ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์)

ปริญญา

จุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์ — **สาขา**

จุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน — **ภาควิชา**

เรื่อง การตรวจหาเชื้อ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์สร้างเอนเทอโรท็อกซินจากอาหารจำหน่ายภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน และบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร

Detection of Enterotoxin Producing *Staphylococcus aureus* from Food Provided at Kasetsart University Bangkhen Campus and Kaset Intersection Market

นามผู้วิจัย นางสาวพราว ศุภจริยาวัตร

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(รองศาสตราจารย์องอาจ เลาหวินิจ, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(รองศาสตราจารย์พัชรี สุนทรนันท, ปร.ด.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(รองศาสตราจารย์ปฐมาพร เอมะวิศิษฏ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การตรวจหาเชื้อ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์สร้างเอนเทอโรท็อกซินจากอาหารจำหน่ายภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน และบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร

Detection of enterotoxin Producing *Staphylococcus aureus* from Food Provided at Kasetsart University Bangkhen Campus and Kaset Intersection Market

โดย

นางสาวพราว ศุภจริยาวัตร

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์)
พ.ศ. 2552

พราว ศุภจริยาวัตร 2552: การตรวจหาเชื้อ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์สร้างเอนเทอโรท็อกซินจากอาหารจำหน่ายภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน และบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์) สาขาจุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาจุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ องอาจ เลาหวินิจ, Ph.D. 121 หน้า

โรคอาหารเป็นพิษเป็นปัญหาไปทั่วโลก ส่งผลกระทบต่อสุขภาพ และเศรษฐกิจระดับชาติ เชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคระบบทางเดินอาหาร การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหา *S. aureus* สายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินและสายพันธุ์ที่ดื้อยา จากอาหารที่จำหน่ายภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร

ผลการคัดเลือกตัวอย่างอาหารที่สุ่มมาตรวจเป็นระยะเวลา 1 ปี พบว่า อาหาร 9 ชนิด แบ่งเป็นประเภทอาหารคาว 3 ชนิด ประเภทเบเกอรี่ 2 ชนิด ประเภทขนมหวานและน้ำปั่น 4 ชนิด จาก 30 ชนิด ที่พบ *S. aureus* จำนวนมาก การตรวจแยกเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินและดื้อยา ในตัวอย่างอาหารจำนวนทั้งหมด 864 ตัวอย่าง จากร้านค้าภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 4 แห่ง จำนวน 432 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อ *S. aureus* ในอาหาร 142 ตัวอย่าง (ร้อยละ 32.87) แยกได้เชื้อ 172 isolates จากร้านค้าบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร 4 แห่ง จำนวน 432 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อ *S. aureus* ในอาหาร 163 ตัวอย่าง (ร้อยละ 37.73) แยกเชื้อได้ 195 isolates รวมเชื้อที่ตรวจแยกได้ 367 isolates เป็นสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ coagulase จำนวน 335 isolates มาทดสอบการสร้างเอนเทอโรท็อกซินโดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จ RPLA (Reverse Passive Latex Agglutination) พบว่าเชื้อสร้างเอนเทอโรท็อกซินได้จำนวน 137 isolates (ร้อยละ40.90) โดยสร้างเอนเทอโรท็อกซินชนิด A, B, C, A&B, A&C และ A&B&C&D จำนวน 31, 41, 21, 20, 23 และ 1 isolates ตามลำดับ ในการตรวจหาเชื้อสายพันธุ์ดื้อยา ปฏิชีวนะ methicillin และ vancomycin จากเชื้อ *S.aureus* ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินทั้ง 137 isolates พบเชื้อดื้อยา methicillin 12 isolates (ร้อยละ 8.76) และดื้อยา vancomycin 7 isolates (ร้อยละ 5.11)

จากผลข้างต้นพบเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์สร้างเอนเทอโรท็อกซินและดื้อยาในอาหารหลายชนิด ดังนั้นจึงบ่งชี้ว่าอาหารนั้นไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค และไม่ถูกหลักสุขาภิบาล ดังนั้นจึงต้องมีการเฝ้าระวังการพบเชื้อปนเปื้อนในอาหาร เพื่อทำให้อาหารมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Praw Suppajariyawat 2009: Detection of Enterotoxin Producing *Staphylococcus aureus* from Food Provided at Kasetsart University Bangkhen Campus and Kaset Intersection Market. Master of Science (Veterinary Microbiology), Major Field: Veterinary Microbiology, Department of Veterinary Microbiology and Immunology. Thesis Advisor: Associate Professor Ong-ard Lawhavinit, Ph.D. 121 pages.

Food poisoning is a major concern worldwide and affect people's health and well-being as well as have an economic impact on individuals and nations. *Staphylococcus aureus* is a important cause of gastroenteritis. The objectives of this study were the detection of enterotoxin producing and drug resistance strains of *S. aureus* from food provided at Kasetsart University Bangkhen Campus and Kaset Intersection Market.

The results to selected several foods revealed 9 types of food were grouped into three categories that were 3 courses of a meal, 2 bakery and 4 dessert and fruit juice from 30 types of food were found *S. aureus* in high number and often found in food samples. Then must chose this 864 samples were isolated enterotoxin Producing and drug resistance of *S. aureus* during period 1 years. The each 432 food samples from 4 food shops at Kasetsart University and 4 food shops at Kaset intersection market were examined. The 172 isolates of *S. aureus* were found from 142 (32.87%) food samples of Kasetsart University and also the 195 isolates were found from 163 (37.73%) food samples of Kaset intersection market. 335 of 367 isolates of *S. aureus* were coagulase positive. After detection of enterotoxin production by RPLA kit tests, 137 out of 335 coagulase positive strains could produce enterotoxin. The type of enterotoxin produced by 137 isolates were A, B, C, A&B, A&C and A&B&C&D of 31, 41, 21, 20, 23 and 1 isolates, respectively. The detection for drug resistance strains of 137 isolates that produce enterotoxin was done by sensitivity test. The two kinds tested drugs were methicillin and vancomycin. The results show that resist to methicillin 8.76% and vancomycin 5.11%.

According to the results, the *S. aureus* of enterotoxin producing and drug resistance strains were found in many kinds of food. It should be the indicator to inform the consumers were unsafe and unproper food sanitation . Therefore, it is need the high incidence of contaminated food for the safety of food to ensure the protection of consumers foods.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. องอาจ เลาหวินิจ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.พัชรี สุนทรนันท กรรมการร่วม เป็นอย่างสูงที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ ช่วยเหลือ และสนับสนุนอุปกรณ์ เครื่องมือในการทำการวิจัยเป็นอย่างดียิ่ง ตลอดจนตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จเรียบร้อยด้วยดี และขอขอบพระคุณ อาจารย์สุนันท์ พินิจเกียรติสกุล ประธานการสอบ และ รองศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ราม รามสูต ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ให้คำแนะนำ แก้ไข ทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณครอบครัวของข้าพเจ้า รวมทั้งญาติพี่น้องทุกท่าน ที่มอบกำลังใจ กำลังทรัพย์ เพื่อสนับสนุนการศึกษาของข้าพเจ้ามาโดยตลอด และขอขอบพระคุณ พี่ณรงค์ อาบกิ่ง ที่คอยให้คำปรึกษาและช่วยเหลือเครื่องมืออุปกรณ์ในการทำวิทยานิพนธ์ และนายพรชัย สินเจริญโภไคย ที่คอยช่วยเหลือสอนการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ต่างๆ รวมทั้งพี่ๆน้องๆ ภาควิชาจุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะสัตวแพทยศาสตร์ และ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ตลอดมา

พราว ศุภจริยาวัตร

พฤษภาคม 2552

สารบัญ

หน้า

สารบัญ (1)

สารบัญตาราง (2)

สารบัญภาพ (5)

คำนำ 1

วัตถุประสงค์ 3

การตรวจเอกสาร 4

อุปกรณ์และวิธีการ 44

อุปกรณ์ 44

วิธีการ 46

ผลและวิจารณ์ 57

สรุปผลและข้อเสนอแนะ 78

สรุป 78

ข้อเสนอแนะ 82

เอกสารและสิ่งอ้างอิง 83

ภาคผนวก 93

ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 94

ภาคผนวก ข แสดงผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้ 99

ภาคผนวก ค การเตรียมความขุ่นมาตรฐานและความกว้างของ inhibition zone เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบการทดสอบความไวต่อการถูกทำลายของเชื้อด้วยยาปฏิชีวนะ 105

ภาคผนวก ง ภาพแสดงลักษณะโคโลนี รูปร่างเชื้อ *S. aureus* การยืนยันผลด้วยวิธีทางจุลชีววิทยาและชีวเคมี การทดสอบเอนเทอโรท็อกซินและการทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะ 111

ประวัติการศึกษาและการทำงาน 121

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณสมบัติของเอนเทอโรท็อกซินชนิดต่างๆ	19
2	วิธีการตรวจหาเชื้อ *S. aureus* โดยใช้ kit test ชนิดต่างๆ	22
3	วิธีการตรวจหาเอนเทอโรท็อกซินของเชื้อ *S. aureus* โดยใช้ kit test ชนิดต่างๆ	23
4	กลุ่มและชนิดต่างๆของยาต้านจุลชีพที่จำแนกตามสูตรโครงสร้างทางเคมี	24
5	ตัวอย่างอาหารที่เลือกเก็บเป็นตัวอย่าง	49
6	จำนวนตัวอย่างอาหาร แยกตามสถานที่เก็บตัวอย่างและประเภทของตัวอย่างอาหาร	57
7	จำนวนเชื้อ *S. aureus* จากตัวอย่างอาหารคาวภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน และบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร	59
8	จำนวนเชื้อ *S. aureus* จากตัวอย่างประเภทเบเกอรี่ภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน และบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร	60
9	จำนวนเชื้อ *S.aureus* จากตัวอย่างอาหารประเภทขนมหวานและน้ำปั่นภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน และบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร	60
10	ตัวอย่างอาหารที่ทำการคัดเลือกและนำมาสุ่มตัวอย่างเป็นระยะเวลา 1 ปี	61
11	จำนวนตัวอย่างอาหารที่ทำการสุ่มเป็นระยะเวลา 1 ปี แยกตามประเภทของสถานที่และประเภทของตัวอย่างอาหาร	62
12	จำนวนเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหาร ที่จำหน่ายภายในมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ และบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร	63
13	จำนวนเชื้อ *S. aureus* ที่สร้างและไม่สร้างเอนไซม์ coagulase จากร้านค้าที่จำหน่าย ภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน และบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร	64
14	จำนวนเชื้อ *S. aureus* ที่สร้างและไม่สร้างเอนไซม์ coagulase แยกตามร้านค้าที่จำหน่ายภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	64

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
15	จำนวนเชื้อ *S. aureus* ที่สร้างและไม่สร้างเอนไซม์ coagulase แยกตามร้านค้าบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร	65
16	จำนวนเชื้อที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินจำแนกตามชนิดของเอนเทอโรท็อกซินจากร้านค้าที่จำหน่ายภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน และบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร	67
17	จำนวนเชื้อที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินจำแนกตามชนิดของเอนเทอโรท็อกซินจากร้านค้าภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	68
18	จำนวนเชื้อที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินจำแนกตามชนิดของเอนเทอโรท็อกซินจากร้านค้าบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร	68
19	จำนวนตัวอย่างอาหารที่พบเชื้อ *S. aureus* และจำนวนตัวอย่างที่เชื้อสร้างเอนเทอโรท็อกซิน แยกตามประเภทของตัวอย่างอาหารภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	70
20	จำนวนตัวอย่างอาหารที่พบเชื้อ *S. aureus* และจำนวนตัวอย่างที่เชื้อสร้างเอนเทอโรท็อกซิน แยกตามประเภทของตัวอย่างอาหารบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร	71
21	จำนวนร้อยละการพบเชื้อ *S. aureus* จากตัวอย่างอาหารจากร้านค้าที่จำหน่ายภายใน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน และร้านค้าที่วางขาย บริเวณตลาดสี่แยกเกษตร	72
22	ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ Methicillin และ Vancomycin ของเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินที่แยกได้	73
23	จำนวน isolates และร้อยละที่พบว่าดื้อยาปฏิชีวนะจากร้านค้าภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และบริเวณตลาดสี่แยกเกษตรแยกตามร้านค้า	74
24	จำนวน isolates และร้อยละที่พบว่าดื้อยาปฏิชีวนะจากร้านค้าภายในมหา-วิทยาลัยเกษตรศาสตร์และบริเวณตลาดสี่แยกเกษตรแยกตามประเภทอาหาร	78

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ข1	ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *S. aureus* ความกว้างของสายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซิน 61 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารจากร้านค้าภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	100
ข2	ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซิน 76 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารจากร้านค้าบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร	102
ค1	แสดงการเตรียมความขุ่นมาตรฐาน (Mc.Farland Standards)	106
ค2	ความกว้างของ inhibition zone เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบการทดสอบความไวต่อการถูกทำลายของเชื้อด้วยยาปฏิชีวนะ	107

สารบัญภาพ

ภาพผนวกที่ **หน้า**

ง1	ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *S. aureus* อายุ 48 ชั่วโมง บนอาหาร Baird-Parker Agar	112
ง2	ลักษณะรูปร่างของเชื้อ *S.aureus* เมื่อย้อมสีแกรม	113
ง3	การทดสอบการสร้างเอนไซม์ catalase	114
ง4	การเฟอร์เมนต์น้ำตาลแมนนิทอล (mannitol)	115
ง5	การทดสอบการทนเกลือ 10% NaCl	116
ง6	การทดสอบเอนไซม์ coagulase	117
ง7	ตัวอย่างชุดทดสอบสำเร็จรูป (kit test) สำหรับใช้ตรวจหาเอนเทอโรท็อกซิน	118
ง8	แสดงตัวอย่างผลิตภัณฑ์ยาปฏิชีวนะสำเร็จรูป Oxoid ที่ใช้ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *S. aureus*	119
ง9	แสดงผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะmethicillin และ vancomycin	120

การตรวจหาเชื้อ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์สร้างเอนเทอโรท็อกซินจากอาหารจำหน่ายภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน และบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร

Detection of Enterotoxin Producing *Staphylococcus aureus* from Food Provided at Kasetsart University Bangkhen Campus and Kaset Intersection Market

คำนำ

ปัจจุบันอาหารปรุงสำเร็จเป็นที่นิยมซื้อหามาบริโภคกันมากในหมู่ประชาชนทั่วไป ทั้งอาหารคาวและหวาน เนื่องจากชีวิตที่รีบเร่งทำให้ไม่มีเวลาเพียงพอในการประกอบอาหารเองที่บ้าน ถ้าหากอาหารที่บริโภคมีการปนเปื้อนจากเชื้อโรคและสิ่งเจือปนที่เป็นสารพิษ จะทำให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค โรคอาหารเป็นพิษในประเทศไทย อันเนื่องมาจากการบริโภคอาหารที่มีเชื้อแบคทีเรียก่อโรคปนเปื้อนมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทุกปี เพราะเป็นโรคที่แพร่ระบาดง่าย และบางครั้งอาจรุนแรงถึงขั้นทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิต

เชื้อ *S. aureus* จัดอยู่ใน family Micrococcaceae เป็นแบคทีเรียรูปร่างกลม ติดสีแกรมบวก อยู่เป็นกลุ่ม สามารถก่อให้เกิดโรคหลายโรค เช่น ฝีหนอง ตากุ้งยิง เต้านมอักเสบ ไขกระดูกอักเสบ การติดเชื้อที่บาดแผล ลำไส้อักเสบ เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ ปอดอักเสบ รวมทั้งโรคอาหารเป็นพิษด้วย แบคทีเรียชนิดนี้มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์และสารพิษได้หลายชนิด สารพิษที่มีผลในการก่อโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) ได้แก่ Staphylococcal enterotoxin (SE) สารพิษเหล่านี้จะทนความร้อน 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที รวมทั้งทนต่อการถูกทำลายด้วยกรด และเอนไซม์ในทางเดินอาหาร (Balaban and Rasooly, 2000) มีรายงานการพบแบคทีเรียชนิดนี้ปนเปื้อนอยู่ในอาหาร ทั้งอาหารสดและอาหารที่ผ่านการปรุงสำเร็จพร้อมจำหน่ายหลากหลายชนิด เชื้อที่ปนเปื้อนในอาหารเหล่านี้ ถ้าเป็นสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษรวมทั้งเอนเทอโรท็อกซิน สารพิษจะถูกปล่อยออกมาในอาหาร ส่วนมากก็จะก่อโรคกับผู้ที่บริโภคอาหารที่มีสารพิษปนเปื้อน และแบคทีเรียหลายชนิดที่สร้างสารพิษจะมีความรุนแรงขึ้นอีกระดับหนึ่งก็คือ การดื้อยาปฏิชีวนะ ซึ่งทำให้เกิดการรักษายากขึ้นอีก

ปัญหาการดื้อยาต้านจุลชีพเป็นปัญหาที่สำคัญ ทำให้ค่าใช้จ่ายในการรักษา และอัตราการตายสูงขึ้น ปัจจุบันนี้มีแบคทีเรียหลายชนิดที่ก่อโรคจะดื้อต่อยาหลายชนิด และในหลายประเทศตรวจพบเชื้อสายพันธุ์ที่ดื้อยามีเพิ่มมากขึ้นเนื่องมาจากมีการใช้ยาต้านจุลชีพกันมากขึ้น การใช้ยาแบบไม่ถูกต้อง และขาดความระมัดระวังในการใช้เป็นสาเหตุที่สำคัญในการก่อให้เกิดเชื้อดื้อยา สำหรับ *S. aureus* สายพันธุ์ที่ดื้อยาที่มีรายงานการตรวจพบบ่อยครั้งในหลายประเทศ ได้แก่ MRSA (methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*) และ VRSA (vancomycin-resistance *Staphylococcus aureus*) (Chang *et al*., 1994; Aires de Sousa *et al*., 2003; Gottlieb and David, 1998; Marchese *et al*., 2000) ซึ่งเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) นับเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญ

เนื่องจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขนมีร้านจำหน่ายอาหารปรุงสำเร็จจำนวนมาก ไม่ว่าจะอยู่ภายในมหาวิทยาลัยและบริเวณรอบๆมหาวิทยาลัย มีโอกาสที่จะเกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์หลายชนิด รวมทั้ง *S. aureus* ที่สามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็วในอาหารเกือบทุกประเภท และเมื่อมีจำนวนมากก็จะสร้างเอนเทอโรท็อกซิน และปล่อยสารพิษออกมาปนเปื้อนในอาหาร เมื่อมีสารพิษมากพอก็จะทำให้ก่อโรคแก่ผู้บริโภค ร้านอาหารในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขนและบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร มีผู้มาใช้บริการทั้งนิสิต บุคลากรในมหาวิทยาลัย และบุคคลภายนอก การที่พบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารจะสามารถก่อโรคกับผู้บริโภคได้ ความปลอดภัยของอาหารต่อผู้บริโภคจึงเป็นเรื่องที่ควรให้ความสนใจและเอาใจใส่มากขึ้น ดังนั้นจะต้องมีการตรวจคุณภาพอาหารที่วางจำหน่ายในพื้นที่ต่างๆของมหาวิทยาลัยและบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร และเนื่องจากยังไม่เคยมีผู้ทำการศึกษาในเรื่องการตรวจหาเชื้อ *S. aureus* ในอาหารที่จำหน่ายภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน และบริเวณตลาดสี่แยกเกษตรมาก่อน จึงสมควรที่จะทำการวิจัยเพื่อตรวจหาเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินและดื้อยา methicillin และ vancomycin จากอาหารจำหน่ายภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และบริเวณร้านค้าจำหน่ายบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร เพื่อใช้เป็นข้อมูล และใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ถึงความปลอดภัยของอาหารต่อผู้บริโภค และเป็นแนวทางในการควบคุม และป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อดังกล่าวต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทำการตรวจหาเชื้อ *S.aureus* จากตัวอย่างอาหารที่จำหน่ายภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และร้านค้าที่จำหน่ายบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร

2. เพื่อตรวจการสร้างเอนเทอโรท็อกซินชนิดต่างๆของเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้ด้วยวิธี Reverse passive latex agglutination (RPLA)

3. เพื่อตรวจหาเชื้อ *S .aureus* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ methicillin และ vancomycin

การตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทั่วไปของ *S. aureus*

S. aureus เป็นแบคทีเรียที่เป็นสมาชิกใน Family Micrococcaceae ซึ่งสมาชิกในตระกูลนี้เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในสภาวะที่มีอากาศ (aerobe) หรือสามารถเจริญได้ทั้งสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) ได้เป็นบวก (positive) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.5-1.5 ไมโครเมตร เรียงตัวกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น การเรียงตัวติดกันเป็นกลุ่มเนื่องมาจากเซลล์มีการแบ่งตัวในหลายระนาบ และเซลล์ลูกยังไม่หลุดจากกัน จะเห็นการเรียงตัวของเซลล์เป็น 3 มิติ ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ และไม่สร้างสปอร์ *Staphylococcus* sp. มีด้วยกันอย่างน้อย 31 สายพันธุ์ บางสายพันธุ์ก่อโรคในคน บางสายพันธุ์ก่อโรคในสัตว์ และเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora) อยู่บริเวณส่วนต่างๆ ของร่างกาย เช่น ระบบทางเดินหายใจส่วนบน ผิวหนัง จมูก มือ ลำไส้ และช่องคลอดเป็นต้น *S. aureus* เป็นเชื้อที่สามารถก่อโรคในคนได้มากที่สุด บางสายพันธุ์สามารถสร้างแคปซูลได้ เป็นผลทำให้เกิดความรุนแรงในการก่อโรค แคปซูลนี้จะพบได้ทั่วไปเมื่อเชื้อเจริญในสิ่งมีชีวิต แต่เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมักจะไม่พบการสร้างแคปซูล แคปซูลนี้จะประกอบไปด้วย peptidoglycan ไม่พบการสร้างแคปซูลในระยะพักตัว (stationary phase) บางครั้งอาจพบเป็นเซลล์เดียว เป็นคู่ หรือต่อกันเป็นสายสั้นๆ Staphylococcus มาจากภาษากรีก “Staphylo” หมายถึงพวงองุ่น ส่วน “coccus” หมายถึง เม็ดเล็ก ๆ เมื่อเจริญบนอาหารแข็งจะพบว่ามีสีเหลืองทอง หรือสีเหลือง บางสายพันธุ์ก็ไม่สร้างสารสี ลักษณะโคโลนีของ *S. aureus* มีรูปร่างกลมนูนผิวเรียบเป็นมัน และโปร่งแสงการสร้างสารสี (pigment) มักปรากฏภายหลังจากเจริญแล้ว 18 ถึง 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมิห้องจะพบภายใน 24 ถึง 48 ชั่วโมง แต่เมื่อเลี้ยงในสภาพไร้ออกซิเจน หรือเลี้ยงในอาหารเหลวจะไม่มีการสร้างสารสี (Martin *et al*, 2001) โคโลนีบนอาหารแข็ง เช่น tryptic soy agar มีลักษณะขอบเรียบ กลมนูน เป็นมันเงาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร สีเทา เทาขาว จนถึงสีเหลืองทองและสีส้ม จึงมักเรียกกันว่า golden Staph. รงควัตถุเหล่านี้เป็นสารประกอบพวก triterpenoid และ carotenoides อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ มักปรากฏหลังจากการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แต่บางครั้งอาจพบเป็นสีครีมได้เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อหลายๆครั้ง การสร้างรงควัตถุของเชื้อจะสร้างได้ดีเมื่อบ่มเชื้อไว้นานๆ (24-48 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิห้อง จะสร้างรงควัตถุได้ดีกว่าที่ 37 องศาเซลเซียส แต่เชื้อจะไม่สร้างรงควัตถุภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนหรือในอาหารเหลว (Hui *et al*., 1994) ลักษณะโคโลนีบน mannitol salt egg yolk (MSEY) agar ขนาดใหญ่สีเหลืองทอง และมีโซนสีเหลืองขุ่นของตะกอนอยู่รอบๆ ส่วนลักษณะโคโลนีบน

Baird-Parker (BP) agar มีสีดำ เป็นมันวาว ลักษณะโค้งนูน ขอบเรียบ มีเส้นตะกอนสีขาวขุ่นล้อมรอบโคโลนี (opague ring) และมีโซนใสขนาด 2-5 มิลลิเมตร ล้อมรอบโซนขุ่นอีกชั้นหนึ่ง โคโลนีมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 1.0-1.5 มิลลิเมตรในเวลา 18 ชั่วโมง หลังการบ่มจนถึง 3-5 มิลลิเมตร ในเวลา 48 ชั่วโมง (Bennett and Lancette, 2001)

S. aureus สายพันธุ์ที่ก่อโรค มักมีคุณสมบัติสร้างเอนไซม์ coagulase หรือที่เรียกว่า coagulase positive Staphylococci การผลิต coagulase มีความสัมพันธ์กับการสร้างเอนเทอโรท็อกซิน ถึงร้อยละ 93-100 coagulase (Dinges et al., 2000) เป็นเอนไซม์ที่ทำให้พลาสมาของคน กระต่าย หรือ ม้า แข็งตัวโดยที่ *S. aureus* ประมาณร้อยละ 30-50 ของสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ coagulase เป็นสายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซิน เป็นสาเหตุสำคัญในการก่อให้เกิดอาหารเป็นพิษ (food poisoning) นอกจากนี้ *S. aureus* บางสายพันธุ์อาจจะย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร blood agar จะเห็นโซนใส (β- hemolytic zone) รอบๆโคโลนี และเชื้อนี้สามารถใช้น้ำตาลได้หลายชนิด เช่น แลคโตส, ซูโครส, กลูโคส รวมทั้งน้ำตาลแมนนิทอล และให้กรดแลคติก แต่ไม่ให้ก๊าซ (สุมาลี, 2518)

2. โรคที่เกิดจากเชื้อ *S. aureus*

2.1 อาหารเป็นพิษ (staphylococcal food poisoning) พยาธิสภาพเกิดขึ้นเนื่องจากการรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนของเอนเทอโรท็อกซินที่สร้าง โดยเชื้อ *S. aureus* เข้าไปสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ และก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษมักเป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ coagulase ได้ การสร้างเอนไซม์ coagulase มักมีความสัมพันธ์กับการสร้างเอนเทอโรท็อกซินในอาหารถ้าอาหารนั้นๆ อยู่ในสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญ สารพิษที่จะทำให้เกิดโทษกับผู้บริโภคได้นั้นต้องมีปริมาณไม่ต่ำกว่า 0.1-1.0 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัมอาหาร ซึ่งปริมาณเชื้อจะต้องมากถึง 10^6 เซลล์ต่อกรัมอาหาร แม้ว่าเชื้อจะสร้างเอนเทอโรท็อกซินได้แต่ถ้ามีเซลล์ปริมาณต่ำกว่า 10^6 เซลล์ต่อกรัมอาหาร ก็จะไม่ทำให้เกิดอันตราย ตามมาตรฐานอาหารกำหนดว่า ต้องตรวจไม่พบจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรครวมทั้ง *S. aureus* ด้วย เมื่อเอนเทอโรท็อกซินถูกดูดซึมที่กระเพาะอาหารจะไปกระตุ้นเส้นประสาท vagus และ sympathetic nerves ไปยัง subcortical vomiting center ที่สมอง ทำให้เกิดการอาเจียนขึ้น ดังนั้นเอนเทอโรท็อกซินของ *S. aureus* จัดเป็น emetic enterotoxin ในขณะเดียวกันทำ ให้เกิดการเพิ่มปริมาณ cAMP ในเยื่อบุผนังลำไส้เป็นผลทำให้เกิดอาการอุจจาระร่วงเป็นน้ำ อาการของโรคเกิดขึ้นภายใน 1-6 ชั่วโมง หลังจากรับประทานอาหารที่มี เอนเทอโรท็อกซิน ของ *S. aureus* อาการที่เกิดขึ้น คือ คลื่นไส้ ปวดท้อง ท้องเดิน และเป็นตะคริว อาเจียนอย่าง

รุนแรง มักไม่มีอาการไข้ ปวดบิดในท้อง ถ่ายเป็นน้ำ อุจจาระร่วง ปวดศีรษะ เหงื่อออก หนาวสั่น ในรายที่รุนแรงอาจช็อคหรือมีมูก และเลือดปนในอุจจาระ แต่ส่วนใหญ่อาการจะหายเป็นปกติภายใน 1-3 วัน หลังจากขับถ่ายเอาเชื้อ และสารพิษออกไปหมดแล้ว ถ้าเกิดในเด็กเล็กและผู้สูงอายุ อาการอาจรุนแรงและอาจเสียชีวิตได้โรคอาหารเป็นพิษจาก *S. aureus* มักเกิดจากมือที่มีเชื้อของคนที่เป็นพาหะมาประกอบอาหาร มือของผู้ที่เป็นพาหะติดเชื้อมาจากสารคัดหลั่งจากจมูก อาหารที่รับประทานนั้นดิบ หรือปรุง/อุ่นที่ความร้อนน้อยหรือทำในเวลาสั้นๆ ซึ่งไม่สามารถทำลายเอนเทอโรท็อกซินที่ทนทานต่อการต้มเป็นเวลา 30 นาที หรือมากกว่าได้ ดังนั้นการป้องกันและควบคุมโรคอาหารเป็นพิษจาก *S. aureus* คือ ผู้ที่เป็นพาหะของเชื้อ *S. aureus* ไม่ควรสัมผัสอาหาร หรือใช้มือในการหยิบหรือจับอาหารที่ปรุงแล้ว ไม่ควรตั้งอาหารทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานานก่อนรับประทาน ควรเก็บอาหารไว้ในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิต่ำ เพื่อไม่ให้เชื้อ *S. aureus* เจริญเพิ่มจำนวนก่อนที่จะนำไปประกอบหรือเสริ์ฟ (Bhatia, 2007)

2.2 ปอดบวม (pneumonia) อาการที่พบคือ มีไข้ หนาวสั่น เจ็บหน้าอก อาการอักเสบอาจเป็นแบบปอดอักเสบเฉพาะกลีบ (lobar pneumonia) หรือปอดอักเสบรอบหลอดลม โดยทั่วไปมักติดเชื้อนี้ภายหลังการเป็นโรคอื่น ๆ มาก่อน เช่น ผู้ป่วยหลังผ่าตัด หรือภายหลังจากการป่วยเป็นไข้หวัดใหญ่ (Murray *et al*., 2002)

2.3 ผิวหนังลอกหลุด (staphylococcal scald skin syndrome, SSSS) หรือที่เรียกกันอีกชื่อหนึ่งว่า Ritter's disease เป็นกลุ่มอาการที่เกิดจากสารพิษ exfoliative toxin โดยเมื่อมีการติดเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษนี้ได้ที่ส่วนใดส่วนหนึ่งของร่างกาย สารพิษจะถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสโลหิต มีผลให้เกิดอาการไข้ ผิวหนังเป็นผื่นแดงและลอกหลุดได้ทั่วร่างกาย โดยเฉพาะบริเวณรอบๆ ปาก มือ เท้า และข้อพับต่าง ๆ มองเห็นผิวหนังชั้นในแดงเยิ้มเหมือนน้ำร้อนลวก มีอาการคล้ายกับไข้ดำ แดง (scarlet fever) (Murray *et al*., 2002)

2.4 อาการช็อก (toxic shock syndrome,TSS) เกิดจาก Toxic shock syndrome toxin-1 ที่เชื้อสร้างขึ้น ทำให้เกิดกลุ่มอาการต่าง ๆ คือ มีไข้สูง ท้องเดิน ความดันลดลง มีผื่นตามผิวหนัง ช็อก และหมดสติ มักพบในเด็ก สตรีขณะมีประจำเดือน (Mahon and Manuselies, 2000)

2.5 เยื่อบุหัวใจอักเสบ (endocarditis) ที่เกิดจากเชื้อ *S. aureus* มักมีปัญหายุ่งยากซับซ้อน หากมีการติดเชื้อที่ลิ้นหัวใจเทียม ก็ควรจะต้องผ่าตัดเอาส่วนที่ติดเชื้อออกไป (Murray *et al*., 2002)

2.6 ลำไส้อักเสบ (enteritis) ตามปกติไม่ค่อยพบเชื้อ *S. aureus* ในลำไส้มากนัก แต่หากกินสารปฏิชีวนะอาจทำให้สมดุลของเชื้อเสียไป ส่งผลให้เชื้อสามารถเพิ่มจำนวนขึ้นได้ อาการที่พบคือ ท้องเดินเฉียบพลัน มีไข้สูง อาเจียน สูญเสียน้ำและเกลือแร่ (Murray *et al*., 2002)

2.7 แผลพุพอง (impetigo) อาการเริ่มจากเป็นผื่นแดง ต่อมากลายเป็นตุ่มพอง มีน้ำหนอง เมื่อตุ่มแตกจะกลายเป็นแผลพุพอง มีสะเก็ดหนาสีเหลือง เป็นวงมีขอบสีแดงช้ำ พบตามแขน ขา หลังก้น มักพบมากในเด็ก การรักษาต้องใช้สารปฏิชีวนะ เพื่อป้องกันการลุกลามของเชื้อ (Murray *et al*., 2002)

2.8 ไขกระดูกอักเสบ (osteomyelitis) โดยทั่วไปมักเป็นโรคนี้เมื่อมีการติดเชื้ออื่นอยู่แล้ว หรือมีบาดแผลธรรมดา โดยเฉพาะในเด็ก อาการจะเกิดขึ้นในทันทีทันใด ซึ่งจะเจ็บปวดบริเวณแผล มีไข้และอ่อนเพลีย (Mahon and Manuselies, 2000)

2.9 หูอักเสบ (otitismedia) เชื้อ *S. aureus* ทำให้หูชั้นนอกและชั้นกลางอักเสบ โดยมักเกิดร่วมกับการติดเชื้อในลำคอ แล้วลามเข้าหูชั้นกลาง อาจลามไปถึงโพรงกระดูกหลังหูได้ และจะเป็นอันตรายร้ายแรงหากลุกลามไปยังเยื่อหุ้มสมอง (Murray *et al*., 2002)

2.10 ตากุ้งยิง (stye หรือ enternal hordeolum) เป็นการติดเชื้อที่ขอบเปลือกตา เกิดจากมีการอุดตันของต่อมน้ำตามาก่อน แล้วจึงทำให้เกิดโรคในภายหลัง และเชื่อว่ากุ้งยิงเกิดจาก *S. aureus* สายพันธุ์ที่ผลิต esterase และ lipase ได้ดี ทำให้ต่อมบริเวณนั้นอุดตันและอักเสบ (Murray *et al*., 2002)

2.11 ฝี (boil, carbuncle, furuncle) เป็นการติดเชื้อ *S. aureus* บริเวณต่อมเหงื่อ ต่อมไขมัน หรือรูขุมขนเกิดการอักเสบเป็นตุ่มแดงจนกลายเป็นสิว มีหนอง พบบ่อยที่บริเวณก้น รักแร้ หลัง ใบหน้า ถ้าหากเชื้อลุกลามไปยังรูขุมขนบริเวณใกล้เคียงจะเป็นฝีจำนวนมาก ในเนื้อเยื่อชั้นใต้ผิวหนัง เรียกว่าฝีฝักบัว (carbuncle) การเกิดฝีหนองอาจเรื้อรัง หรือกลับเป็นซ้ำได้บ่อย (Mahon and Manuselies, 2000)

2.12 เต้านมอักเสบ (mastitis) เต้านมที่มีการติดเชื้อ *S. aureus* จะอักเสบแดงหรืออาจเป็นหนอง มีไข้ พบในหญิงหลังคลอดบุตร มักเกิดในช่วงสัปดาห์ที่ 2–3 หลังคลอด การรักษาใช้สาร

ปฏิชีวนะ หากเกิดการอักเสบเป็นหนองอย่างรุนแรง ต้องเอาหนองออก (Mahon and Manuselies, 2000)

2.13 หนองในทรวงอก (empyema) พบในผู้ป่วยที่เป็นโรคปอดบวม เนื่องจาก *S. aureus* เคลื่อนไปอยู่ที่บริเวณช่องว่างระหว่างเนื้อเยื่อ ซึ่งการดูดหนองออกจะทำได้ยากมาก (Murray *et al*., 2002)

3. ส่วนประกอบของผนังเซลล์และโครงสร้างที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนของ *S. aureus* (Kenneth, 2005)

3.1 แคปซูล (capsule) *S. aureus* บางสายพันธุ์สร้างแคปซูล ซึ่งประกอบด้วย glucosaminuronic acid เป็นโครงสร้างที่หุ้มอยู่ชั้นนอกสุดของเซลล์ การสร้างแคปซูลของเชื้อนี้มักเกิดขึ้นในเซลล์สิ่งมีชีวิต แล้วมักสูญเสียความสามารถในการสร้างไปเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2 แอดฮีซิน (Adhesins) เป็นโปรตีนอยู่ที่ผนังเซลล์ช่วยให้เชื้อสามารถเกาะติดกับ laminin, fibronectin หรือ collagen จะทำให้เชื้อมีความสามารถในการยึดเกาะ (colonization) บนพื้นผิวอวัยวะในผู้ป่วย หรือช่วยในการต่อต้านการจับกินของเม็ดเลือดขาว และเกี่ยวข้องกับการบุกรุกเข้าไปในเนื้อเยื่อของโฮสต์

3.3 โพลีแซคคาไรด์ เอ (polysaccharide A) เป็นแอนติเจนที่มีความจำเพาะต่อสายพันธุ์ของเชื้อ *S. aureus* ประกอบด้วย ribitol teichoic acid โดยมี N-acetyl glucosamine เกาะติดที่ตำแหน่ง C-4 ของ ribitol และร้อยละ 50 ของ D- alanine ที่ตำแหน่ง C-2 โดยที่ antigenic determinant อยู่ที่ glucosamine residue ที่เป็น alpha หรือ beta-glucosidic linkage

3.4 กรดไทโคอิก (teichoic acid) เป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยฟอสเฟตชนิดจำเพาะกับสายพันธุ์ของเชื้อ *S. aureus* ที่มี polysaccharide A (ribitol- teichoic acid จับกับ N-acetyglucosamine)

3.5 เอนไซม์โคแอคกูเลสชนิดติดกับเซลล์ (clumping factor หรือ bound coagulase) เข้าใจกันว่า clumping factor นี้เป็น coagulase ที่อยู่บนผิวเซลล์ *S. aureus* สายพันธุ์ที่ไม่สร้างแคปซูล

ส่วนใหญ่จะจับกลุ่มกัน เมื่อผสมพลาสมาหรือสารละลายที่มีไฟบริโนเจน (fibrinogen) (Murray *et al*., 1994, 1998)

3.6 โปรตีน เอ (protein A) มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน เป็นโปรตีนที่อยู่ที่ผนังเซลล์ของ *S. aureus* โปรตีนนี้ส่วนใหญ่จะเชื่อมต่ออยู่กับชั้น peptidoglycan บางส่วนอาจถูกปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ได้ มีน้ำหนักโมเลกุล 42 KDa สามารถจับกับส่วน Fc ของ IgG ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทุกสายพันธุ์ (Larsson and Sjoquist, 1989) ช่วยป้องกันการถูกกำจัดจากระบบภูมคุ้มกัน สามารถตรวจหา protein A ได้โดยการทดสอบทางเซรุ่มวิทยา (Murray *et al*., 2002)

4. การสร้างเอนไซม์ที่ปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) ของ *S. aureus*

S. aureus สามารถสร้างเอนไซม์ และสารพิษที่ขับออกมานอกเซลล์ได้หลายชนิดไม่น้อยกว่า 34 ชนิดที่แตกต่างกัน ถึงแม้ว่าใน 1 สายพันธุ์จะไม่สามารถสร้างโปรตีนได้ทั้งหมดก็ตาม สารพวกโปรตีนทั้งหลายที่ขับออกมานอกเซลล์นี้จะสร้างขึ้นขณะที่เซลล์ยังมีชีวิต จะช่วยย่อยสารประเภทโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน โดยมีส่วนช่วยให้จุลินทรีย์มีความสามารถในการแพร่กระจายไปในเนื้อเยื่อ และช่วยให้จุลินทรีย์ปลอดภัยจากการถูกทำลายด้วยระบบภูมิคุ้มกัน พบว่าเอนไซม์ส่วนใหญ่จะถูกสร้างขึ้นในช่วงสุดท้ายของระยะ exponential phase ของการเจริญเติบโต ตัวอย่างเอนไซม์ที่พบได้แก่

4.1 Coagulase

Coagulase เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการวินิจฉัยโรค เนื่องจากแสดงคุณสมบัติการก่อโรค และแยกให้เห็นความแตกต่างของ *S. aureus* ออกจาก *Staphylococcus* ชนิดอื่น (Bryan, 1976) เอนไซม์นี้ผลิตจาก *S. aureus* พบได้ 2 รูปแบบ คือ แบบที่เป็นอิสระอยู่ภายนอกเซลล์ และแบบที่เกาะกับเซลล์ การสร้างเอนไซม์ coagulase สามารถทำให้ส่วนพลาสมา (blood plasma) เกิดการตกตะกอนเป็นลิ่ม (fibrin clot) เอนไซม์ชนิดนี้ผลิตขึ้นได้จาก *S. aureus* สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค โดยมีสาเหตุคือทำให้เลือดแข็งตัวเกิดการจำกัดเฉพาะที่ในบริเวณที่ติดเชื้อ การแข็งตัวของเลือดจะเกิดการแข็งตัวจับกันเป็นก้อน เกิดขึ้นโดยส่วนของโปรตีนที่ทำให้เลือดแข็งตัว อยู่ในรูปที่ไม่ละลาย โดยจะเรียกส่วนนี้ว่า fibrin ปฏิกิริยาของเอนไซม์นี้จะมีการเปลี่ยนแปลง fibrinogen ไปเป็น fibrin bound coaglulase หรือ clumping factor เป็นผลทำให้เกิดการจับกันของ fibrin เป็นก้อนเมื่อเซลล์ของ *S. aureus* สัมผัสกับพลาสมาบนสไลด์ หรือเอนไซม์อิสระสามารถทำให้พลาสมาในหลอด

