกระดาษกรองแผ่นที่ 1 ออกจากผิวหน้าตัดเนื้อสุกร เพื่อทดสอบ Catalase test
 - หนีบพับกระดาษกรองบรรจุลงในกระบอกฉีดยา (barrel) ทางด้านตรงข้ามกับปลายเข็มฉีดยาและประกอบแกนฉีดยา (plunger) เข้ากับกระบอกฉีดยา ขนาด 3 มล.
 - ดูดสารละลาย 3% hydrogen peroxide เข้ามาในกระบอกฉีดยาเพื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายแบคทีเรียโดยให้ปลายแกนฉีดยาอยู่ที่ประมาณ 0.5 ml.
 - ใช้เข็มฉีดยาอุดปลายด้วยดินน้ำมัน (needle & oil-based clay) จากการศึกษาค้นคว้าที่ผ่านมา โดยนำมาอุดที่ปลายด้านเข็มฉีดยาทันทีเพื่อป้องกันมิให้สารละลายหรือฟองอากาศรั่วไหลออกจากกระบอกฉีดยา เนื่องจากปฏิกิริยา Catalase เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วมาก
 - อ่านผลการตอบสนองของการทำงาน Catalase เวลา 5 นาที
 - ใช้ปากคีบ (forceps) หนีบลอกกระดาษกรองแผ่นที่ 2 ออกจากผิวหน้าตัดเนื้อสุกร
 - นับจำนวน colony ของแบคทีเรียทั้งหมดและ *Klebsiella* spp. แล้วคำนวณจำนวนในหน่วย cfu/cm²
- หาความสัมพันธ์ระหว่าง การตอบสนองของแบคทีเรียโดยการใช้ชุดทดสอบ Catalase test และจำนวนแบคทีเรีย ที่วิเคราะห์ได้ทางห้องปฏิบัติการ (laboratory result) โดยพิจารณาจาก
 - correlation coefficient (r) มีค่าระหว่าง -1 ถึง +1 กล่าวคือ
 - $r < 0$ หรือ ค่าลบ (negative) คือ ผลการตอบสนองจากการใช้ชุดทดสอบ (visual response) แปรผกผันกับ จำนวนแบคทีเรียที่วิเคราะห์ได้ทางห้องปฏิบัติการ (laboratory result) โดยระดับการแปรผกผันมากขึ้น เมื่อ r เข้าใกล้ -1

- $r = 0$ คือ ผลการตอบสนองจากการใช้ชุดทดสอบ (visual response) ไม่ผันแปร กับ จำนวนแบคทีเรียที่วิเคราะห์ได้ทางห้องปฏิบัติการ (laboratory result)

- $r > 0$ หรือ ค่าบวก (positive) คือ ผลการตอบสนองจากการใช้ชุดทดสอบ (visual response) แปรผกตรง กับจำนวนแบคทีเรียที่วิเคราะห์ได้ทางห้องปฏิบัติการ (laboratory result) โดยระดับการแปรผกผันมากขึ้น เมื่อ r เข้าใกล้ +1

ผลการทดสอบ

- การจัดเรียงเรียงข้อมูลของ 2 ตัวแปร (visual response vs. laboratory result) ที่ให้ผลการทดลองที่เป็นไปได้ 2 ทาง คือ การพบ/ไม่พบการปนเปื้อน ทำให้แบ่งผลการวิเคราะห์ได้เป็น 4 กลุ่ม ดังตารางที่ 3.45

ตารางที่ 3.45 ความสอดคล้องกันของการวิเคราะห์แบคทีเรียทั้งหมดด้วยวิธีทางห้องปฏิบัติการและ ชุดทดสอบ Catalase

จำนวนตัวอย่างเนื้อสุกรที่วิเคราะห์ การปนเปื้อนแบคทีเรียทั้งหมด		ผล Catalase test	
		พบการปนเปื้อน (positive)	ไม่พบการปนเปื้อน (negative)
ผลการวิเคราะห์ทาง ห้องปฏิบัติการ (laboratory result)	พบการปนเปื้อน (positive)	26	8
	ไม่พบการปนเปื้อน (negative)	12	2

- ผลการทดสอบความสอดคล้องกันของการวิเคราะห์แบคทีเรียทั้งหมดด้วยวิธีทางห้องปฏิบัติการและ ชุดทดสอบ Catalase พบว่า ให้ผลบวกปลอม (false positive) และ ผลลบปลอม (false negative) จำนวน 12 ตัวอย่าง และ 8 ตัวอย่าง ตามลำดับ
- เมื่อนำผลการตอบสนองที่พบการปนเปื้อน (positive) และ ผลทางห้องปฏิบัติการที่พบการปนเปื้อน (positive) เฉพาะที่มีความสอดคล้องกัน (agreement) คือ 26 ตัวอย่างที่ปนเปื้อน และ 2 ตัวอย่างที่ไม่ปนเปื้อน
 - ค่า r หรือ correlation coefficient ประมาณ 0.76 แสดงว่า ผลการตอบสนองจากการใช้ชุดทดสอบ (visual response) แปรผันตรงกับจำนวน แบคทีเรียทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้ทางห้องปฏิบัติการ (laboratory result) $r^2 = 0.5807$ ดังภาพที่ 3.71
 - ความสัมพันธ์ของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และระดับการตอบสนองของ Catalase test kits เบื้องต้น ได้ 1 สมการ คือ

$$y_{TVC1} = 0.055x + 0.01 \quad (\text{CR TVC1})$$

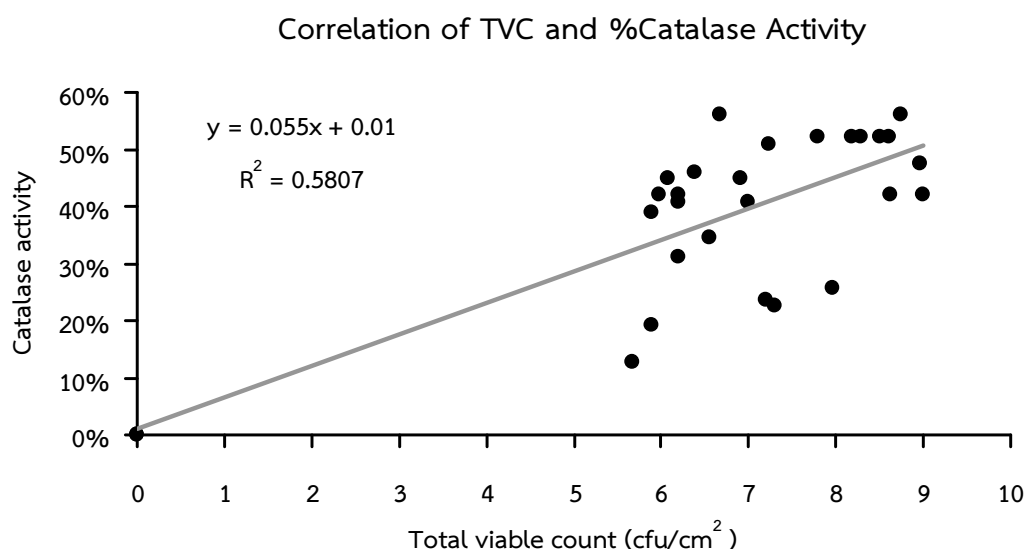
โดยที่

y คือ ระดับ Bacterial catalase activity (BCA)

x คือ ระดับการปนเปื้อนแบคทีเรียทั้งหมด (log cfu/cm²)

เมื่อปรับตำแหน่งและกำหนดค่าของตัวแปร x และ y ทำให้ได้ 1 แบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนอง (response contamination model)

$$Total\ Viable\ Count_1\ (\log\ cfu / cm^2) = \frac{BCA - 0.01}{0.055} \quad (RC\ TVC1)$$



ภาพที่ 3.71 ความสัมพันธ์ของผลการตอบสนองจาก Catalase test แปรผันตรงกับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด ที่วิเคราะห์ได้ทางห้องปฏิบัติการ (laboratory result)

- เมื่อนำผลการตอบสนองที่พบการปนเปื้อน (positive) และ ผลทางห้องปฏิบัติการที่พบการปนเปื้อน (positive) เฉพาะที่มีความสอดคล้องกัน (agreement) คือ 24 ตัวอย่างที่ปนเปื้อน และ 2 ตัวอย่างที่ไม่ปนเปื้อน
 - ค่า r หรือ correlation coefficient ประมาณ 0.69 แสดงว่า ผลการตอบสนองจากการใช้ชุดทดสอบ (visual response) แปรผันตรงกับจำนวน *Klebsiella* spp. ที่วิเคราะห์ได้ทางห้องปฏิบัติการ (laboratory result) $r^2 = 0.4886$ ดังภาพที่ 3.72
 - ความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์แบคทีเรีย *Klebsiella oxytoca* และระดับการตอบสนองของ Catalase test kits เบื้องต้น ได้ 1 สมการ คือ

$$y_{KO4} = 0.0797x + 0.0982 \quad (CR\ KO4)$$

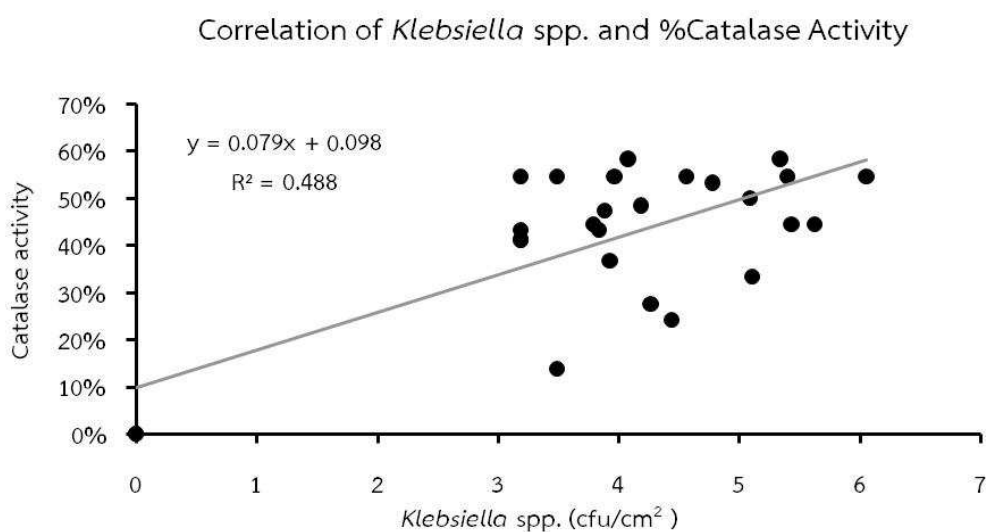
โดยที่

y คือ ระดับ Bacterial catalase activity (BCA)

x คือ ระดับการปนเปื้อน *Klebsiella oxytoca* (log cfu/cm²)

เมื่อปรับตำแหน่งและกำหนดค่าของตัวแปร x และ y ทำให้ได้ 1 แบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนอง (response contamination model)

$$Klebsiella\ oxytoca_4 \left(\log cfu / cm^2 \right) = \frac{BCA - 0.0982}{0.0797} \quad (RC\ KO4)$$



ภาพที่ 3.72 ความสัมพันธ์ของผลการตอบสนองจาก Catalase test แปรผันตรงกับจำนวน *Klebsiella* spp. ที่วิเคราะห์ได้ทางห้องปฏิบัติการ (laboratory result)

บทที่ 4

การใช้การตรวจสอบจุลินทรีย์อย่างรวดเร็วเพื่อการประเมินการเสื่อม (Rapid test kit for spoilage assessment)

4.1 ตรวจสอบระดับ Spoilage bacteria ในเนื้อสุกรตลาดสดด้วย test kit (Spoilage level by test kit)

4.1.1 การใช้ชุดทดสอบหาระดับการตอบสนอง (response) ของแบคทีเรียที่ปนเปื้อน (response result from test kit)

ผลการใช้ชุดทดสอบ (test kits) ในการวัดระดับการตอบสนองของการปนเปื้อน spoilage bacteria ในเนื้อสุกรในตลาดสดในรอบที่ 2 จำนวนรวม 314 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4.1) ด้วย Oxidase test (2 นาที) และ Catalase test (5 นาที) ดังแสดงในตารางที่ 4.2 และ 4.3 และ ภาพที่ 4.1 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 จำนวนตัวอย่างเนื้อสุกรในการเก็บตัวอย่างรอบที่ 2 ในกลุ่มเขตพื้นที่กรุงเทพมหานคร

กลุ่มเขตพื้นที่	ตลาดที่ 1	ตลาดที่ 2	ตลาดที่ 3
กรุงเทพกลาง	36	4	6
กรุงเทพออก	50	10	8
กรุงเทพเหนือ	64	N/A	N/A
กรุงเทพใต้	24	20	N/A
ธนบุรีเหนือ	42	N/A	N/A
ธนบุรีใต้	50	N/A	N/A

N/A : not applicable ไม่มีการเก็บตัวอย่าง

ตารางที่ 4.2 ค่าเฉลี่ย (mean) และความชุก (prevalence) ของการตอบสนอง Oxidase test* ในเนื้อสุกรในกลุ่มเขตพื้นที่กรุงเทพมหานคร