ทดลองแข็งตัวได้ (Martin *et al*., 2001) การใช้เอนไซม์นี้ในการทดสอบ *S. aureus* ทำให้เห็นผลการทดสอบง่าย และเชื่อถือได้ ส่วนของเซลล์จะถูกนำมาผสมกับพลาสมาของกระต่าย หรือของคนที่สามารถหาได้ (เติมcitrate, oxalate หรือ EDTA) ในหลอดทดสอบหรือทำวิธี slide test โดยใช้สไลด์ หลอดทดสอบหรือสไลด์จะนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส อ่านผลที่ชั่วโมงที่ 1 และ 3 ระดับการจับตัวเป็นก้อนเล็กน้อยจะพิจารณาว่าเป็นผลบวก ผลของการทดสอบของวิธีทดสอบแบบสไลด์ โดยผลบวกจะมีการรวมตัวของเซลล์เป็นตะกอนละเอียด

4.2 Heat stable nuclease (deoxyribonuclease หรือ DNase)

มีคุณสมบัติเป็น phosphodiesterase มีน้ำหนักโมเลกุล 16,800 ดาลตัน เอนไซม์นี้ผลิตโดย *S. aureus* โดยจะถูกปล่อยออกมาในอาหาร growth medium จะทำลายทั้ง RNA และ DNA ของสิ่งมีชีวิต เป็นเอนไซม์ที่มีความทนต่อความร้อนได้สูง และทนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ได้นานถึง 30 นาที โดยไม่มีการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์เลย (Martin *et al*., 2001)

4.3 Staphylokinase

staphylokinase หรือ fibrinolysin สร้างจาก *S. aureus* ทุกสายพันธุ์ ทำให้เกิดการสลายตัวของไฟบริน (fibinolysis) โดยกระตุ้น และเปลี่ยน proenzyme plasminogen ในพลาสมาของคน กระต่าย หนูตะเภา สุนัข และแมว ไปเป็น plasmin เป็นเอนไซม์ที่ย่อย fibrin ได้ ทำให้เลือดไม่แข็ง แตกต่างจาก fibrinolytic enzyme ที่สร้างจากเชื้อในกลุ่ม Streptococci (Murray *et al*., 2002) ทำให้เกิดการสลายตัวของไฟบริน

4.4 Hyaluronidase

S. aureus มากกว่าร้อยละ 90 สร้างเอนไซม์นี้ สามารถย่อยกรด hyaluronic เป็นกรดมิวโคโพลิแซคคาไรด์ (acid mucopolysaccharide) คือสารเชื่อมเซลล์ของร่างกายให้ติดต่อกันเป็นเนื้อเยื่อจึงส่งผลให้เชื้อสามารถบุกรุกเข้าไปเจริญในเนื้อเยื่อ และแพร่กระจายได้ดี ถือว่าเป็น spreading factor (Murray *et al*., 1994; Bartelt, 2000) เอนไซม์นี้ช่วยให้ *S. aureus* กระจายเข้าสู่เนื้อเยื่อต่าง ๆ ได้ง่ายขึ้น

4.5 Penicillinase

Penicillinase หรือ เบต้า-แลคทาเมส (β-lactamase) ในปี 1941 ใช้ penicillin ในทางการแพทย์พบว่า *S. aureus* มากกว่าร้อยละ 90 ที่ไวต่อยานี้ penicillinase มีหน้าที่เปิดวงแหวน β-lactam ของ penicillin และทำลายคุณสมบัติของการเป็นสารปฏิชีวนะ (Bryan, 1976) แต่พบว่ามีการดื้อยาเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถสร้าง penicillinase (β-lactamase) จากพลาสมิด (Murray *et al*., 2002)

4.6 Lipases

เอนไซม์ที่ย่อยสลายไขมัน เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งอาหาร จึงมักพบ *S. aureus* ได้ที่บริเวณผิวหนัง รูขุมขน และ ต่อมไขมัน ทำให้เกิดฝีขึ้นได้ เอนไซม์นี้ทดสอบโดยดูการเกิดโซนทึบแสงบนอาหาร Egg yolk agar

5. ฮีโมไลซิน (hemolysin) ของ *S. aureus*

S. aureus ทำให้เกิดโรคโดยการบุกรุก และแพร่กระจายเข้าไปในเนื้อเยื่อของร่างกาย มีความสามารถในการสร้างสารพิษ ฮีโมไลซินต่างๆ ที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย ฮีโมไลซิน(hemolysin) สร้างขึ้นโดย *S. aureus* ประกอบไปด้วยชนิด แอลฟา (Alpha(α)) เบตา (Beta (β)) แกมมา (Gamma (γ)) และ เดลตา (Delta (δ)) ในหนึ่งสายพันธุ์อาจสร้าง 1 ชนิดหรือ มากกว่า 1 ชนิด โคโลนีของ *S. aureus* เมื่อเจริญบนอาหาร blood agar เชื้อ *Staphylococcus* sp. ในกลุ่มที่ทำให้เกิดหนองทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกได้เสมอ ซึ่งทั้งหมดเป็นสายพันธุ์ที่ให้ผล coagulase เป็นบวก hemolysin จะออกฤทธิ์ที่เยื่อหุ้มเซลล์ สามารถย่อยเม็ดเลือดแดงได้อย่างสมบูรณ์ ทำให้เกิดเนื้อเยื่อตายเฉพาะที่ hemolysin จำแนกเป็น 4 ชนิดดังต่อไปนี้ (Dinges *et al*., 2000)

5.1 Alpha hemolysin (α-hemolysin) มีคุณสมบัติเป็นโปรตีนน้ำหนักโมเลกุล 34,000 ดาลตัน สามารถทำลายเกล็ดเลือด (platelets) ของคน และเม็ดเลือดแดงของกระต่าย หากฉีดเข้าหลอดเลือด จะทำให้สัตว์ทดลองตายได้ถ้าฉีดใต้ผิวหนังกระต่ายจะทำให้เกิดการอักเสบอย่างรุนแรงทำให้เนื้อเยื่อส่วนนั้นเน่าได้

5.2 Beta hemolysin (β-hemolysin) มีคุณสมบัติเป็น sphingomyelinase น้ำหนักโมเลกุล 30,000 ดาลตัน ทำให้เม็ดเลือดแดงของแกะ วัว กระต่าย และคนเกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ในอาหาร sheep blood agar เมื่อบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส จะเกิดโซนที่ไม่มีสีรอบโคโลนี การทำลายเม็ดเลือดจะเกิดได้ดีเมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่ำ (10-20 องศาเซลเซียส) จึงเรียก hemolysin ชนิดนี้ว่า hot–cold hemolysin

5.3 Delta hemolysin (δ-hemolysin) มีคุณสมบัติเป็น phospholipase น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30,000 ดาลตัน จะเกิด clear zone ขนาดเล็กรอบๆ โคโลนีที่เลี้ยงบนอาหาร human, rabbit monkey, sheep, horse, rat, mouse และ guinea pig blood agar ฮีโมไลซินชนิดนี้จะย่อยเม็ดเลือดแดงแบบ β- hemolysin ล้อมรอบโคโลนีของ *S. aureus* ที่เจริญบนอาหาร blood agar และมีความเป็นพิษต่อเม็ดเลือดขาวและต่อเนื้อเยื่ออื่นๆ หลายชนิด

5.4 Gamma hemolysin (γ-hemolysin) ประกอบด้วยโปรตีน 2 ชนิดสามารถทำหน้าที่ร่วมกันทำลายเม็ดเลือดแดงของคน กระต่าย และ แกะ hemolysin ชนิดนี้มีฤทธิ์น้อยกว่าชนิดอื่น ๆ และไม่ค่อยสำคัญในการก่อโรค (Bryan, 1976; Dinges *et al*., 2000)

6. สารพิษที่ *S. aureus* สร้างขึ้นมีหลายชนิด คือ

6.1 Staphylococcal leukocidin (Panton-Valentine leucocidin) เป็นสารพิษที่ขับออกมานอกเซลล์ มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน และมีความเป็นพิษต่อกระต่ายและคน ละลายน้ำได้ง่าย ไม่ทนร้อน สามารถออกฤทธิ์ทำลายเม็ดเลือดขาวทั้งชนิด polymorphonuclear และmacrophage แต่ไม่มีผลกับเซลล์ชนิดอื่นๆ (Mahon and Manuselies, 2000; Martin *et al*., 2001)

6.2 Exfoliative toxin หรือที่เรียกว่า epidermolytic toxin (Mahon and Manuselies, 2000) ทำ ให้เกิดโรคผิวหนังลอกหลุด (staphylococcal scalded skin syndrome, SSSS) หรือ Ritter's disease จะพบ exfoliative toxin ได้ 2 รูปแบบคือ ETA (Exfoliative toxin A) และ ETB (Exfoliative toxin B) ETA ทนต่อความร้อน ยีนจะอยู่บนโครโมโซม ส่วน ETB จะไม่ทนความร้อน และยีนอยู่บนพลาสมิด กลไกการก่อโรคยังไม่ทราบแน่นอน แต่คาดว่า ETA และ ETBจะจับกับ GM4 ที่จับอยู่กับ glycolipid ส่วนใหญ่โรค SSSS จะพบในเด็กเล็ก ส่วนเด็กโต และผู้ใหญ่จะพบน้อยมาก (Murray *et al*., 2002; Humphrey, 2002)

6.3 Toxic shock syndrom toxin (TSST-1) เชื้อ *S. aureus* ที่สร้างสารพิษชนิดนี้ ได้แก่ สายพันธุ์ที่ไวต่อ phage type 29 หรือ 52 และมักมีเยื่อที่ดื้อต่อแคดเมียม สารหนูและเพนิซิลลินร่วมอยู่ด้วย TSST-1 ทำให้เกิดกลุ่มอาการ เช่น ไข้สูงความดันลดลง ช็อค หมดสติ ที่เรียกว่า Toxic Shock Syndrome ส่วนใหญ่จะเกิดกับหญิงที่ใช้ผ้าอนามัยแบบสอด ซึ่งสามารถดูดซับได้มากและทิ้งไว้ในช่องคลอดเป็นเวลานาน เชื้อจึงเจริญและสร้างสารพิษได้ สารพิษจะถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดทางช่องคลอดหรือจากบาดแผลที่มีการติดเชื้อ สารพิษมีบทบาทเป็น superantigen ทำให้เกิดกลุ่มอาการต่างๆมากมาย คือ ไข้สูง อาเจียน ท้องเสียปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ เกิดการช็อคเนื่องจากสูญเสียน้ำ มีผื่นแดง และการหลุดลอกของผิวหนังคล้ายกับ scald skin syndrome แต่มักจะรุนแรงกว่า (Tsen *et al*., 1998; Dinges *et al*., 2000; Schlievert *et al*., 2000)

6.4 Enterotoxin เป็นที่ทราบกันดีว่าเอนเทอโรท็อกซินที่สร้างจาก *S. aureus* บางสายพันธุ์ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เอนเทอโรท็อกซินนี้ทนความร้อน ดูดความชื้น และสามารถขับออกนอกเซลล์ในรูปโปรตีนที่ละลายน้ำได้ การรับเอนเทอโรท็อกซินจากเชื้อในกลุ่ม *Staphylococcus* ในปริมาณเพียง 1 ไมโครกรัม เข้าสู่ร่างกายเป็นสาเหตุให้กระเพาะและลำไส้อักเสบได้ (Martin *et al*.,2001) เอนเทอโรท็อกซินเป็นสารพิษที่มีผลต่อระบบทางเดินอาหาร โดยที่เชื้อ *S. aureus* ที่เป็น normal flora อยู่ได้ตามผิวหนังโดยเฉพาะบริเวณจมูก ซึ่งจะทำให้เกิดการปนเปื้อนของ *S. aureus* ในอาหารได้ง่ายจากการปรุงอาหารโดยไม่ถูกสุขลักษณะ เชื้อสามารถเจริญสร้างเอนเทอโรท็อกซินอยู่ในอาหาร และเป็นสาเหตุให้เกิดการระบาดของ Staphylococcal food poisoning ได้ ปกติ *S. aureus* จำนวน 10^6 เซลล์ต่อกรัมอาหาร จึงจะสร้างเอนเทอโรท็อกซินได้เพียงพอที่จะก่อให้เกิดโรคได้ สารพิษชนิดนี้มี 14 ชนิด คือ SEA-SEO สารพิษทนต่อความร้อน 100 องศาเซลเซียส นานประมาณ 30 นาที และทนต่อเอนไซม์ในกระเพาะอาหารดังนั้นอาหารปรุงสำเร็จที่มี *S. aureus* ปนเปื้อนอยู่เพียงเล็กน้อยถ้าเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานานพอที่เชื้อจะสามารถเจริญเพิ่มจำนวนมากพอที่จะสร้างเอนเทอโรท็อกซินก็จะทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษได้ แม้ว่าจะอุ่นก่อนรับประทานก็ตาม

7. ความทนทานของเอนเทอโรท็อกซินต่อสภาพแวดล้อม

7.1 ความต้านทานต่อความร้อน ความสามารถในการทนความร้อนของสารพิษขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์ของสารพิษ ชนิดของสารพิษ ปริมาณเริ่มต้นของสารพิษ pH การให้ความร้อนกับของเหลวที่เป็นตัวทำละลาย และวิธีในการตรวจสอบ SEB ยังไม่เสียสภาพแม้ใช้เวลามากกว่า 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และ pH 7.3 โดยทั่วไปแล้วความสามารถในการทนความร้อน

ของ SEC จะมากกว่า และ SEB สามารถทนความร้อนได้มากกว่า SEA ตามลำดับ (Martin *et al*., 2001) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า เอนเทอโรท็อกซินยังสามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที (Murray *et al*., 2002)

7.2 ความทนทานต่อรังสี พบว่าต้องใช้รังสีแกมมามากกว่า 2.7 และ 9.7 เมกะแรด (Megarad, Mrad) ในการลดปริมาณ SEB ลงเป็น 10 เท่าใน buffer และนม มีการตรวจสอบประสิทธิภาพของรังสีต่อ SEA โดยใช้ ELISA การใช้รังสี 8 กิโลเกรย์ (Kilogray, KGY) จะทำลาย SEA ใน gelatin phosphate buffer ได้อย่างสมบูรณ์ (Martin *et al*., 2001)

7.3 ความทนทานต่อเอนไซม์ สารพิษที่ได้จากแบคทีเรียในกลุ่ม *S. aureus* มีความทนทานต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ใช้ย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) เช่น trypsin, chymotrypsin, rennin และ papain (pH>2) อย่างไรก็ตาม pepsin สามารถย่อยเอนเทอโรท็อกซิน ในสภาพที่มี pH น้อยกว่าหรือเท่ากับ 2 แต่สภาวะความเป็นกรดเช่นนี้ไม่ใช่สภาวะปกติของกระเพาะอาหารที่ทำให้เอนเทอโรท็อกซินสามารถผ่านเข้าสู่ลำไส้ได้ และกระตุ้นให้อาเจียนและท้องเสียได้ (Cliver and Riemann, 2002)

8. คุณสมบัติของเอนเทอโรท็อกซิน

เอนเทอโรท็อกซินที่บริสุทธิ์ มีลักษณะเป็นผงยุ่ยๆ (fluffy) สีขาว ดูดความชื้นได้ง่ายละลายได้ดีในน้ำ และสารละลายของเกลือ เมื่อทำการวิเคราะห์ทางเคมีพบว่าโมเลกุลของเอนเทอโรท็อกซินเป็นโปรตีนที่มีโครงสร้างโมเลกุลอย่างง่าย (simple protein) ประกอบด้วย single polypeptide chain ที่มีกรดอะมิโน 19 ตัว มีปริมาณ lysine, aspartic acid และ tyrosine ค่อนข้างสูง มีรูปร่างเป็นแบบ prolate ellipsoid ไม่พบว่ามี sulfhydryl groups ที่เป็นอิสระ และพบว่ามี disulfide bridge เพียงอันเดียวแต่ไม่มีความสำคัญต่อการทำให้เกิดพิษ นอกจากนี้ยังไม่พบส่วนประกอบของสารเหล่านี้เลย คือ carbohydrate, nucleic acid, lipid, coagulase, fibrinogen, proteolytic enzyme, α-hemolysin, β-hemolysin และยังพบว่า เอนเทอโรท็อกซินทนทานต่อ proteolytic enzyme หลายชนิด เช่น rennin, papain, trypsin, chymotrypsin แต่สำหรับ pepsin มีผลต่อประสิทธิภาพของเอนเทอโรท็อกซินที่ pH ต่ำกว่า 2 เท่านั้น (Schantz *et al*., 1965; Chu *et al*., 1966; Casman *et al*., 1967; Chang and Bergdoll, 1979)

9. ชนิดของเอนเทอโรท็อกซิน

9.1 เอนเทอโรท็อกซินชนิด A (SEA) มีน้ำหนักโมเลกุล 27,100 ดาลตัน สัมประสิทธิ์การตกตะกอน (sedimentation coefficient, S°20,W) 3.04 S สัมประสิทธิ์การแพร่กระจาย (Diffusion coefficient, D°20,W) 7.94 X 10-7 cm^2sec^{-1} ปริมาณของไนโตรเจน (Nitrogen content) ร้อยละ16.5, Reduction viscosity (dl/g) มีค่า 0.0407 เดซิลิตรต่อกรัม Isoelectric point มีค่า 6.8 Partial specific volume เท่ากับ 0.726 ผลกระทบของความร้อนที่มีต่อคุณสมบัติทางชีวภาพของเอนเทอโรท็อกซินชนิด A คือ เมื่อได้รับความร้อน 80 องศาเซลเซียส และ100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที และ 1 นาที ตามลำดับ สารพิษจะสูญเสียความสามารถในการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี แต่ถ้า SEA ที่มีความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย 0.05 M sodium phosphate, pH 6.85 เมื่อได้รับความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาทีจะสูญเสียความสามารถในการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีไปเพียงร้อยละ 50 เท่านั้น เมื่อป้อน SEA บริสุทธิ์ให้สัตว์กินในปริมาณ 5 ไมโครกรัมจะทำให้สัตว์อาเจียนถึงร้อยละ50 (ED50; effective dose เท่ากับ 5 ไมโครกรัม) นอกจากนี้ เพื่อหลีกเลี่ยงการเสื่อมสภาพ (Denaturation) และเพื่อลดกิจกรรมของเอนไซม์ของเอนเทอโรท็อกซินชนิด A ควรเก็บไว้ในตู้เย็นหรือในลักษณะที่แห้ง ถึงแม้ว่าจะตรวจไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (protease) ในระหว่างการทำให้เอนเทอโรท็อกซินบริสุทธิ์ก็ตาม (Chu *et al*., 1966 ; Renolds *et al*., 1988)

9.2 เอนเทอโรท็อกซินชนิด B (SEB) มีน้ำหนักโมเลกุล 28,366 ดาลตัน สัมประสิทธิ์การตกตะกอน (sedimentation coefficient, S°20,W) 2.89S สัมประสิทธิ์การแพร่กระจาย (Diffusion coefficient, D°20,W) 7.72 X 10-7 cm^2sec^{-1} ปริมาณของไนโตรเจน (Nitrogen content) ร้อยละ16.1 Reduction viscosity (dl/g) มีค่า 0.0392 เดซิลิตรต่อกรัม Isoelectric point มีค่า 8.6 Partial specific volume เท่ากับ 0.743 มี Glutamic acid และ lysine เป็น N-terminal และ C-terminal ตามลำดับ ผลกระทบของความร้อนที่มีต่อคุณสมบัติทางชีวภาพของเอนเทอโรท็อกซินชนิด B คือ เมื่อได้รับความร้อน 60 องศาเซลเซียส และที่ pH 7.3 เป็นเวลานาน 16 ชั่วโมงไม่สามารถทำลายความรุนแรงของสารพิษนี้ได้ และการให้ความร้อนมากกว่า 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จะสูญเสียความสามารถในการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีน้อยกว่าร้อยละ 50 (Schantz *et al*., 1965 ; Wagman *et al*., 1965)