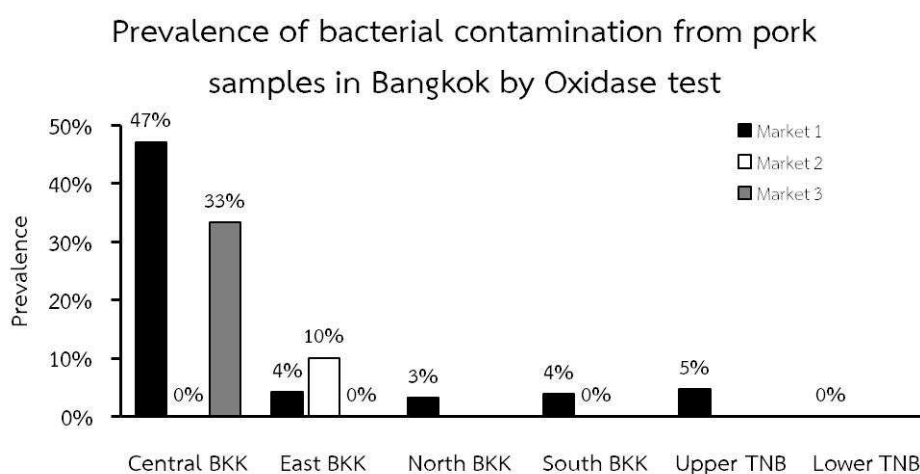
กลุ่มเขตพื้นที่	ตลาดที่ 1		ตลาดที่ 2		ตลาดที่ 3	
	Mean $\pm$ SD **	Prev.	mean $\pm$ SD	Prev.	mean $\pm$ SD	Prev.
กรุงเทพกลาง	0.35 $\pm$ 0.47	47%	Negative ***	0 %	0.33 $\pm$ 0.60	33%
กรุงเทพออก	0.02 $\pm$ 0.10	4%	0.05 $\pm$ 0.15	10%	Negative	0 %
กรุงเทพเหนือ	0.02 $\pm$ 0.08	3%	N/A ****		N/A	
กรุงเทพใต้	0.02 $\pm$ 0.09	4%	Negative	0 %	N/A	
ธนบุรีเหนือ	0.02 $\pm$ 0.10	5%	N/A		N/A	
ธนบุรีใต้	Negative	0 %	N/A		N/A	

* พิสัยการตอบสนองของ Oxidase test ระหว่าง 0-2.0

** ค่าเฉลี่ย $\pm$ standard deviation (SD)

*** Negative : ไม่พบการตอบสนอง

**** N/A : not applicable ไม่มีการเก็บตัวอย่าง



ภาพที่ 4.1 ความชุกของการตอบสนอง Oxidase test ในเนื้อสุกรในกลุ่มเขตพื้นที่กรุงเทพมหานคร

ตารางที่ 4.3 Bacterial catalase activity (BCA) ในเนื้อสุกรในกลุ่มเขตพื้นที่กรุงเทพมหานคร

กลุ่มเขตพื้นที่	% Catalase activity		
	Total catalase activity (mean $\pm$ SD.)	Bacterial catalase activity (mean $\pm$ SD.)	Prevalence (%)
ธนบุรีเหนือ	70 $\pm$ 28	22 $\pm$ 16	86%
ธนบุรีใต้	44 $\pm$ 37	10 $\pm$ 12	59%

เนื่องจากลักษณะคุณภาพเนื้อสุกรไม่เหมาะสมในการทดสอบ catalase จึงไม่มีการทดสอบเนื้อสุกรในเขตอื่น

4.1.2 แบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนองของชุดทดสอบ (response-contamination model)

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์แบคทีเรียและระดับการตอบสนองของ test kits เบื้องต้น (relationship of Bacterial cells and response) ทำให้ได้แบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนอง (response contamination model) ที่ใช้ในการคำนวณระดับการปนเปื้อนของแบคทีเรียจากระดับการตอบสนองของ test kits ที่ใช้ในการทดสอบคุณภาพของเนื้อสุกรตัวอย่าง (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 แบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนอง (response contamination models) ของ test kits

Test Kit	จุลินทรีย์	Response contamination (RC) model	
Oxidase	<i>Pseudomonas</i> spp.	$P. fluorescens (\log cfu / g) = \frac{\text{visual response} + 0.0009}{0.2878}$	RC PS1
Catalase	<i>Klebsiella</i> spp.	$Klebsiella oxytoca_1 (\log cfu / cm^2) = \frac{BCA - 0.49}{0.020}$	RC KO1
		$Klebsiella oxytoca_2 (\log cfu / cm^2) = \frac{BCA - 0.40}{0.01}$	RC KO2
		$Klebsiella oxytoca_3 (\log cfu / cm^2) = \frac{BCA - 0.33}{0.125}$	RC KO3
		$Klebsiella oxytoca_4 (\log cfu / cm^2) = \frac{BCA - 0.0982}{0.0797}$	RC KO4
Total Viable Count	Total Viable Count	$(\log cfu / cm^2) = \frac{BCA - 0.01}{0.055}$	RC TVC

4.1.3 การคำนวณการปนเปื้อนจากแบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนองของชุดทดสอบ (calculating contamination from response-contamination model)

4.1.3.1 OXIDASE TEST

จากผลการใช้ oxidase test ที่ได้จากหัวข้อ 4.1.1 การใช้ชุดทดสอบหาระดับการตอบสนอง (response) ของแบคทีเรียที่ปนเปื้อน นำไปแทนค่าในแบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนอง (response contamination model) RC PS1

สมการ RC PS1 เป็นแบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนองที่พัฒนาจากการสร้างความสัมพันธ์ของปริมาณของ *Pseudomonas fluorescens* และการตอบสนองของ Oxidase test อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการนำ oxidase test kit ไปใช้จริงในการทดสอบหาระดับการปนเปื้อนในเนื้อสุกรนั้น การตอบสนองที่ได้นั้นไม่ได้เกิดจากเพียง *Pseudomonas fluorescens* เท่านั้น แต่จะเป็นการตอบสนองรวมของ *Pseudomonas* spp. ที่ให้ผลบวกกับ oxidase test ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงอนุมานว่า การตอบสนองที่เกิดขึ้นจาก oxidase test kit เกิดจาก *Pseudomonas* spp. โดยรวมทั้งหมด เมื่อนำผลการตอบสนองจากการใช้ oxidase test ในการทดสอบเนื้อสุกร โดยอาศัยแบบจำลองสมการ RC PS1 เพื่อคำนวณได้ระดับการปนเปื้อนของ *Pseudomonas* spp. ดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ระดับการปนเปื้อน *Pseudomonas fluorescens* จากการใช้ Oxidase test* ทดสอบที่ผิวหนังเนื้อสุกรในกลุ่มเขตพื้นที่กรุงเทพมหานคร

กลุ่มเขตพื้นที่	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (log cfu/g)		
	ตลาดที่ 1	ตลาดที่ 2	ตลาดที่ 3
กรุงเทพกลาง	1.2	Negative*	1.2
กรุงเทพออก	0.1	0.2	Negative
กรุงเทพเหนือ	0.1	N/A**	N/A
กรุงเทพใต้	0.1	Negative	N/A
ธนบุรีเหนือ	0.1	N/A	N/A
ธนบุรีใต้	Negative	N/A	N/A

* Negative : ไม่พบการปนเปื้อน

** N/A : not applicable ไม่มีการเก็บตัวอย่าง

4.1.3.2 CATALASE TEST

จากผลการใช้ catalase test ที่ได้จากหัวข้อ 4.1.1 การใช้ชุดทดสอบหาระดับการตอบสนอง (response) ของแบคทีเรียที่ปนเปื้อน นำไปแทนค่าในแบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนอง (response contamination model)

สมการ RC KO1 ถึง RC KO4 เป็นแบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนองที่พัฒนาจากการสร้างความสัมพันธ์ของปริมาณของทั้ง *Klebsiella oxytoca* ต่อการตอบสนองของ catalase test อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการนำ catalase test kit ไปใช้จริงในการทดสอบหาระดับการปนเปื้อนในเนื้อสุกนั้น การตอบสนองที่ได้นั้นมีได้เกิดจากเพียง *Klebsiella oxytoca* เท่านั้น แต่จะเป็นการตอบสนองรวมของ *Klebsiella* spp. ที่ให้ผลบวกกับ catalase test ดังนั้น ในการศึกษาจึงอนุมานว่า การตอบสนองที่เกิดขึ้นจาก catalase test kit เกิดจาก *Klebsiella* spp. โดยรวมทั้งหมด เมื่อนำผลการตอบสนองจากการใช้ catalase test ในการทดสอบเนื้อสุก โดยอาศัยแบบจำลองสมการ RC KO1 ถึง RC KO4 เพื่อคำนวณได้ระดับการปนเปื้อนของ *Klebsiella* spp. ดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ระดับการปนเปื้อน *Klebsiella* spp. ($\log \text{cfu/cm}^2$) จากการใช้ Catalase test ทดสอบที่ผิวหน้าเนื้อสุกในกลุ่มเขตพื้นที่กรุงเทพมหานคร

กลุ่มเขตพื้นที่	แบบจำลอง Response Contamination			
	RC KO1	RC KO2	RC KO3	RC KO4
ธนบุรีเหนือ	15.54	40.15	9.06	8.83
ธนบุรีใต้	12.61	34.35	8.61	8.12

4.2 ทวนสอบระดับ Spoilage bacteria ของ test kit โดยการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ (Spoilage level by laboratory)

หลังจากการเก็บตัวอย่างเนื้อสุกรและทำการตรวจสอบระดับ Spoilage bacteria ในเนื้อสุกรในตลาดสดด้วย test kit แล้วจึงดำเนินการทวนสอบระดับ Spoilage bacteria ของ test kit โดยการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ดังแสดงในตารางที่ 4.7-4.8

ตารางที่ 4.7 ผลการทวนสอบระดับ *Pseudomonas* spp. ในเนื้อสุกรทางห้องปฏิบัติการ

กลุ่มเขตพื้นที่	ตลาดที่ 1		ตลาดที่ 2		ตลาดที่ 3	
	Mean [*] ± SD ^{**}	Prev.	mean ± SD	Prev.	mean ± SD	Prev.
กรุงเทพมหานคร	0.59 ± 1.89	14%	0	0	0	0
กรุงเทพออก	1.25 ± 2.02	29%	0	0	0	0
กรุงเทพเหนือ	0	0	N/A		N/A	
กรุงเทพใต้	0	0	0	0	N/A	
ชลบุรีเหนือ	0	0	N/A		N/A	
ชลบุรีใต้	0	0	N/A		N/A	

* ค่าเฉลี่ย (log cfu/g)

** standard deviation (log cfu/g) N/A : not applicable ไม่มีการเก็บตัวอย่าง

ตารางที่ 4.8 ผลการทวนสอบระดับ *Klebsiella* spp. ในเนื้อสุกรทางห้องปฏิบัติการ

กลุ่มเขตพื้นที่	ตลาดที่ 1		ตลาดที่ 2		ตลาดที่ 3	
	Mean ± SD ^{**}	Prev.	mean ± SD	Prev.	mean ± SD	Prev.
กรุงเทพมหานคร	5.62 ± 0.61	97%	4.60 ± 0.41	100%	4.58 ± 2.37	83%
กรุงเทพออก	4.75 ± 2.08	86%	4.52 ± 2.65	80%	4.69 ± 2.93	75%
กรุงเทพเหนือ	0.00	0%	N/A		N/A	
กรุงเทพใต้	0.00	0%	0.00	0%	N/A	
ชลบุรีเหนือ	5.15 ± 1.83	91%	N/A		N/A	
ชลบุรีใต้	6.06 ± 0.96	100%	N/A		N/A	

* ค่าเฉลี่ย (log cfu/g)

** standard deviation (log cfu/g) N/A : not applicable ไม่มีการเก็บตัวอย่าง

4.3 การวิเคราะห์ความสอดคล้องของความเสื่อมของเนื้อสุกรจาก test kit และจากห้องปฏิบัติการ

(Agreement of Spoilage by test kit vs. laboratory)

4.3.1 ความสอดคล้องของผลของการใช้ Oxidase test kit และผลวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการในการปนเปื้อน *Pseudomonas* spp.

สมการ RC PS1 เป็นแบบจำลองที่พัฒนาจากการสร้างความสัมพันธ์ของปริมาณของ *Pseudomonas fluorescens* และการตอบสนองของ Oxidase test อย่างไรก็ตาม เนื่องจาก การนำ oxidase test kit ไปใช้จริงในการทดสอบหาระดับการปนเปื้อนในเนื้อสุกรนั้น การตอบสนองที่ได้นั้นมิได้เกิดจากเพียง *Pseudomonas fluorescens* เท่านั้น แต่จะเป็นการตอบสนองรวมของ *Pseudomonas* spp. ที่ให้ผลบวกกับ oxidase test ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงอนุมานว่า การตอบสนองที่เกิดขึ้นจาก oxidase test kit เกิดจาก *Pseudomonas* spp. โดยรวมทั้งหมด เมื่อนำผลการตอบสนองจากการใช้ oxidase test ในการทดสอบเนื้อสุกร โดยอาศัยแบบจำลองสมการ RC PS1

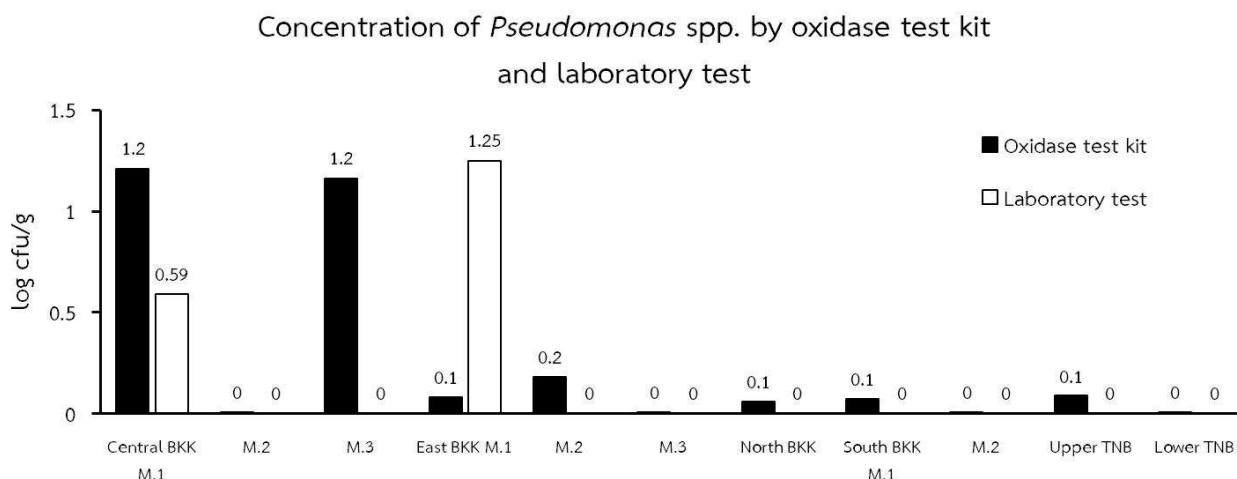
$$Pseudomonas\ fluorescens\ (log\ cfu\ /\ g) = \frac{visual\ response + 0.0009}{0.2878} \quad (RC\ PS1)$$