9.3 เอนเทอโรท็อกซินชนิด C (SEC) มี 3 ชนิด คือ SEC1 และ SEC2 มีน้ำหนักโมเลกุล 27,531 SEC3 มีน้ำหนักโมเลกุล 27,563 ดาลตัน สัมประสิทธิ์การแพร่กระจาย (Diffusion

coefficient, D°20,W) 8.10 X 10-7 cm^2sec^{-1} ปริมาณของไนโตรเจน (Nitrogen content) ร้อยละ16.2 (Strain 137) หรือร้อยละ 16.0 (Strain 361) Instrinsic viscosity 3.4 มิลลิลิตรต่อกรัม (Strain 137) หรือ 3.7 มิลลิลิตรต่อกรัม (Strain 361) Isoelectric point มีค่า 8.6 ใน veronal buffer (Strain 137) หรือ 7.0 ใน sodium phosphate buffer (Strain 361) มี glutamic acid และ glycine เป็น N- terminal และ C-terminal ตามลำดับ ผลกระทบของความร้อนที่มีต่อคุณสมบัติทางชีวภาพของเอนเทอโรท็อกซินชนิด C คือ เมื่อได้รับความร้อน 52 องศาเซลเซียสจะทำให้ความขุ่นเพิ่มขึ้น ซึ่งจะเพิ่มขึ้นตามระดับอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น และเมื่อได้รับความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จะสูญเสียความสามารถในการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีประมาณร้อยละ 20 เมื่อฉีด SEC บริสุทธิ์ปริมาณ 5 ไมโครกรัมเข้าช่องท้อง จะทำให้สัตว์อาเจียนถึงร้อยละ 50 (ED50 , effective dose เท่ากับ 5 ไมโครกรัม) คุณสมบัติความเป็นแอนติเจนของเอนเทอโรท็อกซินชนิด C ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ถ้าหากเก็บไว้ในลักษณะที่แห้ง ที่อุณหภูมิห้องสามารถเก็บไว้ได้นาน 4 เดือน เมื่อเอนเทอโรท็อกซินอยู่ในสารละลาย 0.05 M phosphate buffer, pH5.5-7.5 เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน จะทำให้คุณสมบัติความเป็นแอนติเจนสูญเสียไปเล็กน้อย เมื่อบ่มสารละลายไว้ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.5 ชั่วโมง คุณสมบัติความเป็นแอนติเจนจะสูญเสียไป ถ้าหากบ่มสารละลายที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงจะทำให้สารละลายขุ่นได้ (Huang *et al*., 1967)

9.4 เอนเทอโรท็อกซินชนิด D (SED) มีน้ำหนักโมเลกุล 26,360 ดาลตัน Isoelectric point มีค่า 7.4 มี serine และ lysine เป็น N-terminal และ C-terminal ตามลำดับ ผลกระทบของความร้อนที่มีผลต่อคุณสมบัติของเอนเทอโรท็อกซินชนิด D คือ ประมาณร้อยละ 50 ของปฏิกิริยาทางซีรั่มวิทยาจะสูญเสียไปอย่างรวดเร็วในช่วง 2-3 นาทีแรก เมื่อได้รับความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส และ 100 องศาเซลเซียส แต่หลังจากนั้นการสูญเสียความสามารถในการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีจะอยู่ในอัตราที่ช้าลง เมื่อได้รับความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง การสูญเสียความสามารถในการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีจะลดลงร้อยละ 65 และร้อยละ 85 ตามลำดับ เมื่อได้รับความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง การสูญเสียความสามารถในการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีจะลดลงร้อยละ 85 และร้อยละ 95 ตามลำดับเมื่อฉีด SED บริสุทธิ์ ปริมาณ 5-10 ไมโครกรัม เข้าทางช่องท้อง จะทำให้เกิดสัตว์อาเจียนถึงร้อยละ 50 (ED50 , effective dose เท่ากับ 5-10 ไมโครกรัม) สารพิษชนิดนี้จะเสถียร (stable) เป็นเวลา 1 ปี เมื่อเก็บรักษาไว้ในลักษณะที่แห้งที่อุณหภูมิห้องหรือในสภาวะที่แช่แข็ง สารพิษชนิดนี้จะเสถียรที่ pH อยู่ในช่วง 1.2-10.7 และจะเสื่อมสภาพเมื่อ pH สูงกว่า 11.2 ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีจะสูญเสียอย่างสมบูรณ์หลังจากบ่มทิ้งไว้ เป็นเวลา 3 ชั่วโมงที่ pH 12.8 (Chang *et al*., 1979)

9.5 เอนเทอโรท็อกซินชนิด E (SEE) มีน้ำหนักโมเลกุล 26,425 ดาลตัน สัมประสิทธิ์การตกตะกอน (sedimentation coefficient,S°20,W) 2.6S Isoelectric point มีค่า 7.0 มี serine และ threonine เป็น N-terminal และ C-terminal ตามลำดับ ผลกระทบของความร้อนที่มีผลต่อคุณสมบัติของเอนเทอโรท็อกซินชนิด E คือ เมื่อได้รับความร้อนที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมงใน water bath จะไม่มีการสูญเสียคุณสมบัติทางอิมมูโนวิทยา ถ้าให้ความร้อนที่ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะทำให้ความสามารถในการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีลดลง ร้อยละ 5 แต่เมื่อได้รับความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และที่ 100องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จะทำให้ความสามารถในการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีลดลง ร้อยละ 38, ร้อยละ 40 ร้อยละ 55, ร้อยละ 85 และ ร้อยละ 95 ตามลำดับ เมื่อฉีด SEE บริสุทธิ์ เข้าเส้นเลือดสัตว์ทดลองในปริมาณ 0.5 ไมโครกรัม จะทำให้สัตว์อาเจียนได้ร้อยละ 50 (ED50 ,effective dose เท่ากับ 0.5 ไมโครกรัม) เมื่อเก็บเอนเทอโรท็อกซินชนิด E ใน phosphate buffer, pH 7.0 ที่ 2-5 องศาเซลเซียส จะคงสภาพอยู่ได้นาน 6 เดือน หรือเมื่อเก็บที่ pH 11.0 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เก็บได้นาน 2 สัปดาห์ และเมื่อเก็บที่ pH 12 และ 4.5 จะเก็บรักษาได้เพียง 24 ชั่วโมง แต่ถ้าเก็บที่ pH 2.0 จะสูญเสียความสามารถในการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีอย่างสมบูรณ์

9.6 เอนเทอโรท็อกซินชนิด G (SEG) มีน้ำหนักโมเลกุล 27,043 ดาลตัน สารพิษชนิดนี้มีความ สัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการใกล้ชิดกับ Streptococcal pyrogenic exotoxin A (Spe A) SEB, SEC และ Streptococcal superantigen (SSA) ของ Steptococcal pyrogenes ประมาณร้อยละ 38-42 (amino acid identity)

9.7 เอนเทอโรท็อกซินชนิด H (SEH) มีน้ำหนักโมเลกุล 25,210 ดาลตัน เมื่อทำการวิเคราะห์โดยวิธี gel filtration หรือ 28,500 ดาลตัน เมื่อทำการวิเคราะห์โดยวิธี SDS-PAGE และ Isoelectricpoint มีค่า 5.7 สารพิษชนิดนี้มีค่า ED50 effective dose ต่ำกว่า 30 ไมโครกรัม (Su and Wong, 1995)

9.8 เอนเทอโรท็อกซินชนิด I (SEI) มีน้ำหนักโมเลกุล 24,928 ดาลตัน สารพิษชนิดนี้มีความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการใกล้ชิดกับ SEA, SED และ SEE ประมาณร้อยละ 26-28 (amino identity)

9.9 เอนเทอโรท็อกซินชนิด J (SEJ) มีน้ำหนักโมเลกุล 28,565 ดาลตัน เป็นโปรตีนที่ประกอบ ด้วยกรดอะมิโน 269 ตัว ซึ่งลำดับของกรดอะมิโนมีความคล้ายคลึงกับเอนเทอโรท็อกซิน A, E และ D โดยที่ open reading frames ของเอนเทอโรท็อกซินชนิด D และ J มีการ transcription ในทิศทางตรงข้ามกัน (Zhang *et al*., 1998)

9.10 เอนเทอโรท็อกซินชนิด K (SEK) มีน้ำหนักโมเลกุล 25,539 ดาลตัน และ Isoelectric point มีค่า 7-7.5 สารพิษชนิดนี้มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ SEA, SED และ SEE มากกว่า SEB และ SEC โครงสร้างทางปฐมภูมิ (primary structure) ของ SEK จะคล้ายคลึงกับ SEI มากกว่าสารพิษชนิดอื่น และยังมีความเป็นพิษน้อยกว่าสารพิษชนิดอื่นๆอีกด้วย (Orwin *et al*., 2001) ส่วนเอนเทอโรท็อกซินชนิด M (SEM) ได้มีการตั้งชื่อขึ้นมาใหม่ภายหลัง มีน้ำหนักโมเลกุล 24,812 ดาลตัน คุณสมบัติต่างๆจะคล้ายกันกับเอนเทอโรท็อกซินชนิด K (SEK)

9.11 เอนเทอโรท็อกซินชนิด L (SEL) มีน้ำหนักโมเลกุล 24,593 ดาลตัน เอนเทอโรท็อกซินชนิด O (SEO) เป็นชื่อใหม่ของเอนเทอโรท็อกซินชนิด L มีน้ำหนักโมเลกุล 26,777 ดาลตัน มี isoelectric point เท่ากับ 8.5 มีการแยกได้จากวัวที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ toxin ชนิดนี้มีคุณสมบัติทางชีววิทยาหลากหลาย เช่น มีคุณสมบัติเป็น superantigen กระตุ้นให้เกิด endotoxic shock และสามารถทำให้กระต่ายตายได้เมื่อฉีด toxin เข้า subcutaneous

9.12 เอนเทอโรท็อกซินชนิด N (SEN) มีน้ำหนักโมเลกุล 26,067 ดาลตัน มีคุณสมบัติเป็น superantigen ก่อให้เกิดการหลั่ง cytokine ซึ่งเป็นอันตรายต่อสัตว์ทดลอง

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของเอนเทอโรท็อกซินชนิดต่างๆ

SE type	ORF length (bp)	Precursor length (aa)	Mature SE length (aa)	Molecular mass (kDa)	pI	Reference
A	774	257	233	27,100	7.3	Betley and Mekalanos 1985,1988
B	801	266	239	28,366	8.6	John and Khan, 1988
C1	801	266	239	27,531	8.6	Bohach and Sclicvert, 1987
C2	801	266	239	27,531	7.8	Bohach and Sclicvert, 1989
C3	801	266	239	27,563	8.1	Hovde et al.,1990
D	777	258	228	26,360	7.4	Change and Bergdoll, 1979 Bayles and landolo, 1989
E	774	257	230	26,425	7.0	Couch et al., 1988
G	777	258	233	27,043	5.7	Munson et al., 1998
H	726	241	218	25,210	Nd	Su and Wong., 1995
I	729	242	218	24,928	Nd	Munson et al., 1998
J	806	268	245	28,565	8.65	Zhang et al., 1998
K	729	242	219	25,539	6.5	Orwin et al., 1998
L	723	240	215	24,593	8.66	Fitzgerald et al., 2001
M	722	239	217	24,842	6.24	Jarraud et al., 2001
N	720	258	227	26,067	6.97	Jarraud et al., 2001
O	783	260	232	26,777	6.55	Jarraud et al., 2001

ที่มา: Yves Le Loir (2003)

10. เทคนิคทางอิมมูโนวิทยา (immuological technique) ในการตรวจหา *S. aureus* ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซิน

วิธีการตรวจหาเอนเทอโรท็อกซินที่ได้ผลดีกว่าการใช้สัตว์ทดลอง คือวิธีทางอิมมูโนวิทยา เนื่องจากเอนเทอโรท็อกซินมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน การใช้ปฏิกิริยาระหว่าง antigen กับ antibody วิธีการทางอิมมูโนวิทยาหลายวิธีที่ได้รับการพัฒนามาใช้สำหรับการตรวจ *S. aureus* ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซิน ซึ่งได้รับการรับรองจาก Food and drug administration ได้แก่ Microslide gel Immuno diffusion, Immunofluorescence, electroimmunodiffusion, Hemagglutination, Radioimmuno assay, Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Reverse Passive Latex Agglutination (RPLA) และ Western Blotting (Immunoblotting) (Park and Szabo, 1986; Kawabata *et al*., 1997; Rasooly and Rasooly, 1998)

10.1 Reverse Passive Latex Agglutination (RPLA) ปัจจุบัน RPLA test เป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็ว เป็นวิธีทดสอบทางอิมมูโนวิทยาอีกวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจหาเอนเทอโรท็อกซินของเชื้อ *S. aureus* (Park *et al*., 1996; Fujkawa and Igarashi, 1988; Adesiyum *et al*., 1992) และเป็นวิธีที่นำมาใช้แทนวิธี Reverse Passive Hemagglutination (RPHA) แม้ว่าวิธี RPHA เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว แต่อาจจะเกิดปฏิกริยาการตกตะกอนที่ไม่จำเพาะ (non-specific) กับองค์ประกอบบางอย่างของอาหาร ดังนั้นต่อมาจึงได้มีการนำเอาเม็ด latex ซึ่งเป็น Polystyrene มาใช้แทนเม็ดเลือดแดง โดยอาศัยหลักการทำปฏิกิริยากันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีเช่นเดียวกับวิธีอื่นๆ ซึ่งในการทดสอบจะต้องเตรียมแอนติบอดีต่อแอนติเจนชนิดนั้นๆขึ้นมาเสียก่อน โดยการนำเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อและในสภาวะที่เหมาะสม เพื่อให้เชื้อผลิตเอนเทอโรท็อกซินซึ่งเป็นแอนติเจน หลังจากทำให้เอนเทอโรท็อกซินบริสุทธิ์แล้วทำการฉีดเข้าไปในสัตว์ทดลอง ทิ้งไว้ระยะหนึ่ง (2-3 สัปดาห์) แล้วฉีดซ้ำอีก 2-3 ครั้ง เพื่อให้สัตว์ทดลองสร้างแอนติบอดีในปริมาณที่มากพอ จากนั้นเจาะเลือดสัตว์ทดลอง แล้วทิ้งให้เลือดแข็งตัวโดยเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ค้างคืน แล้วนำไปปั่นแยกเอาส่วนของแอนติซีรั่มที่ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำแอนติซีรั่มมาเตรียมแอนติบอดีบริสุทธิ์ แล้วนำไปเคลือบบนผิวเม็ด latex แล้วนำมาทดสอบหาแอนติเจนของเชื้อ *S. aureus* ต่อไป วิธี RPLA นี้เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายเพราะเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย ให้ผลรวดเร็ว มีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) สูง เครื่องมือเครื่องใช้ราคาไม่ค่อยแพง สามารถสังเกตผลได้ด้วยตาเปล่า (Bankes and Rose, 1989)

10.2 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) เป็นวิธีการตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* อีกวิธีหนึ่งที่มีผู้นิยมใช้กันมาก และนำมาใช้แทนวิธี microslide gel double diffusion ได้เพื่อลดขั้นตอนในการทำให้เข้มข้น เป็นการประหยัดเวลาและทำได้ง่ายขึ้น วิธี ELISA เป็นวิธีที่มีการพัฒนากันมาก มีความจำเพาะ มีความไว และมีการผลิตชุดทดสอบสำเร็จรูป (kit test) ออกมาขายกันทั่วไป (Park *et al*., 1996) ซึ่งอาศัยหลักการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีโดยใช้เอนไซม์เป็นตัวบ่งชี้ การทดสอบมีทั้งวิธี Double-antibody-sandwich ELISA และ Indirect ELISA การตรวจหาแอนติเจนด้วยวิธี Double-antibody sandwich method (Thompson *et al*., 1986) มีขั้นตอนคือ การเคลือบเพลทด้วยแอนติบอดี จากนั้นเติมตัวอย่างอาหารที่ต้องการทดสอบถ้ามีแอนติเจนที่จำเพาะจะจับกับแอนติบอดี ขั้นต่อไปคือ เติมแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ซึ่งจะจับกับแอนติเจน เมื่อเติมสับสเตรทลงไป เอนไซม์ย่อยสับสเตรททำให้เกิดสี ซึ่งมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ส่วนการตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี Indirect ELISA นั้นจะเคลือบเพลทด้วยแอนติเจนแล้วเติมตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ ถ้ามีแอนติบอดีจำเพาะจะจับกับแอนติเจน หลังจากนั้นเติมแอติอิมมูโนโกลบูลินติดฉลากด้วยเอนไซม์ซึ่งจะจับกับแอนติบอดีในตัวอย่าง เมื่อเติมสับสเตรททำให้เกิดสี ซึ่งมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าและวัดปริมาณสีด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (กนกรัตน์,2541) อย่างไรก็ตามวิธี ELISA ยังมีข้อจำกัดคืออาจเกิดผลลบปลอม (false negative) และอาจเกิดปฏิกิริยาข้าม (cross-reactivity) ได้ (Rasooly and Rasooly, 1998)

10.3 Western Blotting (Immunoblotting) เป็นวิธีทดสอบทางอิมมูโนวิทยาวิธีหนึ่งที่สามารถใช้ในการตรวจหาเอนเทอโรท็อกซินของเชื้อ *S. aureus* ได้ผลดีโดยการแยกแอนติเจนในวุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า (150 V, 2 ชั่วโมง) แล้วย้ายโปรตีนจากวุ้นลงบนแผ่น nitrocellulose (400 mA, 60 นาที) แล้วบ่มด้วย Anti- SEs (rabbit) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างเอาส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยากันออกไป หลังจากนั้นบ่มด้วย goat anti-rabbit IgG ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ alkaline phosphatase 2 ชั่วโมง ล้างอีกครั้งแล้วย้อมด้วยสี BCIP/NTB จะเกิดแถบโปรตีนทำให้มองเห็นได้ วิธีนี้เป็นวิธีที่มีความไว (sensitivity) สูง เนื่องจากสามารถทดสอบพบ SEA ในตัวอย่างอาหารที่มีปริมาณต่ำประมาณ 100 พิโครกรัมต่อมิลลิลิตรได้ และสามารถตรวจพบ SEA ได้ทั้งในตัวอย่างอาหารที่ผ่านความร้อนและยังไม่ผ่านความร้อน นอกจากนี้ยังสามารถแก้ปัญหาการเกิดผลบวกปลอม (false positive), ผลลบปลอม (false negative) และปฏิกิริยาข้าม (cross-reactivity) ได้ (Rasooly and Rasooly, 1998)

ปัจจุบันในการตรวจหาเชื้อ *S. aureus* และการตรวจหาเอนเทอโรท็อกซินของเชื้อ *S.aureus* มี kit test จำนวนมาก (ตารางที่ 1 และตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 วิธีการตรวจหาเชื้อ *S. aureus* โดยใช้ kit test ชนิดต่างๆ

Test system	Manufactured by	Reference
Staphylatex	American Scientific Products	Baron และ Finegold, (1990)
Staphylochrome	Innovative Diagnostics	"----------"
Sero-STAT	Scott Laboratories	"----------"
Bacto Staph Latex	Difco Laboratories	"----------"
Staphaurex	Wellcome Diagnostics	"----------"
Accu-Staph	Carr-Scarborough Microbiologicals	"----------"
AUREUS TEST™	Trisum Corp., Taipei, Taiwan	Chang และ Huang, (1993)
Staphaurex	Murex Biotech Ltd., Dartford, United kingdom	Leeuwen *et al*., (1999)
API-Staph	bioM'erieux, Marcy I,ETOILE, France	Leeuwen *et al*., (1999)
Pasteurex-Staph-Plus	Sanofi Diagnostics Pasteur GmbH, Freiburg, Germany	Eiff *et al*., (2000)
ID 32 Staph	bioM'erieux, Nurtingen, Geramany	Eiff *et al*., (2000)

ตารางที่ 3 วิธีการตรวจหาเอนเทอโรท็อกซินของเชื้อ *S. aureus* โดยใช้ kit test ชนิดต่างๆ

Test system	Manufactured by	Reference
SET-RPLA kit	Denka Seike Ltd., Tokyo, Japan	Park *et al*., (1992)
Bommeli kit or Swiss Ball kit or Swiss EIA kit	W.Brommeli A.G., Bern, Switzerland	Park *et al*., (1992)
TECRA kit	Bioenterprises Pty.Ltd., Roseville, New South Wales, Australia	Park *et al*., (1996)
EIA membrane & EIA tube kit	France	Park *et al*., (1996)
RIDASCREEN	Geramany	Park *et al*., (1996)
SET-RPLA kit	Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England	Fitzgerald *et al*., (2000)

11. ยาต้านจุลชีพ (Antimicrobial drugs)

11.1 ความหมายของยาต้านจุลชีพ

กนกรัตน์ (2541) กล่าวว่า ยาต้านจุลชีพ (Antimicrobial drugs) เป็นกลุ่มยาซึ่งมีความหมายรวมถึงยาปฏิชีวนะที่ได้จากจุลินทรีย์ และยาเคมีบำบัดที่ได้จากการสังเคราะห์หรือกึ่งสังเคราะห์ขึ้นทางเคมี ซึ่งเป็นสารประกอบเคมีชนิดที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อภายในร่างกาย ทั้งนี้เพราะส่วนใหญ่มีฤทธิ์เลือกสรรเป็นพิษเฉพาะจุลินทรีย์ ซึ่งอาจมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (antibacterial) ต้านไวรัส (antiviral) หรือต้านเชื้อรา (antifungal) โดยไม่มีผลเสียหรือมีผลเพียงเล็กน้อยต่อเซลล์คนและสัตว์ ยาต้านจุลชีพที่ใช้ในปัจจุบันมีหลายชนิด บางชนิดออกฤทธิ์ฆ่าทำลายเชื้อให้ตาย (microbicidal) แต่บางชนิดออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ (microbiostatic) บางชนิดอาจทำลายเชื้อได้หลายพวก จึงจัดว่ามีขอบเขตการออกฤทธิ์กว้าง (broad spectrum) แต่สารบางชนิดทำลายเชื้อได้น้อยชนิดหรือจัดว่ามีขอบเขตการออกฤทธิ์แคบ (narrow spectrum)

ตารางที่ 4 กลุ่มและชนิดต่างๆของยาต้านจุลชีพที่จำแนกตามสูตรโครงสร้างทางเคมี

โครงสร้างทางเคมี	ยาต้านจุลชีพ
1. Beta-lactams	
1.1 Penicillins	
Group G	Penicillin G, penicillin V, phenethicillin, propicillin
Group A	Ampicillin, amoxicillin, hetacillin, epicillin, metampicillin, bacampicillin, pivampicillin, cyclacillin
Group M	Methicillin, oxacillin, cloxacillin, dicloxacillin, flucloxacillin, floxacillin, Nafcillin
Others	Carbenicillin, ticarcillin, azlocillin, timentin, mezlocillin, amdinocillin, Piperacillin
1.2 Cephalosporins	
1st generation	Cefazolin, caphalothin, cephapirin, cephalexin, cefadroxil
2nd generation	Cefamandole, cefonicid, ceforanide, cefotetan, cefoxitin, cefuroxime, cefaclor
3rd generation	Cefmenoxime, cefoperazone, cefotaxime, ceftizoxime, ceftriaxone, Moxalactam
2. Aminoglycosides	Streptomycin, kanamycin, gentamicin, neomycin, paramomycin, sisomicin, netilmicin, amikacin, spectinomycin, framycetin, lividomycin, tobramycin
3.Tetracyclines	Tetracycline, chlortetracycline, oxytetracycline, rolitetracycline, methacycline, doxycycline, etc.
4. Chloramphenicols	Chloramphenicol, thiamphenical
5. Polypeptides	Polymyxins, gramicidine S, bacitracin, tyrocidin
6. Macrolides	Erythromycin, oleandomycin, spiramycin, pristinamycin, tylocin, lincomycin, clindamycin, etc.
7. Polyenes	Amphotericin B, nystatin
8. Sulfonamides (Sulfa drugs)	Sulfanilamide, sulfadiazine, sulfafurazole, sulfamethizole, sulfathiazole, sulfamethoxazole, etc.