ในการแปลงค่าการตอบสนองของ oxidase test ให้ได้เป็นความเข้มข้นของ *Pseudomonas* spp. (*Pseudomonas fluorescens*) แล้วนำค่าระดับการปนเปื้อนที่คำนวณได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับระดับการปนเปื้อน *Pseudomonas* spp. ที่วิเคราะห์ได้จากห้องปฏิบัติการ (ตารางที่ 4.9 และ ภาพที่ 4.2-4.3)

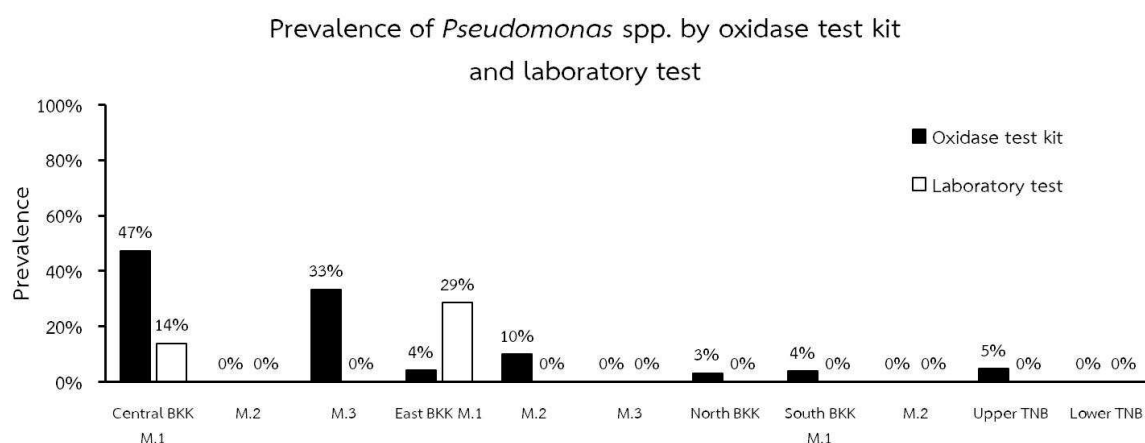
ตารางที่ 4.9 การเปรียบเทียบระดับการปนเปื้อน *Pseudomonas* spp. การตอบสนองของ Oxidase test และการทวนสอบทางห้องปฏิบัติการ

กลุ่มเขตพื้นที่	ตลาด	Mean (log cfu/g)		Prevalence	
		Oxidase test	Laboratory	Oxidase test	Laboratory
กรุงเทพมหานคร	1.	1.21	0.59	47	14
	2.	0	0	0	0
	3.	1.16	0	33	0
กรุงเทพออก	1.	0.08	1.25	4	29
	2.	0.18	0	10	0
	3.	0	0	0	0
กรุงเทพเหนือ	1.	0.06	0	3	0
กรุงเทพใต้	1.	0.07	0	4	0
	2.	0	0	0	0
ธนบุรีเหนือ	1.	0.08	0	5	0
ธนบุรีใต้	1.	0	0	0	0

จากผลการเปรียบเทียบ ความเข้มข้นของ *Pseudomonas* spp. โดย oxidase test และการวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการ พบว่า มีความสัมพันธ์กับร้อยละ 18 ในขณะที่ ความชุกของ *Pseudomonas* spp. โดย oxidase test และการวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการ มีความสัมพันธ์กันร้อยละ 25 ซึ่งเป็นความสัมพันธ์ในระดับที่ค่อนข้างต่ำ



ภาพที่ 4.2 การเปรียบเทียบความเข้มข้น *Pseudomonas* spp. การตอบสนองของ Oxidase test และการทวนสอบทางห้องปฏิบัติการ



ภาพที่ 4.3 การเปรียบเทียบความชุก *Pseudomonas* spp. การตอบสนองของ Oxidase test และการทวนสอบทางห้องปฏิบัติการ

ข้อสังเกตที่น่าสนใจ คือ ความชุกที่คำนวณได้จากการใช้ oxidase test จะมีความไวมากกว่าความชุกที่วิเคราะห์ได้จากห้องปฏิบัติการ เนื่องจาก ปัญหาที่เกิดขึ้นตลอดการศึกษาวเคราะห์ *Pseudomonas* spp. กล่าวคือ เนื้อสุกรมมีการปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์อื่นในระดับประมาณ 1-2 log cfu/g ซึ่งความเข้มข้นระดับนี้ทำให้เป็นอุปสรรคในการนับจำนวนหรือบดบัง *Pseudomonas* spp. ในระดับความเข้มข้นเดียวกัน (แม้ว่าจะมีการใช้ supplement สำหรับ *Pseudomonas* spp. โดยเฉพาะแล้วก็ตาม) ดังนั้น โดยมากแล้วจึงสามารถนับจำนวน *Pseudomonas* spp. ได้อย่างมั่นใจในระดับตั้งแต่ 3 log cfu/g ขึ้นไป ทำให้มีโอกาสเป็นไปได้มากที่อาจจะมีการปนเปื้อน *Pseudomonas* spp. ในระดับต่ำกว่า 3 log cfu/g ทำให้ความชุกหรือความไวในการแยก *Pseudomonas* spp.ทางห้องปฏิบัติการลดลงไป

ในขณะเดียวกัน ปัญหาที่เกิดขึ้นทางห้องปฏิบัติการกลับไม่เป็นอุปสรรคสำหรับการใช้ test kit เนื่องจาก oxidase test ให้การตอบสนองเฉพาะจุลินทรีย์ที่ให้ผลบวกต่อ oxidase test เท่านั้น และจุลินทรีย์

เสื่อมเนื้อสัตว์สำคัญที่ให้ผลบวก เช่น *Pseudomonas* spp. และ *Klebsiella* spp. ซึ่งตรงกับวัตถุประสงค์ในการใช้ test kit เพื่อประเมินการปนเปื้อนของจุลินทรีย์เสื่อมเนื้อสัตว์

การประเมินความสอดคล้องของแบบจำลอง (model agreement)

การประเมินความสอดคล้องของแบบจำลองในการทำนายค่า (predicted value) นั้นโดยทั่วไปจะเป็นการเปรียบเทียบกับค่าที่สังเกตได้ (observed value) โดยแบบจำลองที่สามารถทำนายค่าได้ใกล้เคียงกับค่าที่สังเกตได้จริงมาก ก็ถือว่าเป็นแบบจำลองที่มีความเหมาะสมในการทำงานที่ดี โดยเครื่องมือหรือดัชนีที่ใช้ในการวัดความเหมาะสมของแบบจำลอง คือ

ค่าความถูกต้อง (Accuracy factor : Af) ค่าความถูกต้องเป็นดัชนีหรือเครื่องมือในการวัดประสิทธิภาพ (performance) ของแบบจำลองในการทำนายค่า (predicted) ให้มีค่าใกล้เคียงหรือสอดคล้องกับค่าที่สังเกตได้จริง (observed) โดยประยุกต์จากการทำนายการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหาร (Ross, 1996) สมการ (4.1)

$$Accuracy\ Factor = 10^{\left(\frac{\sum \log \left[\frac{Predicted}{Observed} \right]}{n} \right)} \quad (4.1)$$

โดย

Predicted คือ ค่าที่คำนวณได้จากแบบจำลอง

Observed คือ ค่าที่ได้จากการสังเกตจริง

n คือ จำนวนค่าที่ใช้ในการเปรียบเทียบ

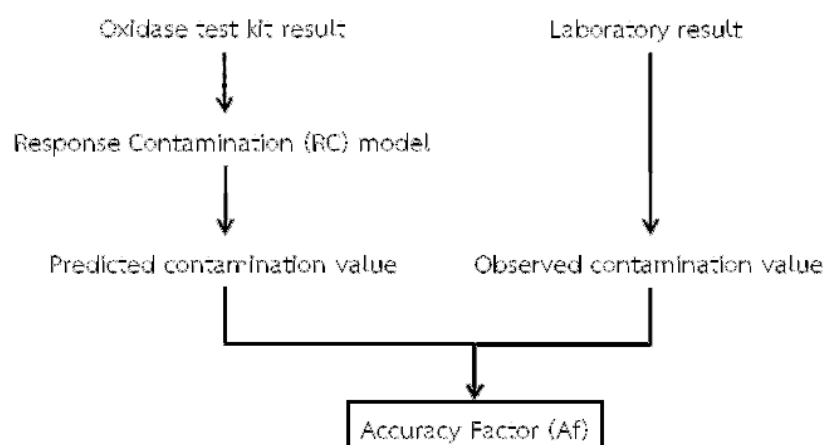
ค่าความถูกต้องจะมีค่าตั้งแต่ 1.0 ขึ้นไป กล่าวคือ แบบจำลองที่ทำนายค่าได้ถูกต้องมากกว่า จะมีค่าความถูกต้องน้อยกว่า ในทางตรงกันข้าม แบบจำลองที่ทำนายค่าได้ถูกต้องน้อยกว่า จะมีค่าความถูกต้องมากกว่า

Af = 1.0 หมายความว่า แบบจำลองให้ค่าทำนายตรงกับค่าที่สังเกตได้ทุกค่าอย่างแม่นยำ

Af = 2.0 หมายความว่า แบบจำลองให้ค่าทำนายสูงกว่าค่าที่สังเกตได้ 2 เท่า

1.3 < Af < 1.5 เป็นช่วงค่าที่ยอมรับได้ของแบบจำลองทำนาย

สมการ RC PS1 เป็นแบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนอง (response contamination model) ที่ใช้ในการดัดแปลงค่าการตอบสนองของ oxidase test kit เป็นการระดับการปนเปื้อน *Pseudomonas* spp. ในเนื้อสุกร (oxidase test kit result) โดยถือว่าเป็นค่าที่ทำนาย (predicted contamination) เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับระดับการปนเปื้อน *Pseudomonas* spp. ที่วิเคราะห์ได้จากห้องปฏิบัติการ (laboratory result) โดยถือว่าเป็นค่าที่สังเกตได้ (observed contamination) เมื่อนำมาคำนวณค่าความถูกต้องของ สมการ RC PS1 หรือแบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนอง ในการทำนายค่าการปนเปื้อน *Pseudomonas* spp. ที่ได้จากห้องปฏิบัติการหรือค่าที่แท้จริงที่ควรจะเป็น (ภาพที่ 4.4)



ภาพที่ 4.4 การใช้ค่าความถูกต้อง (accuracy factor) ในการประเมินความเหมาะสมของแบบจำลองการทำนายค่าปนเปื้อนจาก visual response หรือ oxidase test kit

ผลที่ได้จากการคำนวณค่าความถูกต้องของสมการ RC PS1 ในการทำนายค่าการปนเปื้อนจากผลวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ เท่ากับ 2.0 (ตารางที่ 4.10) หมายความว่า ระดับการปนเปื้อนที่ดัดแปลงจากการใช้ oxidase test kit ให้ค่าที่สูงกว่าการปนเปื้อนจริงประมาณ 2 เท่า

ตารางที่ 4.10 การประเมินความสอดคล้องของแบบจำลองในการทำนาย *Pseudomonas* spp. โดยใช้ค่า accuracy factor (Af)

ระดับการปนเปื้อน <i>Pseudomonas</i> spp. (log cfu/cm ²)		ค่าความแตกต่าง
แบบจำลอง RC PS1	ห้องปฏิบัติการ	
1.21	0.59	0.31
0	0	0
1.16	0	1.06
0.08	1.25	1.22
0.18	0	0.25
0	0	0
0.06	0	0.24
0.07	0	0.16
0	0	0
0.08	0	0.08
0	0	0
Accuracy Factor (Af) =		2.00

4.3.2 ความสอดคล้องของผลของการใช้ Catalase test kit และผลวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการในการปนเปื้อน *Klebsiella* spp.

แบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนอง RC KO1, RC KO2 และ RC KO3 เป็นแบบจำลองที่พัฒนาจากการสร้างความสัมพันธ์ของปริมาณของ *Klebsiella oxytoca* และการตอบสนองของ catalase test อย่างไรก็ตาม เนื่องจาก การนำ catalase test kit ไปใช้จริงในการทดสอบหาระดับการปนเปื้อนในเนื้อสุกรนั้น การตอบสนองที่ได้นั้นมิได้เกิดจากเพียง *Klebsiella oxytoca* เท่านั้น แต่จะเป็นการตอบสนองรวมของ *Klebsiella* spp. ที่ให้ผลบวกกับ catalase test ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงอนุมานว่า การตอบสนองที่เกิดขึ้นจาก catalase test kit เกิดจาก *Klebsiella* spp. โดยรวมทั้งหมด เมื่อนำผลการตอบสนองจากการใช้ catalase test ในการทดสอบเนื้อสุกร โดยอาศัยแบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนอง RC KO1, RC KO2 และ RC KO3

ในการแปลงค่าการตอบสนองของ catalase test ให้ได้เป็นความเข้มข้นของ *Klebsiella* spp. (*Klebsiella oxytoca*) แล้วนำค่าระดับการปนเปื้อนที่คำนวณได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับระดับการปนเปื้อน *Klebsiella* spp. ที่วิเคราะห์ได้จากห้องปฏิบัติการ (ตารางที่ 4.11)

ตารางที่ 4.11 การเปรียบเทียบระดับการปนเปื้อน *Klebsiella* spp. การตอบสนองของ Catalase test และการทดสอบทางห้องปฏิบัติการ

กลุ่มเขตพื้นที่	แบบจำลอง Response contamination				Laboratory result
	RC KO1	RC KO2	RC KO3	RC KO4	
ธนบุรีเหนือ	15.54	40.15	9.06	8.83	5.63
ธนบุรีใต้	12.61	34.35	8.61	8.12	6.06

การประเมินความสอดคล้องของแบบจำลอง (model agreement)

การประเมินความสอดคล้องของแบบจำลองในการทำนายค่า (predicted value) นั้นโดยทั่วไปจะเป็นการเปรียบเทียบกับค่าที่สังเกตได้ (observed value) โดยแบบจำลองที่สามารถทำนายค่าได้ใกล้เคียงกับค่าที่สังเกตได้จริงมาก ก็ถือว่าเป็นแบบจำลองที่มีความเหมาะสมในการใช้งานที่ดี โดยเครื่องมือหรือดัชนีที่ใช้ในการวัดความเหมาะสมของแบบจำลอง คือ

ค่าความถูกต้อง (Accuracy factor : Af) ค่าความถูกต้องเป็นดัชนีหรือเครื่องมือในการวัดประสิทธิภาพ (performance) ของแบบจำลองในการทำนายค่า (predicted) ให้มีค่าใกล้เคียงหรือสอดคล้องกับค่าที่สังเกตได้จริง (observed) โดยประยุกต์จากการทำนายการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหาร (Ross, 1996) สมการ (4.1)

$$Accuracy\ Factor = 10^{\left(\frac{\sum \log \left[\frac{Predicted}{Observed} \right]}{n} \right)} \quad (4.1)$$

โดย

Predicted คือ ค่าที่คำนวณได้จากแบบจำลอง

Observed คือ ค่าที่ได้จากการสังเกตจริง

n คือ จำนวนค่าที่ใช้ในการเปรียบเทียบ

ค่าความถูกต้องจะมีค่าตั้งแต่ 1.0 ขึ้นไป กล่าวคือ แบบจำลองที่ทำนายค่าได้ถูกต้องมากกว่า จะมีค่าความถูกต้องน้อยกว่า ในทางตรงกันข้าม แบบจำลองที่ทำนายค่าได้ถูกต้องน้อยกว่า จะมีค่าความถูกต้องมากกว่า

Af = 1.0 หมายความว่า แบบจำลองให้ค่าทำนายตรงกับค่าที่สังเกตได้ทุกค่าอย่างแม่นยำ

Af = 2.0 หมายความว่า แบบจำลองให้ค่าทำนายสูงกว่าค่าที่สังเกตได้ 2 เท่า

1.3 < Af < 1.5 เป็นช่วงค่าที่ยอมรับได้ของแบบจำลองทำนาย

ผลที่ได้จากการคำนวณค่าความถูกต้องของสมการ RC KO1 – RC KO4 ในการทำนายค่าการปนเปื้อนจากผลวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ (ตารางที่ 4.12) ระหว่าง 1.36-7.13 โดยแบบจำลอง RC KO4 มีค่าความถูกต้องต่ำที่สุด คือ 1.36-1.57

ตารางที่ 4.12 การประเมินความถูกต้องของแบบจำลองในการทำนาย *Klebsiella* spp.

กลุ่มเขตพื้นที่	ค่าความถูกต้อง (Accuracy factor : Af)			
	RC KO1	RC KO2	RC KO3	RC KO4
ธนบุรีเหนือ	2.76	7.13	1.61	1.57
ธนบุรีใต้	2.08	5.67	1.42	1.36

ดังนั้น แบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนองที่เหมาะสมสำหรับการแปลงค่าการตอบสนองของ Catalase เป็นระดับการปนเปื้อน *Klebsiella* spp. ในเนื้อสุกร คือ RC KO4

$$Klebsiella\ oxytoca_4 \left(\log cfu / cm^2 \right) = \frac{BCA - 0.0982}{0.0797} \quad RC\ KO4$$

4.3.3 การปรับค่าพารามิเตอร์ของแบบจำลองการปนเปื้อนจากความเข้มข้น (response contamination model) ของการใช้ Catalase test kit ให้สอดคล้องกับผลวิเคราะห์การปนเปื้อน *Klebsiella* spp. ทางห้องปฏิบัติการ

เพื่อให้สามารถทำนายค่าการปนเปื้อน *Klebsiella* spp. โดยใช้การตอบสนองของ Catalase test kit โดยยึดเอาค่าการปนเปื้อน *Klebsiella* spp. ที่ได้จากห้องปฏิบัติการเป็นค่าที่ถูกต้อง (gold standard) ดังนั้นจึงต้องมีการปรับพารามิเตอร์ (parameter) ของแบบจำลองการปนเปื้อนจากตอบสนอง (response contamination model) จาก RC KO4 ให้ได้ค่าพารามิเตอร์ใหม่ โดยอาศัย Solver ซึ่งเป็น Add-Ins ของ Microsoft Excel โดยปรับค่า parameter ของ RC KO4 ซึ่งประกอบด้วย ความชันของสมการถดถอย (slope : a) และค่าจุดตัดแกน Y (intercept : b) ดังสมการ (4.2)-(4.4) ที่จะให้ค่าระดับการปนเปื้อนที่เท่ากับค่าการปนเปื้อน *Klebsiella* spp. ที่ได้จากห้องปฏิบัติการ (ตารางที่ 4.13-4.14)

$$Y = a + bX \quad (4.2)$$

โดยที่ Y คือ การตอบสนองของการทดสอบ หรือ Bacterial catalase activity (BCA)
 a คือ จุดตัดแกนตั้ง (แกน Y)
 b คือ ความชันของสมการเส้นตรง (slope)
 X คือ ระดับการปนเปื้อนของ *Klebsiella* spp.

เมื่อปรับในรูปของแบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนอง (response contamination model) จะได้เป็น

$$Klebsiella oxytoca \left(\log cfu / cm^2 \right) = \frac{BCA - b}{a} \quad (4.3)$$

โดยที่ BCA คือ ระดับ Bacterial catalase activity (BCA)
 a คือ ความชันของสมการถดถอย (slope)
 b คือ ค่าจุดตัดแกน Y (intercept)

แบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนองต้นแบบก่อนปรับพารามิเตอร์ คือ

$$Klebsiella oxytoca_4 \left(\log cfu / cm^2 \right) = \frac{BCA - 0.0982}{0.0797} \quad (4.4)$$

ตารางที่ 4.13 ค่าพารามิเตอร์ของสมการถดถอยในแบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนอง (RC model) ในการทำนายการปนเปื้อน *Klebsiella* spp. ในเนื้อสุกรจากพื้นที่เขตธนบุรีเหนือ

ก่อนปรับค่า parameter				หลังปรับค่า parameter				Laboratory result
Parameter		Predicted conc.	Log (pred./obs.)	Parameter		Predicted conc.	Log (pred./obs.)	
a	b	8.46	0.21	a	b	5.32	0.06	6.08
0.0797	0.0982	8.01	0.18	0.0952	0.2661	5.83	0.05	6.60
		8.33	0.17			5.21	0.05	5.80
		8.33	0.12			5.32	0.04	5.90
		8.90	0.12			5.90	0.09	4.80
		8.81	0.15			5.90	0.12	4.48
		9.03	0.20			5.69	0.01	5.55
		8.65	0.18			5.61	0.03	5.23
		7.62	0.14			6.07	0.04	5.58
		8.46	0.18			5.52	0.01	5.60
		7.92	0.12			5.08	0.02	5.37
		8.01	0.09			5.32	0.04	5.78
		8.70	0.18			5.61	0.08	6.69
		8.33	0.15			6.07	0.08	7.36
		7.62	0.03			5.69	0.09	6.95
		7.62	0.01			4.79	0.02	5.00
		7.39	0.02			6.07	0.03	5.66
		7.13	0.03			5.83	0.01	5.69
		7.39	0.03			6.12	0.06	5.28
		6.83	0.05			5.87	0.07	6.86
		7.39	0.02			5.52	0.09	6.77
		7.39	0.21			6.07	0.04	6.69
		8.33	0.09			5.52	0.09	6.77
		8.18	0.19			5.96	0.07	5.02
		8.33	0.24			6.07	0.04	6.61
		8.99	0.29			6.12	0.18	4.00
		8.53	0.15			6.07	0.12	4.60
		9.29	0.21			5.08	0.00	5.07
		8.46	0.21			5.32	0.06	6.16
		8.01	0.18			5.61	0.04	5.13
		8.33	0.17			6.02	0.06	5.22
		8.33	0.12			4.87	0.09	5.95
		8.90	0.12			4.79	0.01	4.70
		8.81	0.15			6.07	0.13	4.48
		9.03	0.20			5.32	0.06	6.08
Af = 1.36				Af = 1.14				
ค่าเฉลี่ย		8.12		ค่าเฉลี่ย		5.63		5.63
ความเข้มข้น				ความเข้มข้น				

จากตารางที่ 4.13 จะเห็นได้ว่า พารามิเตอร์ a และ b ใหม่ที่ได้จากการใช้ Solver Add-Ins คือ 0.0952 และ 0.2661 ตามลำดับ สามารถทำให้ลดค่าความถูกต้อง (Af) จาก 1.36 เหลือเพียง 1.14 เท่านั้น และ ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นที่ทำนาย (predicted concentration) ได้มีค่าเท่ากับค่าเฉลี่ยความเข้มข้นที่ได้จากห้องปฏิบัติการ (laboratory result) $5.63 \log \text{cfu/cm}^2$

แบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนองต้นแบบหลังปรับพารามิเตอร์ ของเขตธนบุรีเหนือ ดังสมการ (4.5) คือ

$$Klebsiella\ oxytoca_4 (\log \text{cfu} / \text{cm}^2) = \frac{BCA - (0.2661)}{0.0952} \quad (4.5)$$

ตารางที่ 4.14 ค่าพารามิเตอร์ของสมการถดถอยในแบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนอง (RC model) ในการทำนายการปนเปื้อน *Klebsiella* spp. ในเนื้อสุกรจากพื้นที่เขตธนบุรีใต้

ก่อนปรับค่า parameter				หลังปรับค่า parameter				Laboratory result
Parameter		Predicted conc.	Log (pred./obs.)	Parameter		Predicted conc.	Log (pred./obs.)	
a	b	8.46	0.14	a	b	6.33	0.09	5.17
0.0797	0.0982	9.07	0.14	0.1037	0.1166	5.98	0.05	5.30
		8.33	0.16			6.22	0.05	5.57
		8.46	0.16			6.22	0.01	6.34
		9.15	0.28			6.66	0.00	6.68
		9.15	0.31			6.59	0.02	6.26
		8.90	0.20			6.76	0.08	5.65
		8.81	0.23			6.46	0.05	5.77
		9.35	0.22			5.68	0.01	5.52
		8.70	0.19			6.33	0.05	5.61
		8.18	0.18			5.91	0.00	5.95
		8.46	0.17			5.98	0.03	6.47
		8.81	0.12			6.51	0.05	5.74
		9.35	0.10			6.22	0.03	5.87
		8.90	0.11			5.68	0.09	7.06
		7.83	0.19			5.68	0.14	7.82
		9.35	0.22			5.50	0.15	7.80
		9.07	0.20			5.30	0.15	7.56
		9.41	0.25			5.50	0.10	6.90
		9.11	0.12			5.07	0.18	7.59
		8.70	0.11			5.50	0.11	7.08
		9.35	0.15			5.50	0.08	4.60
Af = 1.57				Af = 1.18				
ค่าเฉลี่ยความเข้มข้น		8.83		ค่าเฉลี่ยความเข้มข้น		6.06		6.06

จากตารางที่ 4.14 จะเห็นได้ว่า พารามิเตอร์ a และ b ใหม่ที่ได้จากการใช้ Solver Add-Ins คือ 0.1037 และ 0.1166 ตามลำดับ สามารถทำให้ลดค่าความถูกต้อง (Af) จาก 1.57 เหลือเพียง 1.18 เท่านั้น และ ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นที่ทำนาย (predicted concentration) ได้มีค่าเท่ากับค่าเฉลี่ยความเข้มข้นที่ได้จากห้องปฏิบัติการ (laboratory result) $6.06 \log \text{cfu/cm}^2$

แบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนองต้นแบบหลังปรับพารามิเตอร์ ของเชตรนบุรีได้ ดังสมการ (4.6) คือ

$$Klebsiella oxytoca \left(\log \text{cfu} / \text{cm}^2 \right) = \frac{BCA - (0.1166)}{0.137} \quad (4.6)$$

เนื่องจาก ค่าพารามิเตอร์ที่ปรับได้นั้น มาจาก 2 กลุ่มเขตพื้นที่ ดังนั้น เพื่อให้เป็นตัวแทนที่เหมาะสม จึงหาค่าเฉลี่ยของพารามิเตอร์ a และ b เท่ากับ 0.0995 และ 0.1914 ตามลำดับ ได้เป็นแบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนอง (RC model) ของ *Klebsiella* spp. (RC KO)

$$Klebsiella oxytoca \left(\log \text{cfu} / \text{cm}^2 \right) = \frac{BCA - (0.1914)}{0.0995} \quad \text{RC KO}$$

=====

บทที่ 5

การใช้การตรวจสอบจุลินทรีย์อย่างรวดเร็วเพื่อการประเมินความเสี่ยง (Rapid test kit for risk assessment)

5.1 ตรวจสอบระดับ *Staphylococcus aureus* ในเนื้อสุกรตลาดสดด้วย test kit (*Staphylococcus aureus* level by test kit)

5.1.1 การใช้ชุดทดสอบหาระดับการตอบสนอง (response) ของแบคทีเรียที่ปนเปื้อน (response result from test kit)

ผลการใช้ชุดทดสอบ (test kits) ในการวัดระดับการตอบสนองของการปนเปื้อน *Staphylococcus aureus* ในเนื้อสุกรในตลาดสดในรอบที่ 2 จำนวนรวม 314 ตัวอย่าง (ตารางที่ 5.1) ด้วย Catalase test ดังแสดงในตารางที่ 5.2

ตารางที่ 5.1 จำนวนตัวอย่างเนื้อสุกรในการเก็บตัวอย่างรอบที่ 2 ในกลุ่มเขตพื้นที่กรุงเทพมหานคร

กลุ่มเขตพื้นที่	ตลาดที่ 1	ตลาดที่ 2	ตลาดที่ 3
กรุงเทพกลาง	36	4	6
กรุงเทพออก	50	10	8
กรุงเทพเหนือ	64	N/A	N/A
กรุงเทพใต้	24	20	N/A
ธนบุรีเหนือ	42	N/A	N/A
ธนบุรีใต้	50	N/A	N/A

N/A : not applicable ไม่มีการเก็บตัวอย่าง

ตารางที่ 5.2 Bacterial catalase activity (BCA) ในเนื้อสุกรในกลุ่มเขตพื้นที่กรุงเทพมหานคร

กลุ่มเขตพื้นที่	% Catalase activity		
	Total catalase activity (mean $\pm$ SD.)	Bacterial catalase activity (mean $\pm$ SD.)	Prevalence (%)
ธนบุรีเหนือ	70 $\pm$ 28	22 $\pm$ 16	86%
ธนบุรีใต้	44 $\pm$ 37	10 $\pm$ 12	59%

5.1.2 แบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนองของชุดทดสอบ (response-contamination model)

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์แบคทีเรียและระดับการตอบสนองของ test kits เบื้องต้น (relationship of Bacterial cells and response) ทำให้ได้แบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนอง (response contamination model) ที่ใช้ในการคำนวณระดับการปนเปื้อนของแบคทีเรียจากระดับการตอบสนองของ test kits ที่ใช้ในการทดสอบคุณภาพของเนื้อสุกรตัวอย่าง (ตารางที่ 5.3)

ตารางที่ 5.3 แบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนอง (response contamination models) ของ Catalase test kits

จุลินทรีย์	Response contamination (RC) model	
<i>Staphylococcus aureus</i>	$Staphylococcus aureus_1 (\log cfu / cm^2) = \frac{BCA - 0.2137}{0.0257}$	RC SA1
	$Staphylococcus aureus_2 (\log cfu / cm^2) = \frac{BCA - 0.146}{0.0185}$	RC SA2
	$Staphylococcus aureus_3 (\log cfu / cm^2) = \frac{BCA + 0.02}{0.121}$	RC SA3
	$Staphylococcus aureus_4 (\log cfu / cm^2) = \frac{BCA - 0.30}{0.047}$	RC SA4
	$Staphylococcus aureus_5 (\log cfu / cm^2) = \frac{BCA + 0.78}{0.213}$	RC SA5

5.1.3 การคำนวณการปนเปื้อนจากแบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนองของชุดทดสอบ (calculating contamination from response-contamination model)

จากผลการใช้ catalase test ที่ได้จากหัวข้อ 5.1.1 การใช้ชุดทดสอบหาระดับการตอบสนอง (response) ของแบคทีเรียที่ปนเปื้อน (response result from test kit) นำไปแทนค่าในแบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนอง (response contamination model)

สมการ RC SA1 ถึง RC SA5 เป็นแบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนองที่พัฒนาจากการสร้างความสัมพันธ์ของปริมาณของทั้ง *Staphylococcus aureus* ต่อการตอบสนองของ catalase test โดยเมื่อนำผลการตอบสนองจากการใช้ catalase test ในการทดสอบเนื้อสุกร โดยอาศัยแบบจำลองสมการ RC KO1 ถึง RC KO5 เพื่อคำนวณได้ระดับการปนเปื้อนของ *Klebsiella* spp. ดังตารางที่ 5.4

ตารางที่ 5.4 ระดับการปนเปื้อน *Staphylococcus aureus* (log cfu/cm²) จากการใช้ Catalase test ทดสอบที่ผิวหน้าเนื้อสุกรในกลุ่มเขตพื้นที่กรุงเทพมหานคร

กลุ่มเขตพื้นที่	แบบจำลอง Response Contamination				
	RC SA1	RC SA2	RC SA3	RC SA4	RC SA5
ธนบุรีเหนือ	6.72	10.43	6.73	10.49	7.39
ธนบุรีใต้	20.31	31.89	6.25	9.26	7.12

5.2 ทวนสอบระดับ *Staphylococcus aureus* ของ test kit โดยการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

(*Staphylococcus aureus* level by laboratory)

หลังจากการเก็บตัวอย่างเนื้อสุกรและทำการตรวจสอบระดับ *Staphylococcus aureus* ในเนื้อสุกรในตลาดสดด้วย test kit แล้วจึงดำเนินการทวนสอบระดับ *Staphylococcus aureus* ของ test kit โดยการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ดังแสดงในตารางที่ 5.5

ตารางที่ 5.5 ผลการทวนสอบระดับ *Staphylococcus aureus* ในเนื้อสุกรทางห้องปฏิบัติการ

กลุ่มเขตพื้นที่	ตลาดที่ 1		ตลาดที่ 2		ตลาดที่ 3	
	Mean [*] ± SD ^{**}	Prev.	mean ± SD	Prev.	mean ± SD	Prev.
กรุงเทพกลาง	2.15 ± 1.80	58%	1.72 ± 2.02	50%	0	0
กรุงเทพออก	1.93 ± 1.93	51%	3.27 ± 2.47	70%	1.98 ± 2.17	50%
กรุงเทพเหนือ	0	0%	N/A		N/A	
กรุงเทพใต้	0	0%	0	0	N/A	
ธนบุรีเหนือ	1.17 ± 1.64	35%	N/A		N/A	
ธนบุรีใต้	2.18 ± 2.15	52%	N/A		N/A	

* ค่าเฉลี่ย (log cfu/cm²)

** standard deviation (log cfu/cm²)

N/A : not applicable ไม่มีการเก็บตัวอย่าง

5.3 การวิเคราะห์ความสอดคล้องของความเสื่อมของเนื้อสุกรจาก test kit และจากห้องปฏิบัติการ

(Agreement of Spoilage by test kit vs. laboratory)

5.3.1 ความสอดคล้องของผลของการใช้ Catalase test kit และผลวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการในการปนเปื้อน *Staphylococcus aureus*

ในการแปลงค่าการตอบสนองของ catalase test ให้ได้เป็นความเข้มข้นของ *Staphylococcus aureus* แล้วนำค่าระดับการปนเปื้อนที่คำนวณได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับระดับการปนเปื้อน *Staphylococcus aureus* ที่วิเคราะห์ได้จากห้องปฏิบัติการ (ตารางที่ 5.6)

ตารางที่ 5.6 การเปรียบเทียบระดับการปนเปื้อน *Staphylococcus aureus* การตอบสนองของ Catalase test และการทวนสอบทางห้องปฏิบัติการ

กลุ่มเขตพื้นที่	แบบจำลอง Response contamination					Laboratory result
	RC SA1	RC SA2	RC SA3	RC SA4	RC SA5	
ธนบุรีเหนือ	22.56	35.00	6.73	10.49	7.39	3.36
ธนบุรีใต้	20.31	31.89	6.25	9.26	7.12	4.23

การประเมินความสอดคล้องของแบบจำลอง (model agreement)

การประเมินความสอดคล้องของแบบจำลองในการทำนายค่า (predicted value) นั้นโดยทั่วไปจะเป็นการเปรียบเทียบกับค่าที่สังเกตได้ (observed value) โดยแบบจำลองที่สามารถทำนายค่าได้ใกล้เคียงกับค่าที่สังเกตได้จริงมาก ก็ถือว่าเป็นแบบจำลองที่มีความเหมาะสมในการใช้งานที่ดี โดยเครื่องมือหรือดัชนีที่ใช้ในการชี้วัดความเหมาะสมของแบบจำลอง คือ

ค่าความถูกต้อง (Accuracy factor : Af) ค่าความถูกต้องเป็นดัชนีหรือเครื่องมือในการวัดประสิทธิภาพ (performance) ของแบบจำลองในการทำนายค่า (predicted) ให้มีค่าใกล้เคียงหรือสอดคล้องกับค่าที่สังเกตได้จริง (observed) ดังสมการ (5.1) โดยประยุกต์จากการทำนายการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหาร (Ross, 1996)

$$Accuracy\ Factor = 10^{\left(\frac{\sum \left| \log \left[\frac{Predicted}{Observed} \right] \right|}{n} \right)} \quad (5.1)$$

โดย

Predicted คือ ค่าที่คำนวณได้จากแบบจำลอง

Observed คือ ค่าที่ได้จากการสังเกตจริง

n คือ จำนวนค่าที่ใช้ในการเปรียบเทียบ

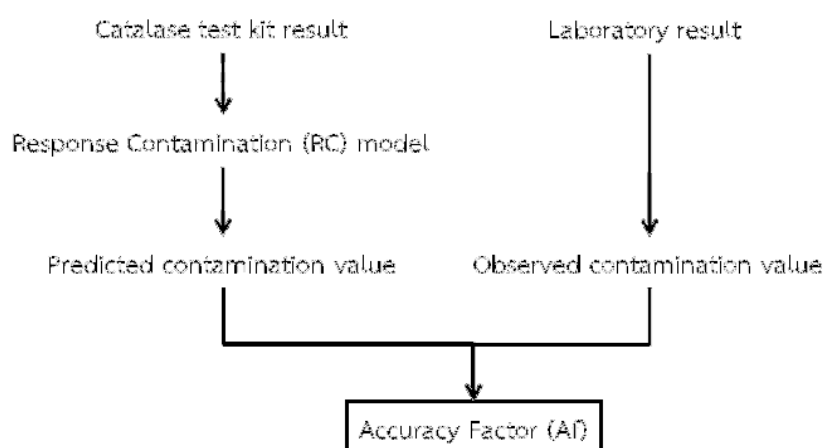
ค่าความถูกต้องจะมีค่าตั้งแต่ 1.0 ขึ้นไป กล่าวคือ แบบจำลองที่ทำนายค่าได้ถูกต้องมากกว่า จะมีค่าความถูกต้องน้อยกว่า ในทางตรงกันข้าม แบบจำลองที่ทำนายค่าได้ถูกต้องน้อยกว่า จะมีค่าความถูกต้องมากกว่า

$Af = 1.0$ หมายความว่า แบบจำลองให้ค่าทำนายตรงกับค่าที่สังเกตได้ทุกค่าอย่างแม่นยำ

$Af = 2.0$ หมายความว่า แบบจำลองให้ค่าทำนายสูงกว่าค่าที่สังเกตได้ 2 เท่า

$1.3 < Af < 1.5$ เป็นช่วงค่าที่ยอมรับได้ของแบบจำลองทำนาย

แบบจำลอง RC SA1 - RC SA5 เป็นแบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนอง (response contamination model) ที่ใช้ในการดัดแปลงค่าการตอบสนองของ catalase test kit เป็นการระดับการปนเปื้อน *Staphylococcus aureus* ในเนื้อสุกร (catalase test kit result) โดยถือว่าเป็นค่าที่ทำนาย (predicted contamination) เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับระดับการปนเปื้อน *Staphylococcus aureus* ที่วิเคราะห์ได้จากห้องปฏิบัติการ (laboratory result) โดยถือว่าเป็นค่าที่สังเกตได้ (observed contamination) เมื่อนำมาคำนวณค่าความถูกต้องของ สมการ RC SA1 – RC SA5 หรือแบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนอง ในการทำนายค่าการปนเปื้อน *Staphylococcus aureus* ที่ได้จากห้องปฏิบัติการหรือค่าที่แท้จริงที่ควรจะเป็น (ภาพที่ 5.1)



ภาพที่ 5.1 การใช้ค่าความถูกต้อง (accuracy factor) ในการประเมินความเหมาะสมของแบบจำลองการทำนายค่าปนเปื้อนจาก visual response หรือ catalase test kit

ผลที่ได้จากการคำนวณค่าความถูกต้องของสมการ RC SA1 – RC SA5 ในการทำนายค่าการปนเปื้อนจากผลวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ (ตารางที่ 5.7) ระหว่าง 1.49-10.43 โดยแบบจำลอง RC SA3 มีค่าความถูกต้องต่ำที่สุด คือ 1.49-2.0

ตารางที่ 5.7 การประเมินความถูกต้องของแบบจำลองในการทำนาย *Staphylococcus aureus*

กลุ่มเขตพื้นที่	ค่าความถูกต้อง (Accuracy factor : Af)				
	RC SA1	RC SA2	RC SA3	RC SA4	RC SA5
ธนบุรีเหนือ	6.72	10.43	2.00	3.13	2.20
ธนบุรีใต้	4.85	7.62	1.49	2.21	1.70

ดังนั้น แบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนองที่เหมาะสมสำหรับการแปลงค่าการตอบสนองของ Catalase เป็นระดับการปนเปื้อน *Staphylococcus aureus* ในเนื้อสุกร คือ RC SA3

$$Staphylococcus aureus_3 (\log cfu / cm^2) = \frac{BCA + 0.02}{0.121} \quad RC SA3$$

5.3.2 ความสอดคล้องของความเสี่ยง (risk estimate) ของการใช้ Catalase test kit และ ผลวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการในการปนเปื้อน *Staphylococcus aureus*

ในการแปลงค่าการตอบสนองของ catalase test ให้ได้เป็นความเข้มข้นของ *Staphylococcus aureus* แล้วนำค่าระดับการปนเปื้อนที่คำนวณเป็นค่าประมาณความเสี่ยง (risk estimate) มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับค่าประมาณความเสี่ยงจากระดับการปนเปื้อน *Staphylococcus aureus* ที่วิเคราะห์ได้จากห้องปฏิบัติการ (ตารางที่ 5.8-5.10)