ตารางที่ 4 (ต่อ)

โครงสร้างทางเคมี	ยาต้านจุลชีพ
9. Quinolones	Nalidixic acid, fluoroquinolones (norfloxacin, pefloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin, enoxacin)
10. Rifamycins	Rifampin
11. Nitrofurantoin	Nitrofurantoin, nitrofurazone, nifuraldezone, etc.
12. Miscellaneous	Vancomycin, teicoplanin, novobiocin, metronidazole, etc.

ที่มา: CLSI (2008)

11.2 Methiciilin

Methicillin หรือเรียกอีกชื่อว่า dimethoxy phenyl penicillin เป็นยาต้านจุลชีพที่มีสูตรโครงสร้างทางเคมีอยู่ในกลุ่ม Beta-lactams group M ซึ่งในกลุ่มเดียวกันนี้จะประกอบด้วยยาต้านจุลชีพคือ oxacillin, cloxacillin, dicloxacillin, flucloxacillin, floxacillin, Nafcillin หากจำแนกตามขอบเขตการออกฤทธิ์ methicillin เป็นพวกที่มีขอบเขตการออกฤทธิ์แบบแคบ หรือ narrow spectrum มักทำลายเชื้อพวกใดพวกหนึ่ง หรือแบคทีเรียบางสายพันธุ์เท่านั้น โดยจะออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียชนิดแกรมบวกทั้งรูปกลมและรูปท่อน หากจำแนกตามฤทธิ์ในการทำลาย methicillin เป็นพวกที่ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (bactericidal) หากการจำแนกกลุ่มตามกลไกการออกฤทธิ์ methicillin จะขัดขวางการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย การออกฤทธิ์ที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ผนังเซลล์ของแบคทีเรียพวกแกรมบวกแบ่งได้เป็น 2 ชั้นคือ ชั้นในที่ติดกับเซลเมมเบรนประกอบด้วยสารพวก peptidoglycan และ teichoic acid ชั้น peptidoglycan เป็นส่วนสำคัญที่ทำให้ผนังเซลล์มีความแข็งแรง รักษาลักษณะและรูปร่างของเซลล์ได้ ชั้นนอกเป็นชั้นของโปรตีนหรือคาร์โบไฮเดรท ยากลุ่ม penicillins ออกฤทธิ์โดยขัดขวางการสร้าง peptidoglycan ในผนังเซลล์ของแบคทีเรีย โดยมีผลเฉพาะกระบวนการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่เท่านั้นไม่มีผลต่อผนังเซลล์ที่มีอยู่เดิมในเซลล์ที่กำลังเจริญเติบโต เมื่อการสร้างผนังเซลล์ใหม่ถูกรบกวน แต่ขบวนการสร้างโปรตีนเกิดขึ้นตลอดเวลาและ cytoplasm เพิ่มมากขึ้น ความดันภายในเซลล์จะสูงมากจนเป็นอันตรายต่อเซลล์ ผนังเซลล์ของแบคทีเรียพวกแกรมลบมีลักษณะซับซ้อนกว่าพวกแกรมบวก ชั้นในที่ติดกับเซลล์เมมเบรนนั้นเป็นสารพวก peptidoglycan เช่นเดียวกันกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกแต่บางกว่า ถัดออก

มามีชั้นของ lipoprotein, เมมเบรนชั้นนอก lipopolysaccharide แล้วจึงตามด้วยชั้นโปรตีนหรือคาร์โบไฮเดรทซึ่งอยู่นอกสุด การที่มีสารประกอบซับซ้อนหุ้มทับชั้นของ peptidoglycan ทำให้ยา penicillins เข้าไปถึงตำแหน่งออกฤทธิ์ได้ยาก ยากลุ่มนี้จึงมีขอบเขตการออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแกรมลบ แต่เมื่อมีการดัดแปลงสูตรโครงสร้างบางส่วน ทำให้ยาซึมซาบผ่านชั้นรอบนอกของผนังเซลล์แบคทีเรียได้ดีขึ้น ผลของยาต่อแบคทีเรียแกรมลบก็ดีขึ้นด้วย

11.3 Vancomycin

Vancomycin เป็นยาต้านจุลชีพที่มีสูตรโครงสร้างทางเคมีอยู่ในกลุ่ม Miscellaneous ซึ่งในกลุ่มเดียวกันนี้จะประกอบด้วยยาต้านจุลชีพคือ Teicoplanin, Novobiocin, Metronidazole เป็นต้น หากจำแนกตามขอบเขตการออกฤทธิ์ vancomycin เป็นพวกที่มีขอบเขตการออกฤทธิ์แบบแคบหรือ narrow spectrum เป็นพวกที่ออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียชนิดแกรมบวกทั้งรูปกลมและรูปท่อน หากจำแนกตามฤทธิ์ในการทำลาย vancomycin เป็นพวกที่ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (bactericidal) หากการจำแนกกลุ่มตามกลไกการออกฤทธิ์ vancomycin จะขัดขวางการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย กลไกการออกฤทธิ์ของยาต้านจุลชีพต่อแบคทีเรีย ซึ่งกลไกในการออกฤทธิ์และการทำลายจะมีลักษณะคล้ายกับยา methicillin

12. ความสำคัญของการดื้อยาปฏิชีวนะ

วีรวรรณ (2549) กล่าวว่า การดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียเกิดจากการที่เชื้อแบคทีเรียมีการปรับตัวต่อยาโดยวิธีการต่างๆ เพื่อที่จะขจัดหรือลดประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะ โดยการดื้อยาอาจเกิดขึ้นเองตามธรรม ชาติของเชื้อนั้นๆ ทฤษฎีสำคัญที่อธิบายที่มาของการเกิดการดื้อยา

1. เชื้อแบคทีเรียได้รับ resistant gene มาจาก antibiotic producing organisms

2. Resistant gene เกิดจาก mutation ของ house keeping gene ของ clinical bacteria เอง โดย resistant gene จะสามารถกระจายต่อไปได้อย่างรวดเร็วด้วยกลไกลที่จะกล่าวต่อไป นับตั้งแต่การค้นพบยาปฏิชีวนะขนานแรกคือ penicillin อัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยจากการติดเชื้อมากขึ้น แต่การดื้อยาปฏิชีวนะก็เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว เร็วยิ่งกว่าอัตราที่เราสามารถพัฒนายาใหม่ๆ ขึ้นมาได้ทันและแพร่กระจายไปทุกส่วนของโลก ปัจจุบันพบ multidrug resistance ในแบคทีเรียบางชนิดทำให้เกิดโรคติดเชื้อที่รักษาไม่ได้ ซึ่งจะเพิ่มทั้งอัตราการเจ็บป่วยและอัตราการตาย สิ้นเปลืองทั้งยาและ

บุคลากรทางการแพทย์ หากไม่สามารถที่จะคุม หรือชะลอการดื้อยาได้ ก็เหมือนจะย้อนไปสู่ยุคก่อนที่พบยาปฏิชีวนะ(pre-antibictic aera) อีกครั้ง

13. การดื้อยา

กนกรัตน์ (2541) กล่าวว่า ยาต้านจุลชีพเมื่อนำออกมาใช้ในระยะแรกมีประสิทธิภาพในการรักษาสูง แต่เมื่อใช้ต่อไประยะหนึ่งประสิทธิภาพจะค่อยๆ ลดลงจนหมดไป ทั้งนี้เพราะจุลินทรีย์ก่อโรคสร้างความต้านทานต่อยานั้นกลายเป็นเชื้อดื้อยา ซึ่งปัจจุบันการดื้อยาเป็นปัญหาใหญ่มากในการรักษาโรคติดเชื้อทั้งนี้เพราะแบคทีเรียหลายชนิดโดยเฉพาะพวกที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) ดื้อยาที่เคยใช้รักษาได้ผลดีมาก่อน ซึ่งคุณสมบัติดื้อยานี้ยังสามารถถ่ายทอดถึงกันได้อย่างรวดเร็ว ด้วยกระบวนการทางพันธุกรรม และเกิดได้เร็วขึ้นเมื่อมีการใช้ยาต้านจุลชีพกันเพิ่มมากขึ้น เพราะนอกจากใช้รักษาโรคติดเชื้อในคนแล้วยังนำมาใช้รักษาสัตว์และเติมในอาหารเลี้ยงสัตว์เพื่อป้องกันโรคและเพิ่มผลผลิต ร่วมกับปัจจัยอื่นๆ อีกหลายอย่างที่ช่วยให้มีการกระจายของยีนที่ดื้อยาทำให้มีปัญหาการดื้อยาต้านจุลชีพหลายชนิด (multidrug resistant) ทั้งในกลุ่มเดียวกันหรือกลุ่มอื่นๆ จึงหายารักษายากขึ้นเรื่อยๆ ฉะนั้นสาเหตุสำคัญของปัญหาการดื้อยาในปัจจุบันคือ การใช้ยากันอย่างหลากหลายโดยไม่จำเป็น รวมทั้งการใช้ยาอย่างไม่ถูกต้อง เช่น ใช้ผิดขนาด ผิดเวลา หรือผิดทาง เป็นต้น แบคทีเรียที่ดื้อยาต้านจุลชีพมีกลไกการดื้อยา (mechanisms of drug resistance) ที่เปลี่ยนแปลงภายในตัวหลายแบบด้วยกัน การที่เชื้อดื้อยาแต่ละชนิดอาจอาศัยเพียงกลไกเดียวหรืออาจใช้หลายกลไกร่วมกัน อาจควบคุมโดยยีนในโครโมโซม หรือยีนนอกโครโมโซมที่เรียกว่า R-plasmid และ transposons เป็นยีนที่ย้ายเข้าออกระหว่างพลาสมิด และบางครั้งเข้าไปอยู่ในดีเอ็นเอของโครโมโซม

14. กลไกในการดื้อยา จำแนกได้ดังนี้ (กนกรัตน์, 2541)

14.1 การสร้างเอนไซม์ทำลายยา จุลินทรีย์บางชนิดสร้างเอนไซม์ที่สามารถทำลายยาต้านจุลชีพได้ ซึ่งเป็นกลไกสำคัญที่ทำให้เชื้อดื้อยาต้านจุลชีพหลายชนิด โดยเอนไซม์บางชนิดไปทำลายโครงสร้าง หรืออาจเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของยา เช่น การดื้อยาของแบคทีเรียต่อยาในกลุ่ม β –lactams เพราะเชื้อสร้างเอนไซม์ β - lactamase ทำลายโครงสร้างของยาตรงบริเวณ β -lactam ring อันเป็นโครงสร้างสำคัญในโมเลกุลของยากลุ่มนี้ ทำให้ covalent bond แตก ได้สารใหม่ซึ่งไม่มีผลทำลายเชื้อ ในปัจจุบันนี้พบเชื้อแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์นี้ได้ เช่น *Haemophilus influenzae*, *S. aureus*, *Neisseria gonorrhoeae* ซึ่งดื้อยาในกลุ่ม penicillins หรือ cephalosporin

หลายชนิด ทำให้ต้องปรับสูตรโครงสร้างของยาใหม่ โดยเปลี่ยนบริเวณ side chain ได้อนุพันธ์ยาที่ค่อนข้างทนต่อการถูกทำลายด้วยเอนไซม์ เช่น methicillin, oxacillin และ cloxacillin เป็นต้น การผลิตเอนไซม์นี้อาจควบคุมโดยยีนทั้งใน และนอกโครโมโซม แต่ส่วนใหญ่การดื้อยาที่เป็นปัญหาในปัจจุบันเนื่องมาจากการระบาดของ R plasmid หรือ transposon ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ β-lactamase ซึ่งสร้างขึ้นในผนังเซลล์ชั้นในแบคทีเรียแกรมบวกจะปล่อยเอนไซม์ออกมานอกเซลล์เพื่อทำลายยา ส่วนของแกรมลบเอนไซม์ส่วนใหญ่จะอยู่ในบริเวณ periplasmic space และทำลายยาได้เมื่อยาผ่านผนังชั้นนอกเข้ามาแล้ว ฉะนั้นการดื้อยาของเชื้อแกรมลบยังต้องอาศัยกลไกในข้ออื่นๆ ร่วมด้วย เอนไซม์บางอย่างอาจเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของยาโดยเพิ่ม substituent group เข้าในโมเลกุลของยา เช่นการดื้อยา chloramphenicol เพราะเชื้อสร้างเอนไซม์ acetyltransferase ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงที่กลุ่ม hydroxyl ส่วนการดื้อยาในกลุ่ม aminoglycosides เพราะเชื้อสร้างเอนไซม์หลายชนิด เช่น acetyltransferase ทำให้เปลี่ยนแปลงที่กลุ่มอะมิโน ยาจึงหมดประสิทธิภาพ

14.2 เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ผนังเซลล์ หรือที่เยื่อหุ้มเซลล์ทำให้มีผลต่อการผ่านของยา การเปลี่ยนแปลงที่ผนังเซลล์ โดยอาจเพิ่มการซึมผ่าน (permeability) ของยาผ่านเข้าสู่ผนังชั้นในได้ง่าย หรืออาจลดการซึมผ่านของยา และไม่ยอมให้ยาเข้าสู่เซลล์ เช่น แบคทีเรียที่ไม่สร้าง penicillinase แต่ยังดื้อยาเพนิซิลินได้ อาจเพราะมีการเปลี่ยนแปลงยีนที่โครโมโซมทำให้ส่วนประกอบในผนังเซลล์เปลี่ยนแปลงไป ยาซึมผ่านเข้าผนังเซลล์ได้ยากจึงไม่สามารถเข้าไปจับกับโปรตีนที่จำเพาะของยาเพนิซิลิน (penicillin-binding proteins) ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ได้ การดื้อยาโดยกลไกแบบนี้อาจควบคุมโดย R plasmid เช่น การดื้อยา streptomycin หรือยากลุ่มซัลฟา นอกจากอาศัยกลไกที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์แล้ว ยังเกี่ยวข้องกับการลด permeability ที่เยื่อหุ้มเซลล์ด้วยเช่นกัน

14.3 เปลี่ยนแปลงเป้าหมายที่ยาจะไปออกฤทธิ์ การดื้อต่อยา streptomycin, gentamicin, spectinomycin เกิดจากการกลายพันธุ์ มีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ไรโบโซม 30S ทำให้ยาไม่สามารถเข้าไปเกาะที่เป้าหมายเพื่อจะขัดขวางการสร้างโปรตีนได้

14.4 เปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึม เชื้ออาจปรับเปลี่ยนกระบวนการเมแทบอลิซึมเพื่อหลีกเลี่ยงแนวทางเดิม เช่น เพิ่มจำนวนสารที่เป็นสับสเตรทให้มากขึ้น เพื่อแข่งขันกับยาในการจับกับเอนไซม์ การดื้อยาในกลุ่มซัลฟานั้นพบว่า *S. aureus* เพิ่มการผลิต para-aminobenzoic acid (PABA) ซึ่งใช้เป็นสับสเตรทในการสังเคราะห์กรดโฟลิก นอกจากนี้การดื้อยาอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการทำลายเชื้อ โดยทำให้เอนไซม์ลดความไวลงจึงทำหน้าที่ได้ไม่ดีเท่าเดิม

15. การสุขาภิบาลร้านอาหารในมหาวิทยาลัยของรัฐ

อารยา (2541) กล่าวว่า โรงอาหารของสถาบัน หมายถึง โรงอาหารในสถาบันการศึกษา และโรงอาหารทั่วไปตามหน่วยงานต่างๆ เช่น โรงเรียน วิทยาลัย โรงงาน บริษัท ฯลฯ (ยกเว้นโรงครัวของโรงพยาบาล ซึ่งปรุงประกอบอาหารให้กับผู้ป่วย)

16. ข้อกำหนดด้านสุขาภิบาลอาหารสำหรับโรงอาหาร (อารยา, 2541)

16.1 สถานที่รับประทานอาหาร และบริเวณทั่วไป

16.1.1 สะอาด เป็นระเบียบ พื้น ผนัง เพดาน ในบริเวณที่รับประทานอาหาร ต้องไม่มีคราบสกปรก หรือหยากไย่ ไม่มีเศษขยะ เศษอาหาร ไม่มีน้ำขัง ไม่มีบริเวณที่ชำรุดจนเป็นแหล่งของความสกปรก ไม่มีวัสดุหรือสิ่งของวางเกะกะ และสำหรับบริเวณทั่วไปให้พิจารณาโดยรอบ เช่น ด้านหน้าหรือหลังจะต้องไม่วางสิ่งของเกะกะ และไม่มีเศษขยะ เศษอาหาร ไม่มีน้ำขัง

16.1.2 โต๊ะ เก้าอี้ สะอาด แข็งแรง จัดเป็นระเบียบ โต๊ะ เก้าอี้ สำหรับรับประทานอาหารต้องจัดให้เป็นระเบียบและ อยู่ในสภาพดี มั่นคง แข็งแรง พื้นผิวเรียบ ไม่หลุดออกหรือถลอกจนก่อให้เกิดความสกปรก ไม่มีคราบเศษอาหาร หรือคราบสกปรกที่ทิ้งไว้นานจนทำความสะอาดได้ยาก

16.1.3 มีการระบายอากาศที่ดี บริเวณที่รับประทานอาหารควรโปร่ง ไม่ร้อนอบอ้าว ไม่มีฝุ่น ไม่มีกลิ่นควัน จากการทำอาหารรบกวน

16.2 บริเวณที่เตรียม-ปรุงอาหาร

16.2.1 สะอาด เป็นระเบียบ พื้นทำด้วยวัสดุถาวร แข็ง เรียบ สภาพดี บริเวณห้องครัวหรือบริเวณที่ใช้เตรียม ปรุง ประกอบอาหาร ต้องจัดเป็นระเบียบ ผนัง เพดาน ไม่มีคราบสกปรก คราบไขมัน หรือหยากไย่ พื้นต้องเป็นวัสดุถาวร แข็ง เรียบ เช่น คอนกรีต กระเบื้อง หินขัด และไม่ชำรุดจนเป็นแหล่งของความสกปรก ไม่มีเศษขยะ เศษอาหาร และคราบสกปรก

16.2.2 มีการระบายอากาศ รวมทั้งกลิ่น และควันจากการทำอาหารได้ดี เช่น มีปล่องระบายควัน หรือพัดลมดูดอากาศที่ใช้การได้ดี บริเวณห้องครัวหรือบริเวณที่ใช้เตรียม ประกอบอาหารทั้งหมดต้องไม่อับทึบ สามารถระบายกลิ่น และควันจากการทำอาหารได้ดี ไม่มีกลิ่นรบกวนในบริเวณที่รับประทานอาหาร ทั้งนี้อาจมีการระบายอากาศโดยธรรมชาติ หรือใช้ปล่องระบายควัน หรือพัดลมดูดอากาศช่วย โดยต้องอยู่ในสภาพที่ใช้การได้ดี

16.2.3 ไม่เตรียมและปรุงอาหารบนพื้นไม่วางอาหารและภาชนะที่ใช้ในการปรุงประกอบอาหารบนพื้น ไม่เตรียมอาหาร เช่น การหั่น การล้าง การปรุงอาหาร บนพื้น