ตารางที่ 5.8 การเปรียบเทียบความเสี่ยงในการเจ็บป่วยจากการบริโภคผลิตภัณฑ์สุกรที่ปนเปื้อนด้วย *Staphylococcus aureus* ต่อวัน (Daily risk) จากผลการตอบสนองของ Catalase test และการทวนสอบทางห้องปฏิบัติการ

กลุ่มเขตพื้นที่	แบบจำลอง Response contamination					Laboratory result
	RC SA1	RC SA2	RC SA3	RC SA4	RC SA5	
ธนบุรีเหนือ	5.9×10^{-1}	5.9×10^{-1}	5.5×10^{-4}	2.8×10^{-1}	4.5×10^{-3}	4.0×10^{-6}
ธนบุรีใต้	8.6×10^{-1}	8.6×10^{-1}	7.4×10^{-3}	8.6×10^{-1}	2.3×10^{-2}	4.1×10^{-6}

ตารางที่ 5.9 การเปรียบเทียบความเสี่ยงในการเจ็บป่วยจากการบริโภคผลิตภัณฑ์สุกรที่ปนเปื้อนด้วย *Staphylococcus aureus* ต่อปี (Annual risk) จากผลการตอบสนองของ Catalase test และการทวนสอบทางห้องปฏิบัติการ

กลุ่มเขตพื้นที่	แบบจำลอง Response contamination					Laboratory result
	RC SA1	RC SA2	RC SA3	RC SA4	RC SA5	
ธนบุรีเหนือ	1.0	1.0	1.8×10^{-1}	1.0	8.1×10^{-1}	1.5×10^{-3}
ธนบุรีใต้	1.0	1.0	9.1×10^{-1}	1.0	1.5×10^{-6}	9.1×10^{-7}

ตารางที่ 5.10 การเปรียบเทียบอัตราการเจ็บป่วยจากการบริโภคผลิตภัณฑ์สุกรที่ปนเปื้อนด้วย *Staphylococcus aureus* ต่อแสนคนต่อปี (Annual risk rate) จากผลการตอบสนองของ Catalase test และการทวนสอบทางห้องปฏิบัติการ

กลุ่มเขตพื้นที่	แบบจำลอง Response contamination					Laboratory result
	RC SA1	RC SA2	RC SA3	RC SA4	RC SA5	
ธนบุรีเหนือ	100,000	100,000	18,172	100,000	80,995	147
ธนบุรีใต้	100,000	100,000	93,259	100,000	99,981	151

5.3.3 การปรับค่าพารามิเตอร์ของแบบจำลองการปนเปื้อนจากความเข้มข้น (response contamination model) ของการใช้ Catalase test kit ให้สอดคล้องกับผลวิเคราะห์การปนเปื้อน *Staphylococcus aureus* ทางห้องปฏิบัติการ

เพื่อให้สามารถทำนายค่าการปนเปื้อน *Staphylococcus aureus* โดยใช้การตอบสนองของ Catalase test kit โดยยึดเอาค่าการปนเปื้อน *Staphylococcus aureus* ที่ได้จากห้องปฏิบัติการเป็นค่าที่ถูกต้อง (gold standard) ดังนั้น จึงต้องมีการปรับพารามิเตอร์ (parameter) ของแบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนอง (response contamination model) จาก RC SA3 ให้ได้ค่าพารามิเตอร์ใหม่ โดยอาศัย Solver ซึ่งเป็น Add-Ins ของ Microsoft Excel โดยปรับค่า parameter ของ RC SA3 ซึ่งประกอบด้วย ความชันของสมการถดถอย (slope : a) และค่าจุดตัดแกน Y (intercept : b) ดังสมการ (5.2)-(5.4) ที่จะให้ค่าระดับการปนเปื้อนที่เท่ากับค่าการปนเปื้อน *Staphylococcus aureus* ที่ได้จากห้องปฏิบัติการ (ตารางที่ 5.11-5.12)

$$Y = a + bX \quad (5.2)$$

โดยที่ Y คือ การตอบสนองของการทดสอบ หรือ Bacterial catalase activity (BCA)
 a คือ จุดตัดแกนตั้ง (แกน Y)
 b คือ ความชันของสมการเส้นตรง (slope)
 X คือ ระดับการปนเปื้อนของ *Staphylococcus aureus*

เมื่อปรับในรูปของแบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนอง (response contamination model) จะได้เป็น

$$\text{Staphylococcus aureus } (\log \text{ cfu} / \text{cm}^2) = \frac{BCA - b}{a} \quad (5.3)$$

โดยที่ BCA คือ ระดับ Bacterial catalase activity (BCA)
 a คือ ความชันของสมการถดถอย (slope)
 b คือ ค่าจุดตัดแกน Y (intercept)

แบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนองต้นแบบก่อนปรับพารามิเตอร์ คือ

$$\text{Staphylococcus aureus}_3 (\log \text{ cfu} / \text{cm}^2) = \frac{BCA - (-0.02)}{0.121} \quad (5.4)$$

ตารางที่ 5.11 ค่าพารามิเตอร์ของสมการถดถอยในแบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนอง (RC model) ในการทำนายการปนเปื้อนพื้นที่เขตธนบุรีเหนือ

ก่อนปรับค่า parameter				หลังปรับค่า parameter				Laboratory result
Parameter		Predicted conc.	Log (pred./obs.)	Parameter		Predicted conc.	Log (pred./obs.)	
a	b	6.55	0.26	a	b	3.26	0.04	3.60
0.121	-0.02	6.95	0.24	0.213	0.073	3.49	0.06	4.04
		6.55	0.28			3.26	0.03	3.48
		6.55	0.26			3.26	0.04	3.60
		6.84	0.29			3.43	0.01	3.48
		6.13	0.31			3.03	0.00	3.00
		7.14	0.33			3.59	0.04	3.30
		6.98	0.37			3.50	0.07	3.00
		7.14	0.38			3.59	0.08	3.00
		6.71	0.35			3.35	0.05	3.00
		7.14	0.38			3.59	0.08	3.00
		6.13	0.19			3.03	0.12	4.00
Af = 2.0				Af = 1.13				
ค่าเฉลี่ย		6.73		ค่าเฉลี่ย		3.36		3.36
ความเข้มข้น			ความเข้มข้น					

จากตารางที่ 5.11 จะเห็นได้ว่า พารามิเตอร์ a และ b ใหม่ที่ได้จากการใช้ Solver Add-Ins คือ 0.213 และ 0.073 ตามลำดับ สามารถทำให้ลดค่าความถูกต้อง (Af) จาก 2.00 เหลือเพียง 1.13 เท่านั้น และค่าเฉลี่ยความเข้มข้นที่ทำนาย (predicted concentration) ได้มีค่าเท่ากับค่าเฉลี่ยความเข้มข้นที่ได้จากห้องปฏิบัติการ (laboratory result) 3.36 log cfu/cm²

แบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนองต้นแบบหลังปรับพารามิเตอร์ ของเขตธนบุรีเหนือ ดังสมการ (5.5) คือ

$$Staphylococcus aureus_3 (\log cfu / cm^2) = \frac{BCA - (0.073)}{0.213} \quad (5.5)$$

ตารางที่ 5.12 ค่าพารามิเตอร์ของสมการถดถอยในแบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนอง (RC model) ในการทำนายการปนเปื้อนพื้นที่เขตธนบุรีใต้

ก่อนปรับค่า parameter				หลังปรับค่า parameter				Laboratory result
Parameter		Predicted conc.	Log (pred./obs.)	Parameter		Predicted conc.	Log (pred./obs.)	
a	b	6.93	0.20	a	b	4.74	0.04	4.32
0.121	-0.02	6.67	0.16	0.161	0.055	4.55	0.00	4.57
		6.00	0.13			4.04	0.04	4.43
		6.55	0.19			4.46	0.03	4.19
		6.20	0.15			4.19	0.02	4.36
		6.25	0.13			4.23	0.04	4.63
		6.71	0.15			4.57	0.02	4.75
		6.46	0.03			4.39	0.14	6.03
		6.00	0.18			4.04	0.01	3.95
		6.00	0.20			4.04	0.03	3.78
		5.85	0.16			3.93	0.01	4.04
		5.67	0.16			3.80	0.02	3.95
		5.48	0.20			3.65	0.02	3.48
		5.85	0.25			3.93	0.08	3.30
		6.59	0.22			4.49	0.05	4.00
		7.10	0.27			4.87	0.10	3.85
Af = 2.00				Af = 1.13				
ค่าเฉลี่ย		6.25		ค่าเฉลี่ย		4.23		4.23
ความเข้มข้น				ความเข้มข้น				

จากตารางที่ 5.12 จะเห็นได้ว่า พารามิเตอร์ a และ b ใหม่ที่ได้จากการใช้ Solver Add-Ins คือ 0.161 และ 0.055 ตามลำดับ สามารถทำให้ลดค่าความถูกต้อง (Af) จาก 1.49 เหลือเพียง 1.10 เท่านั้น และค่าเฉลี่ยความเข้มข้นที่ทำนาย (predicted concentration) ได้มีค่าเท่ากับค่าเฉลี่ยความเข้มข้นที่ได้จากห้องปฏิบัติการ (laboratory result) 4.23 log cfu/cm²

แบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนองต้นแบบหลังปรับพารามิเตอร์ ของเขตธนบุรีใต้ ดังสมการ (5.6) คือ

$$Staphylococcus aureus_3 (\log cfu / cm^2) = \frac{BCA - (0.055)}{0.161} \quad (5.6)$$

เนื่องจาก ค่าพารามิเตอร์ที่ปรับได้นั้น มาจาก 2 กลุ่มเขตพื้นที่ ดังนั้น เพื่อให้เป็นตัวแทนที่เหมาะสม จึงหาค่าเฉลี่ยของพารามิเตอร์ a และ b เท่ากับ 0.1878 และ 0.0640 ตามลำดับ ได้เป็นแบบจำลองการปนเปื้อนจากการตอบสนอง (RC model) ของ *Staphylococcus aureus* (RC SA)

$$\text{Staphylococcus aureus } (\log \text{ cfu / cm}^2) = \frac{BCA - (0.0640)}{0.1878} \quad \text{RC SA}$$

ตารางที่ 5.11 การเปรียบเทียบอัตราการเจ็บป่วยจากการบริโภคผลิตภัณฑ์สุกรที่ปนเปื้อนด้วย *Staphylococcus aureus* ต่อแสนคนต่อปี (Annual risk rate) จากผลการตอบสนองของ Catalase test และการทวนสอบทางห้องปฏิบัติการ โดยใช้แบบจำลองที่ปรับค่าพารามิเตอร์แล้ว

กลุ่มเขตพื้นที่	แบบจำลอง Response contamination	Laboratory result
	RC SA	
ธนบุรีเหนือ	147*	147
ธนบุรีใต้	151**	151

* คำนวณจากสมการ 5.5

** คำนวณจากสมการ 5.6

=====

บทที่ 6

ความสามารถในการประเมินความเสี่ยง (Risk assessment capacity building)

เจ้าหน้าที่สำนักงานสัตวแพทยศาสตร์จันทบุรี สำนักงานมาย ผ่านการอบรมเรื่อง “การวิเคราะห์ความเสี่ยงอาหาร” และ “การประเมินความเสี่ยงเชิงปริมาณ” วันที่ 10 สิงหาคม พ.ศ. 2559 ณ สำนักงานสัตวแพทยศาสตร์จันทบุรี เขตคลองเตย กรุงเทพมหานคร จำนวน 12 คน ประกอบด้วย

- | | |
|---------------------|----------------|
| 1. น.สพ.ประทีป | ลิปานนท์ |
| 2. น.สพ.พิสิทธิ์ | จันละคร |
| 3. สพ.ญ.เพ็ญแข | ตานสานสินทร์ |
| 4. น.สพ.ภัทรพงศ์ | จันทรเจริญ |
| 5. น.สพ.เลอพงษ์ | รัตนทัศนีย์ |
| 6. น.สพ.ศรัณรัตน์ | บัวชุม |
| 7. น.สพ.สมภาพ | ฉัตรภรณ์ |
| 8. สพ.ญ.เสธินี | บุญยงค์ |
| 9. น.สพ.อัจฉริยจร | อนันต์นัย |
| 10. น.สพ.สิทธิชัย | พงศ์เกษตรศิลป์ |
| 11. น.สพ.สมชาย | เจียรนาราโรจน์ |
| 12. น.สพ.นุศรศักดิ์ | อุสาพรหม |





=====

บทที่ 7

เอกสารอ้างอิง

(References)

- AESR (Annual Epidemiological Surveillance Report) 2011. Bureau of Epidemiology. National Trustworthy and Competent Authority in Epidemiological Surveillance and Investigation, Thai Veteran support Organization (Under Royal Patronage) Publishing, Bangkok. ISBN 0857 – 6521
- AESR (Annual Epidemiological Surveillance Report) 2012. Bureau of Epidemiology. National Trustworthy and Competent Authority in Epidemiological Surveillance and Investigation, Thai Veteran support Organization (Under Royal Patronage) Publishing, Bangkok.
- Ananchaipattana, C., Hosotani, Y., Kawasaki, S., Pongsawat, S., Md.Latiful, B., Isobe, S. and Inatsu, Y. 2012. Prevalence of Foodborne Pathogens in Retailed Foods in Thailand. Foodborne Pathogens and Disease. September 9(9): 835-840
- Anukool, U. 2013. Community- and livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* : a silent threat to Thai public health. Bulletin Chiang Mai Associated Medical Sciences. 46(3) : 187-206.
- Bacteriological analytical manual (BAM) 2001. *Staphylococcus aureus* : Chapter 12 : US. FDA.<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071429.htm>
- Betts, R. 1999. Analytical microbiology–into the next millenium. New Food 2 : 9-16.
- Blackburn, C. 2006. Food spoilage microorganisms. Woodhead publishing limited. Cambridge, England ISBN 978-0849391569.
- Bruhn, J., Christensen, A., Flodgaard, L., Nielsen, K., Larsen, T., Givskov, M. and Gram, L. 2004. Presence of Acylated Homoserine Lactones (AHLs) and AHL-Producing Bacteria in Meat and Potential Role of AHL in Spoilage of Meat . Appl. Environ. Microbiol. 70(7): 4293-4302
- Byun, J.S., Min, J.S.; Kim, I.S., Kim, J.W., Chung, M.S. and Lee, M. 2003. Comparison of Indicators of Microbial Quality of Meat during Aerobic Cold Storage. Journal of Food Protection, 9 (5) : 1733-1737.