16.2.4 โต๊ะเตรียม-ปรุง และผนังบริเวณเตาไฟ ต้องทำด้วยวัสดุที่ทำความสะอาดง่าย (เช่น สแตนเลส กระเบื้อง) มีสภาพดี และพื้นโต๊ะต้องสูงจากพื้นอย่างน้อย 60 ซม. ต้องเตรียมปรุง ประกอบอาหาร บนโต๊ะที่สูงจากพื้นอย่างน้อย 60 ซม. โดยโต๊ะ หรือเคาน์เตอร์เตรียมปรุงอาหาร และผนังบริเวณเตาไฟ ต้องทำด้วยวัสดุที่เรียบ ทำความสะอาดง่าย เช่น บุด้วยสแตนเลส อลูมิเนียม โฟไมก้า กระเบื้องเคลือบ อยู่ในสภาพดี ไม่ชำรุด แข็งแรงมั่นคง ไม่มีคราบสกปรก

16.3 ตัวอาหาร น้ำ น้ำแข็ง เครื่องดื่ม

16.3.1 อาหารและเครื่องดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท ต้องมีเลขสารบบอาหาร เช่น อย. หรือ มอก. อาหารและเครื่องดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท หมายถึง อาหารและเครื่องดื่มที่บรรจุในภาชนะบรรจุที่มีการฉาบ อัด เคลือบ หรือติดด้วยวัสดุที่สามารถป้องกันป้องกันมิให้ความชื้นหรืออากาศภายนอกเข้าไปในภาชนะบรรจุได้ ต้องมีฉลาก และฉลากต้องมีเลขสารบบอาหาร โดยจะต้องมีอักษรและเลขกำกับ หรือมีเครื่องหมายรับรองของกระทรวงอุตสาหกรรม หรือมีการรับรองของทางราชการ เช่น เป็นการผลิตอาหารที่ได้รับการส่งเสริมจากทางราชการที่สามารถตรวจสอบได้

16.3.2 อาหารสด เช่น เนื้อสัตว์ ผักสด ผลไม้ และอาหารแห้ง มีคุณภาพดี แยกเก็บเป็นสัดส่วน ไม่ปะปนกัน วางสูงจากพื้นอย่างน้อย 60 ซม. หรือเก็บในตู้เย็น ถ้าเป็นห้องเย็น ต้องวางอาหารสูงจากพื้นอย่างน้อย 30 ซม. สำหรับอาหารสด ต้องล้างให้สะอาดก่อนนำมาปรุงอาหารสดต้องมีคุณภาพดี หมายถึงมีลักษณะสด สะอาด ไม่มีสีหรือกลิ่นที่ผิดปกติไป สำหรับอาหารแห้งต้องไม่มีรา ไม่มีกลิ่นอับ แยกเก็บเป็นสัดส่วน คือ แยกเก็บระหว่างเนื้อสัตว์ ผักสด ผลไม้ และอาหารแห้ง ใส่ภาชนะแยกจากกัน และวางไว้สูงจากพื้นอย่างน้อย 60 ซม. หรือเก็บในตู้เย็น หรือถ้าเก็บใน

ห้องเย็นที่บุคคลผ่านเข้าออกได้ ต้องวางอาหารบนชั้นที่สูงจากพื้น อย่างน้อย 30 ซม. และสำหรับอาหารสดโดยเฉพาะผักสดจะต้องล้างให้สะอาดก่อนนำมาปรุง

16.3.3 อาหารและเครื่องดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท มีคุณภาพดี เก็บเป็นระเบียบสูงจากพื้นอย่างน้อย 30 ซม. อาหารและเครื่องดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท มีคุณภาพดี หมายถึง มีสภาพใหม่ ไม่เป็นสนิม ไม่บุบบวม มีสีและกลิ่นที่ไม่ผิดปรกติ เก็บเป็นระเบียบบนชั้นหรือโต๊ะสูงจากพื้น อย่างน้อย 30 ซม.

16.3.4 อาหารที่ปรุงสำเร็จแล้วเก็บในภาชนะที่สะอาด มีการปกปิด วางสูงจากพื้นอย่างน้อย 60 ซม. อาหารที่ปรุงสำเร็จแล้ว ได้แก่ อาหารที่พร้อมที่จะรับประทานได้ทันที ต้องเก็บไว้ในภาชนะที่สะอาด มีฝาภาชนะ ฝาชี หรืออุปกรณ์สำหรับปกปิดอาหารที่สะอาด และปกปิดอาหารไว้ตลอดเวลา ยกเว้นเวลาที่จำหน่ายอาหาร และวางสูงจากพื้นอย่างน้อย 60 ซม.

16.3.5 มีตู้สำหรับปกปิดอาหารที่ปรุงสำเร็จแล้ว และด้านหน้าของตู้ต้องเป็นกระจกตู้สำหรับปกปิดอาหารที่ปรุงสำเร็จแล้ว ต้องเป็นตู้ที่สามารถป้องกันฝุ่น แมลงวัน และละอองเสมหะจากผู้ซื้ออาหารได้ โดยอย่างน้อยต้องมี 4 ด้าน คือ ด้านข้าง (2 ข้าง) ด้านบน และด้านหน้าของตู้ต้องเป็นกระจก สำหรับด้านหลังอาจใช้เป็นตะแกรงมุ้งลวดได้

16.3.6 น้ำดื่ม เครื่องดื่ม น้ำผลไม้ต้องสะอาด ใส่ในภาชนะที่สะอาด มีฝาปิด มีก๊อกหรือทางเทรินน้ำหรือมีอุปกรณ์ที่มีด้ามสำหรับตักโดยเฉพาะ และวางสูงจากพื้นอย่างน้อย 60 ซม. น้ำดื่ม เครื่องดื่ม น้ำผลไม้ ต้องสะอาด หมายถึง ให้พิจารณาถึงน้ำที่นำมาทำเป็นน้ำดื่ม เครื่องดื่มหรือน้ำผลไม้ต่างๆ ต้องเป็นน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อโรคแล้ว เช่น ผ่านการต้ม กรอง (โดยเครื่องกรองที่มีประสิทธิภาพเพียงพอ) หรือเป็นน้ำประปาที่ได้มาตรฐาน ทั้งนี้ ควรได้รับการตรวจทางห้องปฏิบัติการ และได้มาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข

16.3.7 น้ำแข็งที่ใช้บริโภคต้องสะอาด ใส่ในภาชนะที่สะอาด มีฝาปิด มีอุปกรณ์ที่มีด้ามสำหรับคีบหรือตักโดยเฉพาะวางสูงจากพื้นอย่างน้อย 60 ซม. และต้องไม่มีสิ่งขิงอื่นแช่รวมไว้ น้ำแข็งที่ใช้บริโภคต้องเป็นน้ำแข็งที่ผลิตขึ้นเพื่อใช้ในการบริโภคโดยตรง ไม่มีตะกอน เมื่อละลายแล้วควรเป็นน้ำที่สะอาดได้มาตรฐานน้ำดื่มตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ภาชนะที่ใส่ต้องเป็นภาชนะที่สะอาด สามารถเก็บความเย็นได้ มีฝาปิด ต้องมีอุปกรณ์สำหรับคีบ หรือตักที่มีด้ามที่ยาว

เพียงพอที่จะสามารถหยิบจับได้โดยไม่ทำให้เกิดการปนเปื้อน และในภาชนะใส่น้ำแข็งต้องไม่มีสิ่งของอื่นใดแช่ปนอยู่ ยกเว้นที่ตักน้ำแข็ง

16.4 ภาชนะอุปกรณ์

16.4.1 ภาชนะอุปกรณ์ เช่น จาน ชาม ช้อน ส้อม ฯลฯ ต้องทำด้วยวัสดุที่ไม่เป็นอันตราย เช่น สแตนเลส กระเบื้องเคลือบขาว แก้ว อลูมิเนียม เมลามีนสีขาว หรือสีอ่อน สังกะสีเคลือบขาว สำหรับตะเกียบต้องเป็นไม้ไม่ตกแต่งสี หรือพลาสติกขาวภาชนะอุปกรณ์ที่ใช้ใส่อาหาร หรือใช้ในการบริโภค เช่น จาน ชาม ช้อน และส้อม ต้องทำด้วยวัสดุที่ไม่มีพิษภัย เช่น สแตนเลส กระเบื้องเคลือบขาว แก้ว อลูมิเนียม เมลามีนหรือ สีอ่อน (พลาสติกชนิดที่เป็นเมลามีนจะแข็งบิดงอไม่ได้) สังกะสีเคลือบขาว (ต้องอยู่ในสภาพดี ไม่กะเทาะ) สำหรับตะเกียบต้องเป็นไม้ไม่ตกแต่งสี เช่น ไม้ไผ่ หรือไม้เนื้อละเอียด หรือพลาสติก สีขาว หรือสีงาช้างเท่านั้น

16.4.2 ภาชนะใส่น้ำส้มสายชู น้ำปลา และน้ำจิ้ม ต้องทำด้วยแก้ว กระเบื้องเคลือบขาว มีฝาปิด และช้อนตักทำด้วยกระเบื้องเคลือบขาว หรือสแตนเลส สำหรับเครื่องปรุงรสอื่นๆ ต้องใส่ในภาชนะที่ทำความสะอาดง่าย มีฝาปิด และสะอาดภาชนะใส่เครื่องปรุงรสที่มีฤทธิ์กัดกร่อนได้ เช่น น้ำส้มสายชู น้ำปลา น้ำจิ้มต่างๆ ต้องใช้วัสดุที่ทนทานการกัดกร่อนได้ดี ได้แก่ แก้ว กระเบื้องเคลือบขาว และต้องมีฝาปิด สำหรับ ช้อนตักควรใช้เป็นช้อนกระเบื้องเคลือบขาวจะดีที่สุดสำหรับ สแตนเลส ต้องเลือกใช้สแตนเลสที่มีส่วนผสมที่ถูกต้องโดยสังเกตที่ตัวสแตนเลสจะมีอัตราส่วนบอกไว้เป็นเลข 18-8 สำหรับเครื่องปรุงรสชนิดอื่นที่ไม่กัดกร่อน เช่น น้ำตาล พริกป่น ถั่วป่น ให้เลือกใช้ภาชนะอุปกรณ์ได้ตามข้อ 15 ทำความสะอาดง่ายและต้องมีฝาปิดหรือใช้ฝาปิด และอยู่ในสภาพที่สะอาดไม่มีคราบสกปรก

16.4.3 ล้างภาชนะอุปกรณ์ด้วยวิธีการอย่างน้อย 2 ขั้นตอน โดยขั้นตอนที่ 1 ล้างด้วยน้ำยาล้างภาชนะ และขั้นตอนที่ 2 ล้างด้วยน้ำสะอาด 2 ครั้ง หรือล้างด้วยน้ำไหล และอุปกรณ์การล้างต้องสูงจากพื้นอย่างน้อย 60 ซม. การล้างภาชนะอุปกรณ์ตามหลักสุขาภิบาลอาหาร จะต้องล้างด้วยวิธีการ 3 ขั้นตอน คือขั้นตอนที่ 1 การกำจัดเศษอาหารและคราบไขมัน โดยใช้สารเคมีทำความสะอาดต่างๆ เช่น น้ำยาล้างภาชนะ (หมายถึง สารเคมีที่ผลิตขึ้นโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ในการล้างภาชนะโดยเฉพาะ) สบู่ ฯลฯ ขั้นตอนที่ 2 การกำจัดสารเคมีที่ใช้ทำความสะอาดให้หมดไป โดยใช้น้ำสะอาดซึ่งอาจใช้น้ำจากก๊อกไหลผ่านภาชนะทุกชิ้น หรือล้างด้วยน้ำสะอาด 2 ครั้ง ทั้งนี้ต้องพิจารณาน้ำที่ใช้ล้างด้วยว่าต้องสะอาดทั้ง 2 ครั้ง

16.4.4 ใช้อ่างล้างภาชนะอุปกรณ์ที่มีท่อระบายน้ำที่ใช้การได้ดี อย่างน้อย 2 อ่าง อ่างที่ใช้ล้างภาชนะอุปกรณ์ เป็นอ่างที่มีช่องสำหรับระบายน้ำ และต่อท่อหรือสายยาง เพื่อให้น้ำระบายลงสู่ท่อระบายน้ำได้ โดยสะดวกไม่กระเด็นหรือไหลเปียกแฉะ และต้องมีอย่างน้อย 2 อ่างเพื่อล้างภาชนะอย่างน้อย 2 ขั้นตอนและควรจัดให้มีก๊อกน้ำไว้เหนืออ่างล้างภาชนะเพื่อความสะดวกในการเปิดน้ำใช้ด้วย

16.4.5 จาน ชาม ถ้วย แก้วน้ำ ถาดหลุม ฯลฯ เก็บคว่ำในภาชนะหรือตะแกรง วางสูงจากพื้นอย่างน้อย 60 ซม. หรือเก็บในภาชนะหรือสถานที่ที่สะอาดมีการปกปิด ให้เก็บภาชนะอุปกรณ์ในลักษณะคว่ำในภาชนะโปร่งสะอาด เพื่อให้ภาชนะแห้ง และวางไว้สูงจากพื้นอย่างน้อย 60 ซม. หรือถ้าไม่ได้เก็บในลักษณะคว่ำ ก่อนเก็บต้องคว่ำให้แห้งก่อน แล้วนำไปเรียงกันเป็นระเบียบในภาชนะหรือสถานที่ที่สะอาดและมีการปกปิด

16.4.6 ช้อน ส้อม ตะเกียบ วางตั้งเอาด้ามขึ้นในภาชนะโปร่งสะอาด หรือวางเป็นระเบียบในภาชนะที่สะอาดและมีการปกปิด ตั้งสูงจากพื้นอย่างน้อย 60 ซม.ช้อน ส้อม ตะเกียบ ต้องวางในลักษณะตั้งโดยเอาส่วนที่มือจับไว้ด้านบน หรือวางเรียงเป็นระเบียบ โดยวางเรียงนอนไปในทางเดียวกันแล้วเก็บไว้ในที่สะอาดมิดชิดหรือมีผ้าหรือกล่องปกปิดโดยเฉพาะ และวางไว้สูงจากพื้นอย่างน้อย 60 ซม.

16.4.7 เขียงต้องมีสภาพดี ไม่แตกร้าวหรือเป็นร่อง มีเขียงใช้เฉพาะอาหารสุก และอาหารดิบแยกจากกัน มีฝาชีครอบ (ยกเว้นครัวที่มีการป้องกันแมลงวันแล้ว) เขียงที่ใช้หั่นอาหารต้องไม่แตกร้าวหรือเป็นร่อง ไม่ขึ้นราไม่มีคราบไขมันหรือคราบสกปรกที่ฝังแน่น มีเขียงแยกใช้เฉพาะอาหารสุก และอาหารดิบ ไม่ใช้เขียงปะปนกัน และต้องมีฝาชีครอบเป็นประจำ (ไม่ให้ใช้ผ้าหรืออลูมิเนียมปกปิด) ยกเว้นครัวที่มีการป้องกันแมลงวันแล้ว

16.5 การรวบรวมขยะ และน้ำโสโครก

16.5.1 ใช้ถังขยะที่ไม่รั่วซึม และมีฝาปิดภาชนะที่ใช้รองรับขยะทุกใบต้องไม่รั่วซึม เพราะจะทำให้เศษขยะ และน้ำจากขยะเปรอะเปื้อนได้ และต้องมีฝาปิดภาชนะรองรับขยะโดยมีการปิดไว้เสมอในช่วงพักใช้งาน และควรใช้ถุงพลาสติกสวมไว้ด้านใน

16.5.2 มีท่อหรือรางระบายน้ำที่มีสภาพดี ไม่แตกร้าว ระบายน้ำจากห้องครัว และที่ล้างภาชนะอุปกรณ์ลงสู่ท่อระบายหรือแหล่งบำบัดได้ดี และต้องไม่ระบายน้ำเสียลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะโดยตรง ต้องมีทางระบายน้ำทิ้งซึ่งอาจเป็นท่อ หรือรางระบายน้ำที่สามารถระบายน้ำจากจุดต่างๆ ลงสู่ท่อระบายหรือระบบบำบัดน้ำเสียได้ดี โดยต้องไม่ระบายน้ำที่ใช้แล้วทิ้งไปยังแหล่งน้ำสาธารณะ เช่น แม่น้ำ บึง โดยตรง ต้องระบายน้ำลงสู่ท่อระบายน้ำสาธารณะหรือระบบบำบัดน้ำเสีย

16.5.3 มีบ่อดักเศษอาหารและดักไขมันที่ใช้การได้ดี ก่อนระบายน้ำเสียทิ้งต้องมีบ่อดักเศษอาหาร และดักไขมันในจุดที่น้ำเสียผ่านก่อนระบายน้ำทิ้ง และต้องมีขนาดที่พอเพียงที่จะไม่ก่อให้เกิดการอุดตัน และต้องมีการตักเศษอาหาร และคราบไขมันทิ้งทุกวัน

16.6 ห้องน้ำ ห้องส้วม

16.6.1 ห้องน้ำ ห้องส้วมต้องสะอาด ไม่มีกลิ่นเหม็น มีน้ำใช้เพียงพอ ห้องน้ำ ห้องส้วม ต้องสะอาด พื้นไม่มีน้ำขังเฉอะแฉะ ไม่มีคราบสกปรกต่างๆ ไม่มีกลิ่นเหม็น และมีน้ำใช้เพียงพอ

16.6.2 ห้องส้วมแยกเป็นสัดส่วน ประตูไม่เปิดสู่บริเวณที่เตรียม-ปรุงอาหาร ที่ล้างและเก็บภาชนะอุปกรณ์ ที่เก็บอาหาร และต้องมีอ่างล้างมือที่ใช้การได้ดีอยู่ในบริเวณห้องส้วม ห้องส้วมต้องแยกออกจากห้องครัวโดยประตูของห้องส้วมต้องไม่เปิดโดยตรงสู่บริเวณที่เตรียม-ปรุงอาหาร ที่ล้าง และเก็บภาชนะอุปกรณ์ ที่เก็บที่วางอาหารทุกชนิดโดยตรง และต้องทีอ่างล้างมือที่ใช้การได้ดี คือ มีน้ำใช้เพียงพอ และมีการระบายน้ำได้ดี อยู่ในบริเวณห้องส้วม ที่ใช้ได้โดยสะดวก

16.7 ผู้ปรุง ผู้เสิร์ฟ

16.7.1 แต่งกายสะอาด สวมเสื้อมีแขน ผู้ปรุง ผู้เสิร์ฟ ต้องแต่งกายสะอาด และสวมเสื้อมีแขนที่สะอาด

16.7.2 ผู้ปรุงควรมีผ้ากันเปื้อนสีขาว หรือมีเครื่องแบบ ผู้ปรุงจะต้องใส่หมวก หรือเน็ทคลุมผมด้วย ผู้ปรุง ผู้เสิร์ฟ ต้องผูกผ้ากันเปื้อนสีขาวหรือมีเครื่องแบบเฉพาะ และผู้ปรุงจะต้องเก็บผมโดยใส่หมวก หรือเน็ทคลุมผม

16.7.3 ต้องเป็นผู้มีสุขภาพดี ไม่เป็นโรคติดต่อ ไม่เป็นโรคผิวหนัง สำหรับผู้ปรุงจะต้องมีหลักฐานการตรวจสุขภาพในปีนั้นให้ตรวจสอบได้ ผู้เสิร์ฟให้พิจารณาจากลักษณะภายนอก ต้องไม่มีอาการแสดงว่าเป็นโรคติดต่อที่เป็นอันตราย ไม่เป็นโรคผิวหนัง และผู้ปรุงจะต้องได้รับการตรวจร่างกาย และมีหลักฐานยืนยันได้ว่าเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี เช่น ใบรับรองแพทย์

16.7.4 มีสุขนิสัยที่ดี เช่น ตัดเล็บสั้น ไม่สูบบุหรี่ในขณะปฏิบัติงาน ไม่ใช้มือหยิบจับอาหารที่ปรุงเสร็จแล้วโดยตรง ผู้ปรุง และผู้เสิร์ฟ ต้องมีสุขนิสัยในการปรุง และเสิร์ฟที่ดี ตามหลักสุขาภิบาลอาหาร โดยเฉพาะต้องตัดเล็บสั้น ไม่สูบบุหรี่ในขณะปฏิบัติงาน

17. การสุขาภิบาลแผงลอยจำหน่ายอาหาร

ดวงพร (2547) กล่าวว่า แผงลอยจำหน่ายอาหาร หมายถึง แคร่ แท่น โต๊ะ แผง รถเข็น หรือพาหนะอื่นใดที่ ขายอาหาร เครื่องดื่ม น้ำแข็ง โดยตั้งประจำที่ ซึ่งมีข้อกำหนดทางด้านสุขาภิบาลอาหาร ทั้งสิ้น12 ข้อ โดยข้อกำหนดดังกล่าวเป็นข้อที่จำเป็น หากไม่มีอาจเกิดความเสี่ยง ทำให้อาหารมีการปนเปื้อน ก่อ ให้เกิดโรคระบบทางเดินอาหารแก่ผู้บริโภคได้ ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

17.1 แผงลอยจำหน่ายอาหารทำจากวัสดุที่ทำความสะอาดง่าย มีสภาพดี เป็นระเบียบ อยู่สูงจากพื้นอย่างน้อย 60 ซม.บริเวณที่ใช้เตรียม ปรุง ประกอบ และเก็บอาหารที่จำหน่ายของแผงลอยจำหน่ายอาหาร ไม่ว่าจะเป็นแคร่ แท่น โต๊ะ รถเข็น แผง ฯลฯ ต้องทำด้วยวัสดุที่ทำความสะอาดง่าย เช่น สแตนเลส อลูมิเนียม โฟไมก้า ฯลฯ อยู่ในสภาพดี ไม่แตกชำรุด ไม่มีคราบสกปรก และมีการจัดวางของ เป็นระเบียบ ไม่รกรุงรังง่ายต่อการใช้งานและป้องกันการปนเปื้อนได้

17.2 อาหารปรุงสุกมีการปกปิด หรือมีการป้องกันสัตว์แมลงนำโรคอาหารปรุงสุกแล้วพร้อมจะบริการลูกค้า หรือที่เตรียมไว้บริการลูกค้าต้องเก็บในภาชนะที่มีฝาชี ฝาภาชนะปกปิดอาหาร หรือมีตู้ปกปิดอาหาร โดยตู้ต้องมีกระจกอย่างน้อย 3 ด้าน และด้านประตูบานเลื่อนทำด้วยลวดตาข่ายหรือตะแกรงมุ้งลวด ทั้งนี้ต้องปกปิดอาหารไว้ตลอดเวลา ยกเว้นเวลาตักอาหารจำหน่าย

17.3 สารปรุงแต่งอาหาร ต้องมีเลขสารบบอาหาร (อย.) สารปรุงแต่งอาหาร เช่น น้ำปลา น้ำส้มสายชู ซอสปรุงรส ฯลฯ ต้องมีฉลากที่มี เลขทะเบียนตำรับอาหารที่ถูกต้อง

17.4 น้ำดื่ม ต้องเป็นน้ำสะอาด ใส่ในภาชนะที่สะอาด มีการปกปิด มีก๊อกหรือทางเทรินน้ำ

น้ำดื่มที่ให้บริการแก่ผู้บริโภค ควรเป็นน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อโรคแล้วโดยการต้ม หรือกรอง เก็บในภาชนะที่สะอาด มีฝาปิด เช่น ขวด กาน้ำ เหยือกน้ำ หรือคูลเลอร์

17.5 เครื่องดื่ม ต้องใส่ภาชนะที่สะอาด มีการปกปิด และมีที่ตักที่มีด้ามยาวหรือมีก๊อก หรือทางเทรินน้ำ เครื่องดื่ม น้ำผลไม้ ที่ให้บริการแก่ลูกค้าควรบรรจุในภาชนะที่สะอาด มีการปกปิด และมีอุปกรณ์ที่มีด้ามยาวตักโดยเฉพาะ

17.6 น้ำแข็งที่ใช้บริโภค ต้องสะอาด เก็บในภาชนะที่สะอาด มีฝาปิด อยู่สูงจากพื้นอย่างน้อย 60 ซม. ที่ตักน้ำแข็งมีด้ามยาว และต้องไม่นำอาหาร หรือสิ่งของอย่างอื่นไปแช่ไว้ในน้ำแข็ง น้ำแข็งที่ใช้บริโภคต้องเป็นน้ำแข็งที่ผลิตขึ้นเพื่อใช้ในการบริโภคโดยตรง ไม่มีตะกอน ต้องบรรจุหรือใส่ในภาชนะที่สะอาด ไม่เป็นสนิม มีฝาปิด ต้องมีอุปกรณ์สำหรับคีบหรือตักที่มีด้ามยาวเพียงพอที่จะหยิบจับได้ โดยไม่ทำให้เกิดการปนเปื้อน และในภาชนะใส่น้ำแข็งต้องไม่มีสิ่งของอื่นแช่ปนอยู่ ยกเว้นที่ตัก

17.7 ล้างภาชนะด้วยน้ำยาล้างภาชนะ แล้วล้างด้วยน้ำสะอาด 2 ครั้ง หรือล้างด้วยน้ำไหล และอุปกรณ์การล้างต้องวางสูงจากพื้นอย่างน้อย 60 ซม.ภาชนะใส่อาหารทุกประเภท ต้องล้างให้สะอาดด้วยการใช้น้ำยาล้างภาชนะทำความสะอาด ขัดถูกำจัดเศษอาหารและคราบไขมัน แล้วล้างด้วยน้ำสะอาดอีก 2 ครั้ง หรือล้างด้วยน้ำไหล โดยน้ำที่ใช้ล้างจะต้องเปลี่ยนให้สะอาดอยู่เสมอ

17.8 ช้อน ส้อม ตะเกียบ วางตั้งเอาด้ามขึ้นในภาชนะโปร่งสะอาด หรือวางเป็นระเบียบ ในภาชนะโปร่งสะอาดและมีการปกปิด เก็บสูงจากพื้นอย่างน้อย 60 ซม. ช้อน ส้อม ตะเกียบ ที่ล้างสะอาดแล้ว ต้องวางหรือเก็บในลักษณะดังนี้ คือ

17.8.1 วางตั้ง ให้ส่วนที่เป็นด้ามจับไว้ด้านบน ในภาชนะที่ไม่กว้างเกินไปและภาชนะ ที่ใส่ต้องโปร่งสะอาด

17.8.2 วางเรียงนอนเป็นระเบียบไปทางเดียวกัน และควรมีผ้าหรือฝาภาชนะปิด

17.9 มีการรวบรวมมูลฝอย และเศษอาหารเพื่อนำไปกำจัดขยะ มูลฝอย และเศษอาหาร ที่ทิ้งจากการเตรียม ปรุง ประกอบ และเหลือทิ้งจากการบริโภค ต้องมีการเก็บรวบรวมโดยภาชนะที่

สามารถป้องกันการกระจายของขยะ มูลฝอย เศษอาหารออกมาสู่บริเวณภายนอกและมีการนำไปกำจัดทุกวัน

17.10 ผู้สัมผัสอาหารแต่งกายสะอาด สวมเสื้อมีแขน ผู้ปรุงต้องผูกผ้ากันเปื้อนที่สะอาด สวมหมากหรือเน็ทคลุมผม ผู้สัมผัสอาหาร ได้แก่ ผู้ปรุง ผู้เสิร์ฟ ผู้เตรียม ผู้ล้างภาชนะ ต้องแต่งกายสะอาด และสวมเสื้อมีแขน สำหรับผู้ปรุง ต้องผูกผ้ากันเปื้อนที่สะอาด และสวมหมวกหรือเน็ทที่สามารถเก็บรวบรวมผมได้เรียบร้อย

17.11 ใช้อุปกรณ์หยิบจับอาหารที่ปรุงสำเร็จแล้วอาหารที่ปรุงสำเร็จ และผักสดพร้อมรับประทาน ให้หลีกเลี่ยงการใช้มือสัมผัสอาหารโดยตรง ควรใช้ช้อน ทัพพี ที่คีบ หรือควรสวมถุงมือที่สะอาด และเป็นอุปกรณ์สำหรับหยิบจับอาหารนั้นๆ โดยเฉพาะ

17.12 ผู้สัมผัสอาหารที่มีบาดแผลที่มือต้องปกปิดแผลให้มิดชิด โดยเฉพาะบาดแผลหรือฝีที่มีหนอง จะต้องหยุดหรือหลีกเลี่ยงการปฏิบัติงานที่มือสัมผัสกับอาหารโดยตรง

18. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องการปนเปื้อนของ *S. aureus* ในอาหารและอุบัติการณ์การเกิดโรคจากอาหารเป็นพาหะ

Smith *et al.* (1983) รายงานว่าในช่วงปี ค.ศ. 1975 – 1979 จากการสำรวจการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษจาก *S. aureus* ในประเทศสหรัฐอเมริกา พบอาหารเป็นสาเหตุของการเกิดโรคได้ถึง 540 ตัวอย่าง จากจำนวนนี้มีสาเหตุจากสารพิษของ *S. aureus* ถึงร้อยละ 28 (153/540) การเกิดการระบาดเกิดจากการปรุงอาหารในบ้านเรือนร้อยละ 27 ร้านอาหารร้อยละ 19 โรงเรียนร้อยละ 14 และจากแหล่งอื่นๆ อีกร้อยละ 40 ส่วนสาเหตุการปนเปื้อนที่พบมากเกิดจากสุขลักษณะของบุคคลไม่ดี

จากรายงานการพบเชื้อ MRSA ครั้งแรกในปี 1961 นั้นยังไม่เป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขนัก จนกระทั่งในช่วงปี 1978-1983 พบว่ามีการระบาดทั่วโลก คนป่วยที่ติดเชื้อนอกจากจะดื้อต่อ methicillin แล้วยังดื้อต่อยาชนิดอื่นๆ ด้วย เช่น oxacillin หรือ vancomycin เป็นต้น ทำให้ยากต่อการรักษา เสียค่าใช้จ่ายสูง และทำให้คนตายมากขึ้น

การแพร่กระจายของ *S. aureus* ในอาหารจนถึงขั้นเกิดการระบาดขึ้นพบว่าเชื้อส่วนใหญ่สร้างสารพิษชนิด A (ร้อยละ 50) หรือมีทั้ง A และ D (ร้อยละ 21) ในช่วงปี 1977 – 1981 ซึ่งเกิดการระบาดเนื่องจากอาหารเป็นพิษในสหรัฐอเมริกา พบว่ามีผู้ป่วยมากกว่า 7,000 ราย และประมาณร้อยละ 10 ของผู้ป่วยต้องเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล เชื้อส่วนใหญ่ที่ทำให้เกิดอาการยังคงพบว่าสร้างสารพิษชนิด A อยู่ ถ้าเป็นอาหารประเภทโปรตีนมักพบเชื้อสร้างสารพิษชนิด D ในปริมาณสูง

รายงานการแพร่ระบาดของโรคอาหารเป็นพิษในประเทศโครเอเชียเฉพาะในปี ค.ศ. 1992 พบว่าสาเหตุเกิดจากแบคทีเรีย *S. aureus* มากถึง 126 ราย เมื่อคิดเป็นจำนวนครั้งของการเกิดโรคอาหารเป็นพิษเนื่องจาก *S. aureus* ในช่วงปี ค.ศ.1986-1992 พบมากถึง 750 ราย หรือคิดเป็นร้อยละ 6.3 ของโรคระบาดที่เกิดจากอาหารเป็นพาหะทั้งหมด (Razem and Katusin, 1994)

ชัยวัฒน์ (2518) ได้ตรวจหาสายพันธุ์ของสแตฟิลโลคอคไค ซึ่งสามารถสร้างสารพิษในกับข้าวสำเร็จรูปในเขตกรุงเทพมหานคร ปรากฏว่าสามารถแยก coagulase positive staphylococci ได้ถึง 575 isolates พบว่า 5 isolates เป็นพวกสร้างสารพิษชนิด B และ 15 isolates เป็นพวกที่สร้างสารพิษชนิด C

จริยาและคณะ (2530) จากการศึกษาที่วางขายในจังหวัดขอนแก่น จากจำนวนตัวอย่างอาหาร 193 ตัวอย่าง พบเชื้อ Staphylococcus ที่สร้างเอนไซม์ coagulase 17 ตัวอย่าง (ร้อยละ 50.26) พบอาหารที่สร้างสารพิษอยู่ 34 ตัวอย่าง (ร้อยละ 17.26) ชนิดของสารพิษที่พบมากที่สุดคือ ABCD (ร้อยละ 25.64) รองลงมาคือชนิด A (ร้อยละ 23.08)

กองวิเคราะห์อาหารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดย สุมณฑาและคณะ (2533) ได้มีการสำรวจการแพร่กระจายของเชื้อ *S. aureus* ในอาหาร พบว่าอาหารที่สงสัยว่าอาจเป็นสาเหตุทำให้อาหารเป็นพิษตรวจพบเชื้อ 4.0×10^5 - 4.55×10^5 เซลล์ต่อกรัมอาหาร และพบ coagulase positive staphylococci คิดเป็น ร้อยละ23.4 พบพวกที่ให้สารพิษชนิด A/D และหรือ A+D ร้อยละ 79.1 และสารพิษ A พบมากในอาหารที่สงสัยว่าทำให้เกิดการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษ

กองระบาดวิทยา (2537) ในประเทศไทยระหว่างปี พ. ศ. 2527 – 2535 กองระบาดวิทยารายงานโรคที่มีน้ำและอาหารเป็นพาหะ จำนวน 160 ครั้ง มีผู้ป่วยทั้งสิ้น 8,851 ราย โรคระบาดที่มีผู้ป่วยมากที่สุด สาเหตุเกิดจากสารพิษของเชื้อ *S. aureus* มีผู้ป่วยรวม 517 ราย จาก 8,851 ราย การรวบรวมข้อมูลและสืบสวนสาเหตุของโรคท้องร่วงจากอาหารเป็นพาหะพบว่าโรงเรียนเป็นแหล่ง

ของโรคที่เกิดจาก SE มากถึง 10 ครั้ง จากจำนวนทั้งสิ้น 12 แม้ว่าอัตราการเสียชีวิตจากโรคนี้ค่อนข้างต่ำ

อาทิตย์และนธี (2540) จากการตรวจสอบการปนเปื้อนแบคทีเรียก่อโรคลำไส้ จากตัวอย่างอาหารพร้อมบริโภคจำนวน 30 ตัวอย่าง อุปกรณ์ประกอบอาหารจำนวน 50 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างจากร้านอาหาร ร้านละเท่า ๆ กัน จำนวน 10 ร้าน อาหารในสถาบันราชภัฏสวนสุนันทา รวมทั้งสิ้น 100 ตัวอย่าง ระหว่างเดือน พฤศจิกายน ถึง เดือนธันวาคม พ.ศ. 2540 โดยวิธี Standard Conventional Method พบแบคทีเรียก่อโรคลำไส้จำนวน 11 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 11 จากร้านอา หาร 6 ร้าน คิดเป็นร้อยละ 60 โดยพบจาก อาหารพร้อมบริโภค (แกงจืดวุ้นเส้น , ผัดไทย) 2 ร้าน , เขียง 3 ร้าน, จาน 3 ร้าน และมีด 2 ร้าน เชื้อที่พบได้แก่ *Salmonella* spp , *S. aureus* , *Vibrio parahaemolyticus* , และ *Vibrio cholerae* nonO1/ nonO139 จำนวน 5, 1, 5 และ 5 สายพันธุ์ตามลำดับ จากแกงจืดวุ้นเส้น พบ *Salmonella* Panama และ *Vibrio cholerae* non O1/non O139 ผัดไทย พบ *Staphylococcus aureus* บนเขียงพบ *Salmonella* Emek , *Salmonella* Anatum , *Salmonella* Orion และ *Vibrio cholerae* non O1/ non O139 ที่มีดพบ *Salmonella* Anatum , *Vibrio parahaemolyticus* , และ *Vibrio cholerae* non O1/non O139, บนจานพบ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio cholerae* non O1/non O139 และไม่พบ *E.coli* O157 :H7 ในทุกตัวอย่าง

วรรณดีและคณะ (2542) จากการศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารปรุงสำเร็จ 9 ประเภท ได้แก่ ซุปและแกงจืด, แกงเผ็ด, ผัดผักกับเนื้อสัตว์, ขนมจีน, ข้าวหมูแดง, ข้าวมันไก่, ข้าวขาหมู, ก๋วยเตี๋ยว, ยำลาบ, ทอดมัน, ขนมที่มีส่วนผสมกะทิ ประเภทละ 50 ตัวอย่าง รวม 450 ตัวอย่าง จากร้านอาหารใต้อาคารกรมควบคุมโรคติดต่อ กรมอนามัย กรมการแพทย์ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข และสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา โดยเก็บอาคารละ 5 ร้านค้า พบว่าอาหารปรุงสำเร็จไม่เข้าเกณฑ์กำหนดคุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (พ.ศ. 2536) โดยพบว่ามีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดต่อกรัมเกินเกณฑ์กำหนดร้อยละ 4.0 และพบเชื้อ *E. coli* ปนเปื้อนในอาหารเกินมาตรฐานร้อยละ 5.8 สำหรับเชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษ *S. aureus* ร้อยละ 6.9 พบมากในอาหารประเภท ข้าวหมูแดง, ข้าวมันไก่ ร้อยละ 18 รองลงมาได้แก่ ขนมจีน ร้อยละ 14 ยำลาบ ร้อยละ 10 พบว่า ร้านอาหารใต้อาคารสำนักงานปลัดกระทรวง มีการปนเปื้อนของเชื้อเกินมาตรฐานร้อยละ 80 รองลงมาได้แก่ ร้านอาหารใต้อาคารกรมควบคุมโรคติดต่อ และกรมการแพทย์ร้อยละ 60 และในอาหารปรุงสำเร็จที่มีการปนเปื้อนของเชื้อเกิน มาตรฐานมากที่สุดได้แก่ อาหารปรุงสำเร็จจากสำนักงานปลัดกระทรวง

สาธารณสุขร้อยละ 24.4 รองลงมา กรมควบคุมโรคติดต่อร้อยละ 21.1 และกรมอนามัยร้อยละ 17.8 การศึกษาครั้งนี้ ไม่พบเชื้อ *C. perfringens, Salmonella* และ *Vibrio parahaemolyticus*

ภานุกิจและคณะ (2546) ตรวจแยกเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์สร้างเอนเทอโรท็อกซินและดื้อยาปฏิชีวนะในตัวอย่างอาหารจากร้านค้าในโรงพยาบาลรัฐบาล จำนวน 277 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อ *S. aureus* ในอาหาร 53 ตัวอย่าง (ร้อยละ 19.13) แยกได้เชื้อ 132 isolates ตัวอย่างอาหารจากร้านค้าในโรงพยาบาลเอกชน 248 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อ *S. aureus* ในอาหาร 41 ตัวอย่าง (ร้อยละ 16.53) แยกเชื้อได้ 100 isolates รวมเชื้อที่ตรวจแยกได้ 232 isolates เป็นสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ coagulase จำนวน 226 isolates เมื่อนำทั้ง 226 isolates มาทดสอบการสร้างเอนเทอโรท็อกซินโดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จ พบว่าเชื้อสร้างเอนเทอโรท็อกซินได้จำนวน 74 isolates (ร้อยละ 32.74) สร้างเอนเทอโรท็อกซินชนิด A, B, C, A&B และ A&C จำนวน 13, 28, 23, 4 และ 6 isolates การตรวจหาสายพันธุ์ที่ดื้อยา โดยทดสอบความไวของเชื้อ *S. aureus* ต่อยาปฏิชีวนะและยาซัลฟา ผลปรากฏว่าเชื้อทุก isolates มีความไวต่อยา oxacillin, ciprofloxacin และ rifampicin คิดเป็นร้อยละ 100 ดื้อยา tetracycline ร้อยละ 43.24 ดื้อยา chloramphenicol ร้อยละ 17.57 และดื้อยา gentamicin ร้อยละ 4.05 มีเชื้อ 2-3 isolates ที่แสดงผลกึ่งกลาง (intermediate) ต่อยา chloramphenicol, vancomycin และ co-trimoxazole

รายงานจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (2546) ว่ามีการพบเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซิน ร้อยละ24 ในปี พ.ศ. 2541 และพบในอัตราเพิ่มขึ้นเป็น ร้อยละ 32 ในปี พ.ศ. 2546

นัยนา (2546) รายงานว่าสถานการณ์การเจ็บป่วยด้วยโรคที่เกิดจากอาหารเป็นสื่อ ยังคงมีแนวโน้มของอัตราป่วยอยู่ในระดับสูง โดยพบว่า ผู้ป่วยส่วนมาก เป็นกลุ่มเด็กอายุ 0-5 ปี กลุ่มนักเรียน เกษตรกร และผู้ใช้แรงงาน อัตราการป่วยของโรคที่มีแนวโน้มสูงขึ้น ได้แก่ โรคอุจจาระร่วงเฉียบพลัน และโรคอาหารเป็นพิษ จากรายงานของกองระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข พบว่า โรคอุจจาระร่วงเฉียบพลัน มีอัตราป่วยสูงสุดในกลุ่มโรค ที่ต้องเฝ้าระวัง และมีแนวโน้มสูงขึ้นอย่างช้าๆ ทุกปี และมีอัตราป่วยสูงสุด ในกลุ่มเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี ในช่วงเดือนมกราคม ถึงมีนาคม โรคอาหารเป็นพิษ พบอัตราป่วยสูงสุด ในกลุ่มเด็กอายุ 0-5 ปี เช่นกัน โดยมีสาเหตุส่วนใหญ่มาจากเชื้อแบคทีเรีย รองลงมา ได้แก่ สารเคมี และยังพบว่า มีการเกิดโรคอาหารเป็นพิษในโรงเรียน ในช่วงระหว่างปี 2534-2542 จำนวน 16 ครั้ง มีนักเรียนป่วยจำนวน 4,369 คน เชื้อที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคสูงสุด คือ เชื้อ *S. aureus*