- Chester, B. and Moskowitz, Lee. 1987. Rapid Catalase Supplemental Test for Identification of Members of the Family *Enterobacteriaceae* J. of Clinical Microbiology 25 (2) : 439-441
- Craven, M., Gardner, J. and Bartlett, P. 1996. Electronic noses — development and future prospects. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 15(9): 486–493.
- Daniel, W.W., 1987. Biostatistics: A foundation for analysis in the Health Sciences John Wiley and Sons. Inc, New York.
- Di Natale, C., Macagnano, A., Davide, F., D'Amico, A., Paolesse, R., Boschi, T., Faccio, M. and Ferri, G. 1997. An electronic nose for food analysis. Sensors and Actuators B: Chemical. 44 (1-3) : 521-526.
- D'Souza, S. 2001. Microbial biosensors. Biosensors and Bioelectronics. 16 (6) : 337–353.
- Ellis, D. and Goodacre, R. 2001. Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of muscle foods: current status and future trends. Trends in Food Science & Technology. 12(11) : 414-424.
- Ellis, D., Broadhurst, D., Kell, D. and Goodacre, R., 2004. Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of beef by Fourier transform infrared spectroscopy and machine learning. Analytica Chimica Acta. 514(2) : 193–201.
- Ellis, D., Broadhurst, D., Kell, D., Rowland, J. and Goodacre, R., 2002. Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of meat by Fourier transform infrared spectroscopy and machine learning. Appl. Environ. Microbiol. 68(6) : 2822-2828.
- European Food Safety Authority (EFSA) 2014. Technical specifications on randomised sampling for harmonised monitoring of antimicrobial resistance (AMR) in zoonotic and commensal bacteria. EFSA Journal No.3686.
- Fontana Jr., A.F., Senior Research Scientist, Decagon Devices, Inc. Understanding Water Activity for Reduced Microbial Testing Using USP Method <1112> AN-13428-01
- Fujikawa, H. and Morozumi, S. 2006. Modeling *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in milk. Food Microbiology 23(3) : 260–267.
- Fung, D.Y. and Petrishko, D.T., 1973. Capillary tube catalase test. Applied microbiology, 26(4), p.631.
- Gaby, W. L., and C. Hadley. 1957. Practical laboratory test for the identification of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 74:356–358.
- Gardner, J. and Bartlett, P. 1994. A brief history of electronic noses. Sensors and Actuators B: Chemical. 18(1–3) : 210–211.

- Gibson, D.M., 2001. Conductance/impedance techniques for microbial assay. Instrumentation and Sensors for the Food On-line measurement of product quality in dairy processing, 289, pp.485-517.
- Gill, C.O. and Greer, G.G. 1993. Enumeration and identification of meat spoilage bacteria. Technical Bulletin 1993-8E. ©Minister of Supply and Services Canada. Cat. No. 54-8/1993-8E ISBN 0-662-20963-X
- Gordon, J., and J. W. McLeod. 1928. The practical application of the direct oxidase reaction in bacteriology. J. Pathol. Bacteriol. 31:185–190.
- Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J., Christensen, A. and Givskov, M. 2002. Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. International Journal of Food Microbiology. 78(1–2) : 79–97.
- Gundogan, N. and Devren, A. 2010. Protease and lipase activity of *Staphylococcus aureus* obtained from meat, chicken and meatball samples. Gazi University Journal of Science. 23(4) : 381-384.
- Harintharanon, T., Korthammarit, K. and Nuanualsuwan. 2014. Final report : Antimicrobial resistance quantitative risk assessment of *E.coli*, *K.oxytoca* and *Salmonella* spp. in pork product. pp.136.
- Heidinger, J.C., Winter, C.K. and Cullor, J.S., 2009. Quantitative microbial risk assessment for *Staphylococcus aureus* and Staphylococcus enterotoxin A in raw milk. Journal of Food protection, 72(8), pp.1641-1653.
- Heinz, G. and Hautzinger, P. 2007. Meat processing technology for small-to medium-scale procedures. RAP publication 2007/20.
- Jabbar, H. and Joishy, K. 1999. Rapid Detection of *Pseudomonas* in Seafoods Using Protease Indicator. Journal of Food Science. 64(3) : 547–549.
- Jasass, B., Fahad, M., & Fung, D. Y. (1998). Catalase activity as an index of microbial load and end-point cooling temperature of fish. Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology, 6(3), 159-197.
- Jay, M. 1996. Modern food microbiology. Chapman & Hall 5th edition. ISBN 9780412076916 pp. 661.
- Jukna, V., Jukna, Č. and Pečiulaitien, N., 2012. Electrical conductivity of pig meat and its relation with quality. Veterinarija ir Zootechnika, 57(79).

- Jurtshuk, P. and McQuitty, D., 1976. Survey of Oxidase-Positive and -Negative Bacteria Using a Quantitative Kovacs Oxidase Test. *International J. of Systematic Bacteriology*, 26 (2) : 127-135
- Käsbohrer, A., Tenhagen, B., Appel, B. and Fetsch, A. 2010. Development of harmonised survey methods for food-borne pathogens in foodstuffs in the European Union. Scientific report submitted to EFSA. EFSA Journal No.83.
- Koutsoumanis, K., Stamatiou, A., Drosinos, E. and Nychas, G. 2008. Control of spoilage microorganisms in minced pork by a self-developed modified atmosphere induced by the respiratory activity of meat microflora. *Food Microbiology*. 25(7) : 915–921.
- Kovács, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature* (London) 178::703.
- Lee, H., Kim, K., Choi, K and Yoon, Y. 2015. Quantitative microbial risk assessment for *Staphylococcus aureus* in natural and processed cheese in Korea. *J. Dairy Sci.* 98 :5931–5945.
- McKellar, R. and Lu, X. 2003. Modeling microbial responses in food. CRC Press. Boca Rayton. ISBN 9780849312373 pp. 360.
- Nuanualsuwan, S. 2006. Food safety. Trironasan Publishing Limited. Bangkok. ISBN 974-9993-82-9 pp. 715
- OIE. 2004. Handbook on Import Risk Analysis for Animals and Animals products - Volume I-II. Introduction and qualitative risk analysis ISBN : 92-9044-629-3 Vol.1 ISBN 92-9044-613-7 Vol.2 ISBN 92-9044-626-9.
- Pyle, B., Broadaway, S. and McFeters, G. 1999. Sensitive Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in Food and Water by Immunomagnetic Separation and Solid-Phase Laser Cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(5) : 1966-1972.
- Ross, T., 1996. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Journal of Applied Bacteriology*, 81(5), pp.501-508.
- Schelin, J., Wallin-Carlquist, N., Cohn, M., Lindqvist, R., Barker, G. and Radstrom, P. 2011. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence*. 2(6) : 580–592.
- Seymour, I., Cole, M. and Coote, P. 1994. A substrate-mediated assay of bacterial proton efflux/influx to predict the degree of spoilage of beef mince stored at chill temperatures. *Journal of Applied Bacteriology* 76(6) : 608–615.

- Shaw, B. and Latty, J. 1984. A study of the relative incidence of different *Pseudomonas* groups on meat using a computer-assisted identification technique employing only carbon source tests. *Journal of applied microbiology*. 57(1) : 59-67.
- Shaw, G., Harding, C., Hudson, H. and Farr, L. 1987. Rapid estimation of microbial numbers on meat and poultry by the direct epifluorescent filter technique. *Journal of food protection* 50(8) : 652–657.
- Siragusa, G., Dorsa, W., Cutter, C., Perino, L. and Koohmaraie, M. Use of a newly developed rapid microbial ATP bioluminescence assay to detect microbial contamination on poultry carcasses. *J Biolumin Chemilumin* 11: 297-301.
- Soejima, T., Nagao, E., Yano, Y., Yamagata, H., Kagi, H. and Shinagawa, K. 2007. Risk evaluation for staphylococcal food poisoning in processed milk produced with skim milk powder. *International Journal of Food Microbiology* 115(1) : 29–34.
- Thomas, D, Chou, S., Dauwalder, O. and Lina, G. 2007. Diversity in *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Chem Immunol Allergy*. 93: 24-41.
- Venkitanarayanan, S., Faustman, C., Crivello, F., Hoagland, A. and Berry W. 1997. Estimation of spoilage bacterial load on meat by fluorescein diacetate hydrolysis or Resazurin reduction. *Journal of Food Science*. 62(3) : 601–604.
- Venkitanarayanan, S., Faustman, C., Crivello, F., Khan, I., Hoagland, A. and Berry W. 1997. Rapid estimation of spoilage bacterial load in aerobically stored meat by a quantitative polymerase chain reaction. *J Appl Microbiol*. 82(3) :359-64.
- Vestergaard, M., Cavaco, L., Sirichote, P., Unahalekhaka, A., Dangsakul, W., Svendsen, C., Aarestrup, F. and Hendriksen, R. 2012. SCCmectype IX element in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* spa type t337 (CC9) isolated from pigs and pork in Thailand. *Frontier in Microbiology* 3:1-4.
- World Food Summit 1996, Rome Declaration on World Food Security.
- Yano, Y., Yokoyama, K., Tamiya, E. and Karube, I. 1996. Direct evaluation of meat spoilage and the progress of aging using biosensors. *Analytica Chimica Acta*. 320(2–3) : 269–276.
- Zschöck, M., Botzler, D., Blöcher, S., Sommerhäuser, L. and Hamann, H. 2000. Detection of genes for enterotoxins (ent) and toxic shock syndrome toxin-1 (tst) in mammary isolates of *Staphylococcus aureus* by polymerase-chain-reaction. *International Dairy Journal*. 10 (8) : 569–574.

บทที่ 8

ภาคผนวก

(Appendix)

วิธีการใช้ชุดทดสอบ

วัสดุและอุปกรณ์ (ภาพที่ A.1)

- กระดาษกรอง WhatmanTM No.1 ตัดเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัสให้มีขนาดมาตรฐาน 1" x 1"
- กระบอกฉีดยาขนาด 3 มิลลิลิตร (syringe)
- ครอบปลายกระบอกฉีดยา (syringe cap)
- ปากคีบ (forceps) สำหรับหยิบจับกระดาษกรอง
- สารละลาย hydrogen peroxide ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร



ภาพที่ A.1 การเตรียมอุปกรณ์ในการทดสอบ

วิธีการทดสอบ

- เก็บตัวอย่างเนื้อสุกร (ส่วนสันนอก) จากเชียงใหม่ตลาดสด (ภาพที่ A.2)



ภาพที่ A.2 เนื้อสุกรสำหรับการทดสอบ

- กระดาษกรอง WhatmanTM No.1 ตัดเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัสให้มีขนาดมาตรฐาน 1" x 1" นำไปวางบนผิวหน้าตัดเนื้อสุกร (ภาพที่ A.3 และ A.4)

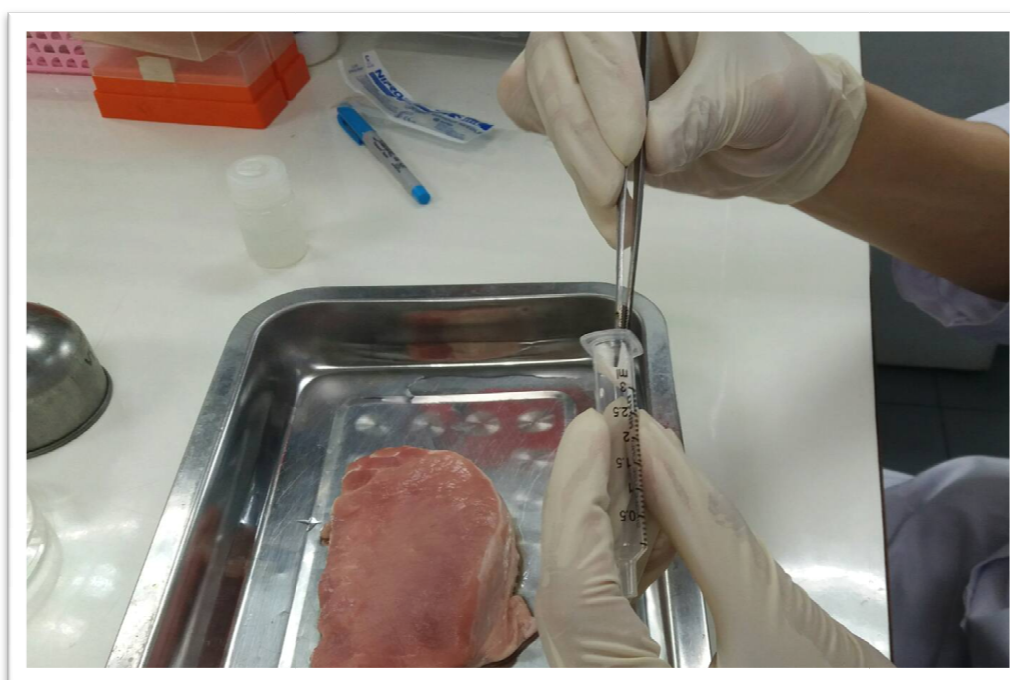


ภาพที่ A.3 ใช้ปากคีบจับกระดาษกรอง



ภาพที่ A.4 การหากระดาศกรองบนผิวเนื้อสุกร

- รอสักครู่เพื่อให้กระดาศดูดซับจุลินทรีย์ขึ้นมาติดบนผิวหน้าของกระดาศกรอง
- ใช้ปากคีบ (forceps) หนีบลอกกระดาศกรองออกจากผิวหน้าตัดเนื้อสุกร
- พับกระดาศกรองบรรจุลงในกระบอกฉีดยา (barrel) ทางด้านตรงข้ามกับปลายเข็มฉีดยาและประกอบแกนฉีดยา (plunger) เข้ากับกระบอกฉีดยา ขนาด 3 มล. (ภาพที่ A.5)

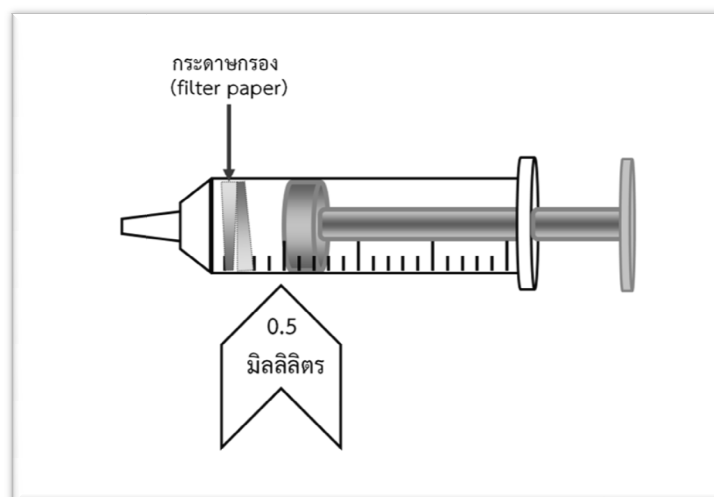


ภาพที่ A.5 พับกระดาศกรองบรรจุลงในกระบอกฉีดยา (barrel) ทางด้านตรงข้ามกับปลายเข็มฉีดยา

- ดูดสารละลาย hydrogen peroxide เข้ามาในกระบอกฉีดยาโดยให้ปลายแกนฉีดยาอยู่ที่ขีด 0.5 มิลลิลิตร (ภาพที่ A.6 และ A.7)



ภาพที่ A.6 ดูดสารละลาย hydrogen peroxide เข้ามาในกระบอกฉีดยา



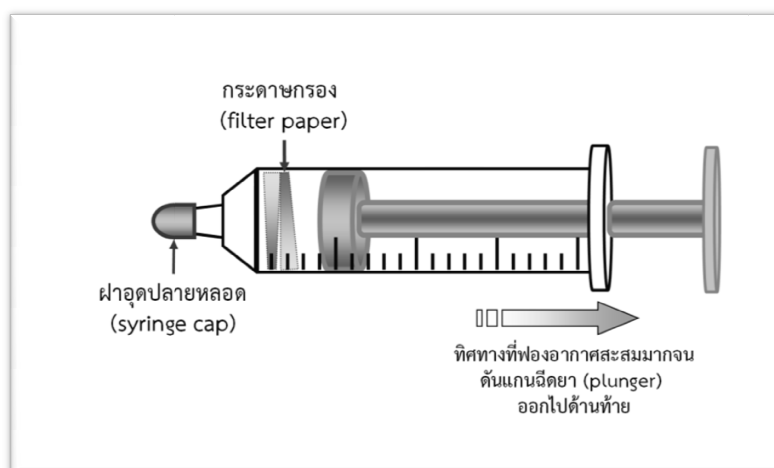
ภาพที่ A.7 ดูดสารละลายให้ปลายแกนฉีดยาอยู่ที่ขีด 0.5 มิลลิลิตร (และ A.7)

- ครอบปลายด้านเข็มฉีดยาทันที เพื่อป้องกันมิให้สารละลายหรือฟองอากาศรั่วไหลออกจากกระบอก (ภาพที่ A.8)



ภาพที่ A.8 กรอบปลายด้านเข็มฉีดยา เพื่อป้องกันมิให้สารละลายหรือฟองอากาศรั่วไหลออก

- รอเวลาทำปฏิกิริยา 5 นาที (ภาพที่ A.9)



ภาพที่ A.9 การเกิดปฏิกิริยาในระหว่างการทดสอบ

การประเมินคุณภาพเนื้อสุกร (pork quality evaluation)

ตารางที่ 8.1 การอ่านผลคุณภาพเนื้อสุกรจากปริมาตรอากาศในกระบอกฉีดยา

ปริมาตรอากาศในกระบอกฉีดยา	คุณภาพเนื้อสุกร
ไม่เกิน 1.5 มิลลิลิตร	ดี
ไม่เกิน 2.0 มิลลิลิตร	ดี
ไม่เกิน 2.5 มิลลิลิตร	ปานกลาง
ไม่เกิน 3.0 มิลลิลิตร	พอใช้

การทำนายอายุการวางจำหน่ายเนื้อสุกร (shelf life prediction)

อายุการวางจำหน่ายเนื้อสุกรจะขึ้นอยู่กับ 2 ปัจจัยสำคัญ คือ คุณภาพเนื้อสุกร ณ เวลานั้น และ อุณหภูมิในการเก็บรักษาเนื้อสุกร (storage temperature)

ตารางที่ 8.2 การทำนายระยะเวลาการวางจำหน่ายเนื้อสุกรจากคุณภาพเนื้อสุกรและอุณหภูมิการเก็บรักษา

		อุณหภูมิการเก็บรักษาเนื้อสุกร		
		10°C	20°C	30°C
ปริมาตรอากาศ	คุณภาพเนื้อสุกร	ทำนายอายุการวางจำหน่าย (shelf life)		
ไม่เกิน 1.5 มิลลิลิตร	ดี	3 วัน	22 ชั่วโมง	7 ชั่วโมง
ไม่เกิน 2.0 มิลลิลิตร	ดี	2 วัน	13 ชั่วโมง	4 ชั่วโมง
ไม่เกิน 2.5 มิลลิลิตร	ปานกลาง	1 วัน	4 ชั่วโมง	1 ชั่วโมง
ไม่เกิน 3.0 มิลลิลิตร	พอใช้	0	0	0

=====

ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้

วัตถุประสงค์	กิจกรรมหลัก	กิจกรรมรอง	ช่วงเวลา	ผู้รับผิดชอบ
การประเมินความเสี่ยง (risk assessment)	การประเมินการสัมผัส	การเก็บตัวอย่างเนื้อสุกรในเขต กทม.	8 เดือน	ศุภชัย
		วิเคราะห์การปนเปื้อน <i>S.aureus</i> ในตัวอย่างเนื้อสุกร		
	การอธิบายอันตราย	วิเคราะห์ข้อมูลตามแบบจำลองทางคณิตศาสตร์		
	การอธิบายความเสี่ยง	วิเคราะห์ข้อมูลตามแบบจำลองทางคณิตศาสตร์		
การประเมินการเสื่อมเนื้อมีสุกร (spoilage assessment)	ระดับการปนเปื้อน spoilage bacteria	วิเคราะห์การปนเปื้อน Spoilage bacteria ในตัวอย่างเนื้อสุกร	8 เดือน	ศุภชัย
		วิเคราะห์ข้อมูลตามแบบจำลองทางคณิตศาสตร์		
		การแยก Spoilage bacteria หลัก จากตัวอย่างเนื้อสุกร เพื่อใช้ในการพัฒนา Rapid test kit		
การพัฒนาวิธีการตรวจสอบจุลินทรีย์อย่างรวดเร็วในเนื้อสุกร (rapid microbial test kit)	ศึกษา test kits กับ เซลล์แบคทีเรีย	คัดเลือก microbial test ที่เห็นผลการตอบสนองที่รวดเร็วและชัดเจน	8 เดือน	ศุภชัย + สำนักงาน สัตวแพทย์ สาธารณสุข กทม.
		ศึกษารูปแบบ (platform) ของ microbial test ให้ใช้ได้ทางปฏิบัติ เช่น เลือกใช้อุปกรณ์สามัญทั่วไปแทนอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ		
		ศึกษาความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์แบคทีเรีย และระดับการตอบสนองของ test kits เบื้องต้น		
		ปรับการตอบสนองให้มีความสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์แบคทีเรีย		
	ศึกษา test kits กับ เซลล์บนเนื้อสุกร	ศึกษาความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์แบคทีเรีย และระดับการตอบสนองของ test kits เบื้องต้น		
		ปรับการตอบสนองให้มีความสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์แบคทีเรีย		
ความสามารถในการประเมินความเสี่ยง	การฝึกอบรม	การฝึกอบรมในระดับพื้นฐานถึงระดับสามารถประเมินความเสี่ยงได้		
การใช้การตรวจสอบจุลินทรีย์อย่างรวดเร็วเพื่อการประเมินการเสื่อมเนื้อมีสุกร	ทดสอบ test kit ภาคสนามในการประเมินการเสื่อม	ตรวจสอบระดับ Spoilage bacteria ในเนื้อสุกรในตลาดสดด้วย test kit	8 เดือน	ศุภชัย + สำนักงาน สัตวแพทย์ สาธารณสุข กทม.
		ทวนสอบระดับ Spoilage bacteria ของ test kit โดยการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ		
		การวิเคราะห์ความสอดคล้องของความเสี่ยงของเนื้อสุกรจาก test kit และจากห้องปฏิบัติการ		
การใช้การตรวจสอบจุลินทรีย์อย่างรวดเร็วเพื่อการประเมินความเสี่ยงเนื้อสุกร	ทดสอบ test kit ภาคสนามในการประเมินความเสี่ยง	ตรวจสอบระดับ <i>S.aureus</i> ในเนื้อสุกรในตลาดสดด้วย test kit	8 เดือน	ศุภชัย + สำนักงาน สัตวแพทย์ สาธารณสุข กทม.
		ทวนสอบระดับ <i>S.aureus</i> ของ test kit โดยการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ		
		เปรียบเทียบผลประเมินความเสี่ยง <i>S.aureus</i> จาก test kit และ จากห้องปฏิบัติการ		
		การวิเคราะห์ความสอดคล้องของการประเมินความเสี่ยงจาก test kit และจากห้องปฏิบัติการ		

ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่ดำเนินการมา และ ผลที่ได้รับตลอดโครงการ (ราย 6 เดือน)

ระยะ	กิจกรรม (Activities)	ผลงานที่ได้รับ (Outputs)
6 เดือน ที่ 1	- เก็บตัวอย่างเนื้อสุกรในเขต กทม. - วิเคราะห์การปนเปื้อน <i>S.aureus</i> ในตัวอย่างเนื้อสุกร - การอธิบายอันตราย - การอธิบายความเสี่ยง	- ระดับการปนเปื้อน <i>S.aureus</i> ในตัวอย่างเนื้อสุกร - การประเมินการสัมผัส <i>S.aureus</i> ในตัวอย่างเนื้อสุกร - ค่าประมาณความเสี่ยง <i>S. aureus</i> ในตัวอย่างเนื้อสุกร
6 เดือน ที่ 2	- วิเคราะห์การปนเปื้อน Spoilage bacteria ในตัวอย่างเนื้อสุกร - แยก Spoilage bacteria หลักจากตัวอย่างเนื้อสุกร - คัดเลือก microbial test ที่เห็นผลการตอบสนองที่รวดเร็ว ชัดเจน - ศึกษา test kit กับเซลล์แบคทีเรีย	- ระดับการปนเปื้อน Spoilage bacteria ในเนื้อสุกร - การแจกแจงความน่าจะเป็นการเสื่อมของเนื้อสุกร - Spoilage bacteria หลักที่ใช้ในการพัฒนา test kit - test kit ทดสอบจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่มีรูปแบบและคุณสมบัติเหมาะสมในการทดสอบ
6 เดือน ที่ 3	- ศึกษา test kit กับเซลล์แบคทีเรียบนเนื้อสุกร - ทดสอบ test kit ภาคสนามในการประเมินการเสื่อม - ตรวจสอบระดับ Spoilage bacteria ในเนื้อสุกรด้วย test kit - อบรมการประเมินความเสี่ยง	- test kit ทดสอบเซลล์แบคทีเรียบนเนื้อสุกรที่มีรูปแบบและคุณสมบัติเหมาะสมในการทดสอบ - ระดับ Spoilage bacteria ในเนื้อสุกรที่ทดสอบด้วย test kit - ผู้ผ่านการอบรมการประเมินความเสี่ยง
6 เดือน ที่ 4	- ทดสอบ test kit ภาคสนามในการประเมินการเสื่อม (ต่อเนื่องมาจาก 6 เดือนที่ 3) - ทวนสอบระดับ Spoilage bacteria ในเนื้อสุกรทางห้องปฏิบัติการ - ทดสอบ test kit ภาคสนามในการประเมินความเสี่ยง - ตรวจสอบระดับ <i>S.aureus</i> ในเนื้อสุกรด้วย test kit - ทวนสอบระดับ <i>S.aureus</i> ในเนื้อสุกรทางห้องปฏิบัติการ	- ระดับ Spoilage bacteria ในเนื้อสุกรที่ทวนสอบทางห้องปฏิบัติการ - ผลการวิเคราะห์ความสอดคล้องของความเสื่อมของเนื้อสุกรจาก test kit และจากห้องปฏิบัติการ - ระดับ <i>S.aureus</i> ในเนื้อสุกรที่ทดสอบด้วย test kit - ระดับ <i>S.aureus</i> ในเนื้อสุกรที่ทวนสอบทางห้องปฏิบัติการ - ผลการเปรียบเทียบการประเมินความเสี่ยง <i>S.aureus</i> จาก test kit และ จากห้องปฏิบัติการ - ผลการวิเคราะห์ความสอดคล้องของการประเมินความเสี่ยงจาก test kit และจากห้องปฏิบัติการ

=====