รายงานการสอบสวนโรคอาหารเป็นพิษ (2547)จังหวัดขอนแก่น มีการเกิดโรคอาหารเป็นพิษ ระหว่างวันที่ 23 - 24 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2547พบผู้ป่วย 204 ราย สรุปได้ว่า ชาวบ้านรับประทานอาหารจากงานเลี้ยงในหมู่บ้าน 214 คน ในวันที่ 23 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2547 เวลาประมาณ 10.00 น. พบผู้ป่วยรายแรกเวลา 14.00 น. และรายสุดท้ายเวลา 18.30 น.ของวันที่ 24 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2547 ระยะเวลาเฉลี่ย 14.9 ชั่วโมง ช่วงเวลาที่พบผู้ป่วยมากที่สุดคือ เวลา 14.00 – 15.00 น. โดยพบผู้ป่วยในช่วงเวลานี้ 112 ราย ผู้ป่วยมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน อุจจาระเหลว ปวดศีรษะ บางรายมีไข้ มีผู้ป่วยทั้งสิ้น 204 ราย ตรวจอุจจาระ ผู้ป่วยจำนวน 204 ราย ผู้สัมผัส 37 ราย ผู้ประกอบอาหาร และผู้จำหน่ายอาหาร 16 ราย ไม่พบเชื้อ ตรวจหาเชื้อจากน้ำประปาในหมู่บ้าน 1 ตัวอย่าง น้ำฝน 1 ตัวอย่าง และน้ำประปาในตลาดสด 1 ตัวอย่าง ไม่พบเชื้อ ตรวจหาเชื้อในอาหารได้แก่ ขนมจีน ขนมหมก และรวมมิตรน้ำกะทิ ผลการตรวจพบเชื้อ *S. aureus* ในรวมมิตรน้ำกะทิ

รายงานการสอบสวนโรคอาหารเป็นพิษ (2549) การสอบสวนโรคอาหารเป็นพิษตำบลหนองตอง อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่ วันที่ 23 - 27 เมษายน 2549 มีวัตถุประสงค์เพื่อยืนยันการเกิดโรคอาหารเป็นพิษ พบผู้ป่วยทั้งหมด จำนวน 16 รายไม่มีผู้เสียชีวิต พบในกลุ่มอายุ 10 -14 ปี มากที่สุด ร้อยละ 50 รองลงมาในกลุ่มอายุ 40 - 44 ปี ร้อยละ 25 เวลาที่ป่วยพบผู้ป่วยทั้งหมด มีอาการในวันที่ 23 เมษายน 2549 ตั้งแต่เวลา 19.00 ถึง 21.00 น. ระยะฟักตัวสั้นที่สุด 2 ชั่วโมง และยาวที่สุด 3 ชั่วโมงครึ่ง ระยะฟักตัวเฉลี่ย 3 ชั่วโมง อาการแสดงมี คลื่นไส้ อาเจียน ถ่ายเหลว ถ่ายเป็นน้ำ และปวดมวนท้อง สาเหตุจากการซื้ออาหารที่ขายในตลาดมารับประทาน ผลการส่งตัวอย่างตรวจทางห้องปฏิบัติการพบว่าเชื้อที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคอาหารเป็นพิษครั้งนี้ คือ *S. aureus*

สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข (2550) ได้รับรายงาน และการตรวจสอบข้อมูลการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยา ระหว่างวันที่ 18 – 24 มีนาคม 2550 พบโรคและเหตุการณ์ที่น่าสนใจ คือ โรงเรียนแห่งหนึ่ง ในตำบลบ้านกลาง อำเภอหล่มสัก จังหวัดเพชรบูรณ์ พบผู้ป่วยจำนวน 62 ราย (อัตราป่วยร้อยละ 17.2) มีอาการปวดท้อง คลื่นไส้ ถ่ายเหลว ปวดศีรษะ อาเจียน เนื่องจากรับประทานอาหารที่น่าสงสัย ประกอบด้วย ข้าวมันไก่ ฮอทดอก ลูกชิ้น น้ำแข็งปั่นเกล็ดหิมะ น้ำปั่น และมีการเก็บตัวอย่างอาหารดังกล่าวเพื่อตรวจสอบ พบผลเบื้องต้นมีการปนเปื้อนเชื้อ *Clostridium perfringens* ในน้ำแข็ง และ *S. aureus* ในน้ำปั่น และมีรายงานการเสียชีวิตผู้ป่วยที่อุจจาระร่วง เนื่องจากรับประทานอาหารสำเร็จรูป อาการของผู้ป่วย คือ มีอาการอ่อนเพลีย ถ่ายเหลว ใจสั่น เหนื่อยง่ายรับประทานอาหารไม่ได้

รายงานการสอบสวนการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษ (2551) การเกิดโรคอาหารเป็นพิษจากการรับประทานอาหารในตำบลมิตรภาพ อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี โดยผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลมวกเหล็ก เป็นประชาชน ตำบลมิตรภาพ อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี อายุ 15 – 77 ปี อายุเฉลี่ย 38 ปี ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีอาการปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียนและปวดศีรษะตามลำดับ ทุกรายเริ่มป่วยวันที่ 7 มกราคม พ.ศ. 2551 ระยะฟักตัวเฉลี่ย 1 ชั่วโมง อาหารที่พบว่ามีสัดส่วนการป่วยสูงได้แก่กุ้งจ่อมทรงเครื่อง โดยพบในกลุ่มผู้ป่วยที่รับประทานกุ้งจ่อมทรงเครื่องมีความเสี่ยงต่อโรคอาหารเป็นพิษสูงเป็น 495 เท่า จึงได้เก็บตัวอย่างอาหารและทำ swab culture ส่วนอื่น ๆส่งตรวจ รพ.ศูนย์ และกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พบเชื้อ *S. aureus* และ *Bacillus cereus*

รายงานการสอบสวนโรคอาหารเป็นพิษ (2551) รายงานการสอบสวนโรคอาหารเป็นพิษในนักเรียน โรงเรียนเทศบาล 4 (วัดโพธิ์อ้น) ตำบลสองพี่น้อง อำเภอสองพี่น้อง จังหวัดสุพรรณบุรี วันที่ 30-31 มกราคม 2551 ทีมเฝ้าระวังสอบสวนเคลื่อนที่เร็ว อำเภอสองพี่น้อง ได้รับแจ้งจากงานอุบัติเหตุฉุกเฉินของโรงพยาบาลสมเด็จพระสังฆราช องค์ที่ 17 เวลา 14.30 น. ของวันที่ 30 มกราคม 2551 ว่ามีกลุ่มนักเรียนป่วยด้วยโรคอาหารเป็นพิษ พบว่าผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลเป็นเด็กนักเรียนโรงเรียนเทศบาล 4 วัดโพธิ์อ้น จำนวน 16 ราย และรักษาตัวเองที่โรงเรียน 12 ราย ทั้งหมดมีอาการไม่รุนแรง ส่วนใหญ่มีอาการปวดท้องอย่างเฉียบพลัน คลื่นไส้แต่ไม่อาเจียน ไม่ถ่ายท้อง เริ่มมีอาการประมาณ 1-4 ชั่วโมงหลังจากรับประทานอาหารกลางวันของโรงเรียน (เวลาประมาณ 11.30 น.) ด้วยลักษณะของระยะฟักตัว (Incubation Period) จากข้อมูลที่ได้จากสิ่งส่งตรวจและการสุ่มเก็บตัวอย่างอาหารพบเชื้อ *S. aureus* ในน้ำส้มคั้น ซึ่งมีปัจจัยเสี่ยงในการก่อโรค คือ ลักษณะการใช้ถ้วยตักแบ่งไม่ถูกหลักสุขาภิบาล มือผู้ขายอาจนำเชื้อโรคหรือสารเคมีปนเปื้อนลงในน้ำส้มได้ น้ำแข็งที่นำมาใส่ เมื่อดูจากกรรมวิธีการผลิต การขนส่ง ก็เป็นอีกสิ่งหนึ่งที่อาจมีการปนเปื้อนได้เช่นกัน

อรุณและคณะ (2551) ได้ทำการศึกษาโดยสำรวจอาหารพร้อมปรุงบรรจุโฟม ที่จำหน่ายในซุปเปอร์มาร์เก็ตจากพื้นที่ กรุงเทพมหานคร นนทบุรี และ ปทุมธานี ว่ามีการปนเปื้อนของโรคอาหารเป็นพิษหรือไม่ เพื่อเป็นข้อมูลให้กับผู้บริโภค หน่วยงานราชการที่รับผิดชอบและห้างสรรพสินค้าที่เป็นผู้จัดจำหน่ายอาหารพร้อมปรุงให้มีการระมัดระวัง มีการควบคุมและแก้ปัญหาที่อาจจะเกิดขึ้นแก่ผู้บริโภคและเจ้าหน้าที่บรรจุอาหารพร้อมปรุง ตรวจวิเคราะห์โดยวิธี Standard Conventional ของ AOAC (1995) พบว่าอาหารพร้อมปรุง 173 ตัวอย่าง จากซุปเปอร์มาร์เก็ต 34 แห่ง มีการปนเปื้อนของเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ 105 ตัวอย่าง (ร้อยละ 60.69) และตรวจพบเชื้อจากซุปเปอร์มาร์เก็ต 33 แห่ง (ร้อยละ97.05) เชื้อที่พบมากที่สุดคือ *Salmonella* sp. 100 ตัวอย่าง (ร้อยละ

57.80) รองลงมาได้แก่ *Clostridium perfringens* 36 ตัวอย่าง (ร้อยละ20.81) และ *S. aureus* 31 ตัวอย่าง (ร้อยละ17.92) สำหรับ *Salmonella* serovars ที่พบมากใน 5 อันดับได้แก่ *Salmonella* Anatum 42 ตัวอย่าง (ร้อยละ42) *Salmonella* Rissen 18 ตัวอย่าง (ร้อยละ18) *Salmonella* Typhimurium 10 ตัวอย่าง (ร้อยละ10) *Salmonella* Panama 8 ตัวอย่าง (ร้อยละ8) และ *Salmonella* London 7 ตัวอย่าง (ร้อยละ7) ในการสำรวจครั้งนี้ไม่พบเชื้อ *Shigella* spp., *Vibrio cholerae* O1, *Vibrio cholerae* O139 และ *Vibrio parahaemolyticus* และพบว่าในห้องเตรียมอาหารแผนกซุปเปอร์มาร์เก็ตมีการปนเปื้อนของเชื้อชนิดเดียวกันปนอยู่ในอาหารพร้อมปรุงหลายชนิดที่ผลิตจากห้องเตรียมอาหารนั้น

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างอาหาร

ในการศึกษานี้จะใช้ตัวอย่างอาหารประเภทอาหารคาว เบเกอรี่ ขนมหวานและน้ำปั่น ทำการสุ่มตัวอย่างอาหารตลอดระยะเวลา 1 ปีสถานที่เก็บตัวอย่าง คือ โรงอาหารมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน 4 ร้านค้า และบริเวณร้านค้าที่จำหน่ายอาหารบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร 4 ร้านค้า

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 Trypticase soy broth (TSB) + 10 % NaCl
2.2 Baird Parker (BP) agar
2.3 Nutrient agar slant
2.4 Mannitol salt phenol red broth

3. อุปกรณ์ในการทดลอง

3.1 อุปกรณ์สำหรับการแยกเชื้อจากตัวอย่างอาหาร
3.1.1 ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ
3.1.2 Stomacher
3.1.3 ตะเกียงแอลกอฮอล์
3.1.4 เครื่องชั่ง
3.1.5 ช้อนอลูมิเนียม
3.1.6 ตู้บ่มเชื้อ
3.1.7 หม้อนึ่งความดันไอ
3.1.8 ตู้อบไอร้อน
3.1.9 จานเพาะเชื้อ

3.1.10 แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยม

3.1.11 ฟลาสก์

3.1.12 หลอดทดลอง

3.1.13 เข็มเขี่ยเชื้อ

3.1.14 ปิเปต

3.1.15 กระบอกตวง

3.1.16 บีกเกอร์

3.1.17 ตู้ Larminar flow

3.1.18 microwave

3.2 อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการย้อมสีแกรม

3.2.1 สไลด์

3.2.2 เข็มเขี่ยเชื้อ

3.2.3 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.2.4 ชุดน้ำยาสำหรับย้อมสีแกรม

3.2.5 กล้องจุลทรรศน์

3.3 อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการทดสอบ catalase test

3.3.1 สไลด์

3.3.2 เข็มเขี่ยเชื้อ

3.3.3 3 % H_2O_2

3.4 อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการทดสอบ coagulase test

3.4.1 สไลด์

3.4.2 หลอดทดลองขนาดเล็ก (12 x 100 มม.)

3.4.3 เข็มเขี่ยเชื้อ

3.4.4 0.85 % NaCl

3.4.5 พลาสมาของคนหรือของกระต่าย

3.5 อุปกรณ์สำหรับการตรวจหาเอนเทอโรท็อกซินโดยวิธี RPLA

3.5.1 Microtiter plate

3.5.2 Automatic pipette พร้อม tip

3.5.3 0.85 % NaCl

3.5.4 ชุดทดสอบ RPLA ซึ่งเป็นชุดทดสอบสำเร็จรูปของ oxoid

3.5.5 Centrifuge

3.5.6 Moisture box

3.5.7 Test tube

วิธีการ

1. การเลือกสถานที่จำหน่ายอาหารเพื่อเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างอาหารที่นำมาศึกษาสุ่มเก็บมาจากร้านค้า 2 ประเภท คือ

ประเภทที่ 1 เลือกจากร้านค้าอาหารภายในบริเวณมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน มีนิสิต ผู้ปฏิบัติงาน และผู้คนภายนอกมาใช้บริการเป็นจำนวนมาก มีการจำหน่ายอาหารตลอดวัน อาหารที่ปรุงแล้วส่วนใหญ่บรรจุวางขายในถาดอลูมิเนียมตั้งไว้บนเค้าเตอร์สูงจากพื้นดินประมาณ 3 – 4 ฟุต โดยที่ไม่มีอะไรปกปิดหรือวางไว้ในตู้กระจกชนิดปิด 3 ด้านเปิดทางด้านผู้ตักอาหาร อาหารที่วางขายมีทั้งที่หมุนเวียนให้ความร้อนและตั้งขายไว้ตั้งแต่ปรุงสำเร็จ โดยทำการสุ่มตัวอย่างอาหารจาก 4 ร้านค้า ดังต่อไปนี้

ร้านค้า A อาหารคาวจะวางในถาดอะลูมิเนียมอยู่ในตู้กระจก ตั้งไว้บนเค้าเตอร์ มีการปรุงอาหารและล้างของภายในร้าน อาหารเป็นประเภทอาหารตักไม่ได้ทำตามสั่ง อาหารประเภทเบเกอรี่จะวางไว้บนถาดพลาสติก ไม่มีอะไรปกปิด วางไว้บนเคาเตอร์ บรรจุภัณฑ์ของอาหารมีการห่อด้วยด้วยถุงพลาสติกหรือกระดาษ มีการจัดร้านเป็นสัดส่วนระหว่างอาหารคาวและหวาน ประเภทขนมหวานและน้ำปั่น ขนมหวานวางไว้บนถาดอะลูมิเนียม อาจใส่ถุงพลาสติกหรือกล่องโฟม น้ำปั่น มีการปอกผลไม้ไว้ก่อนแล้วแช่ในถังแช่แข็ง มีการจัดร้านเป็นสัดส่วน ร้านค้าอยู่ใกล้โรงพยาบาลและหน่วยงานต่างๆ ผู้บริโภคส่วนมากจะมาจากภายนอกมหาวิทยาลัย เปิดขาย 8.30 – 14.00 น.

ร้านค้า B อาหารคาวบรรจุในถาดอะลูมิเนียมวางไว้ในตู้กระจก ตั้งไว้บนเค้าเตอร์ มีการปรุงอาหารและล้างของภายในร้าน อาหารเป็นประเภทอาหารตักไม่ได้ทำตามสั่ง ประเภทเบเกอรี่ อาหารวางไว้บนถาดพลาสติก ไม่มีอะไรปกปิด วางไว้บนเคาเตอร์ บรรจุภัณฑ์ของอาหารมีการห่อด้วยด้วยถุงพลาสติกหรือกระดาษ มีการจัดร้านเป็นสัดส่วนระหว่างอาหารคาวและหวาน แต่พื้นที่ร้านค่อนข้างเล็กทำให้ของในร้านดูแน่น ขนมหวานวางไว้บนถาดพลาสติก อาจใส่ถุงพลาสติกหรือกล่องโฟม มีการตักใส่ถุงก่อนที่จะจำหน่าย น้ำปั่น ทำสำเร็จมาจากบ้าน แล้วตักขาย มีการจัดร้านเป็นสัดส่วน ผู้บริโภคส่วนใหญ่เป็นนิสิตและบุคลากรภายในมหาวิทยาลัย เปิดขาย 7.00 – 18.00 น.

ร้านค้า C อาหารคาว บรรจุในถาดอะลูมิเนียมวางไว้ในตู้กระจก ตั้งไว้บนเค้าเตอร์ อาหารบางชนิดไม่ได้อยู่ในตู้กระจก มีการปรุงอาหารภายในร้านและล้างของภายในร้าน อาหารเป็นประเภทอาหารตักไม่ได้ทำทันที ประเภทเบเกอรี่ อาหารวางไว้บนถาดพลาสติก ไม่มีอะไรปกปิด วางไว้บนเคาเตอร์ บรรจุภัณฑ์ของอาหารมีการห่อด้วยด้วยถุงพลาสติกหรือกระดาษ ขนมหวานวางไว้บนถาดพลาสติก อาจใส่ถุงพลาสติกหรือกล่องโฟม มีการตักใส่ถุงก่อนที่จะจำหน่าย น้ำปั่น ทำสำเร็จมาจากบ้าน แล้วตักขาย มีการจัดร้านเป็นสัดส่วน ผู้บริโภคส่วนใหญ่เป็นนิสิตและบุคลากรภายในมหาวิทยาลัยและหน่วยงานต่างๆ เปิดขาย 07.00 – 17.00 น.

ร้านค้า D อาหารบรรจุในถาดอะลูมิเนียมวางไว้ในตู้กระจก ตั้งไว้บนเค้าเตอร์ อาหารบางชนิดไม่ได้อยู่ในตู้กระจก มีการปรุงอาหารภายในร้านและล้างของภายในร้าน อาหารเป็นประเภทอาหารตักไม่ได้ทำทันที ประเภทเบเกอรี่ อาหารวางไว้บนถาดพลาสติก ไม่มีอะไรปกปิด วางไว้บนเคาเตอร์ บางชนิดมีบรรจุภัณฑ์ มีการห่อด้วยด้วยถุงพลาสติกหรือกระดาษ บางชนิดไม่มีบรรจุภัณฑ์ ขนมหวาน วางไว้บนถาดพลาสติก อาจใส่ถุงพลาสติกหรือกล่องโฟมมีการตักใส่ถุงก่อนที่จะจำหน่าย มีการอุ่นของหวานบ่อย น้ำปั่น มีการปอกผลไม้ไว้ก่อนแล้วแช่ในถังแช่แข็ง ซึ่งแช่กับอาหารคาวด้วย ผู้บริโภคเป็นนิสิตบุคลากรภายในมหาวิทยาลัย และจากภายนอกมหาวิทยาลัย เปิดขาย 07.00 – 20.00 น.

ประเภทที่ 2 เลือกจากร้านค้าที่วางขายทางเท้า บริเวณตลาดสี่แยกเกษตร เป็นร้านค้าที่ตั้งขึ้นเพื่อจุดประสงค์ที่จะจำหน่ายอาหารปรุงสำเร็จสำหรับครอบครัวที่ไม่มีเวลาประกอบอาหาร อาหารบรรจุอยู่ในถาดอลูมิเนียม โดยไม่มีอะไรปกปิด และวางสูงกว่าระดับพื้นทางเดินประมาณ 1 – 2 ฟุต อาหารที่วางขายมีทั้งที่หมุนเวียนให้ความร้อนและตั้งขายไว้เลยตั้งแต่ปรุงสำเร็จ โดยทำการสุ่มตัวอย่างอาหารจาก 4 ร้านค้า ดังต่อไปนี้

ร้านค้า A อาหารคาวบรรจุในถาดอะลูมิเนียมวางไว้ บนเค้าเตอร์ที่มีกระจกปิด มีการปรุงอาหารและล้างของภายในร้าน มีโต๊ะสำหรับนั่งทานในร้าน อาหารเป็นประเภทอาหารตักไม่ได้ทำตามสั่ง ขายตอนเช้าปิดตอนบ่าย ประเภทเบเกอรี่ อาหารวางไว้บนถาดพลาสติก ไม่มีอะไรปกปิด วางไว้บนเคาเตอร์ บรรจุภัณฑ์ของอาหารมีการห่อด้วยด้วยถุงพลาสติก เปิดขายเช้าถึงเย็น ขนมหวานวางไว้บนถาดอะลูมิเนียม ใส่ถุงพลาสติกหรือกล่องโฟม ไม่มีการใส่ถุงไว้ก่อน น้ำปั่น มีการปอกผลไม้ไว้ก่อนแล้วแช่ในถังแช่แข็ง เป็นร้านขายน้ำปั่นอย่างเดียว ขายช่วงเย็น ผู้บริโภคส่วนใหญ่อยู่บริเวณตลาดสี่แยกเกษตรหรือจากที่อื่น

ร้านค้า B อาหารวางไว้บนโต๊ะ ไม่มีอะไรปกปิด มีการตักอาหารใส่ถุงไว้ก่อนจำหน่าย ขายตั้งแต่เช้าจนค่ำ ประเภทเบเกอรี่อาหารวางไว้โต๊ะ ไม่มีอะไรปกปิด บรรจุภัณฑ์ของอาหารมีการห่อด้วยด้วยถุงพลาสติกหรือกระดาษ บางชนิดไม่มีการห่อ เปิดขายช่ายถึงเย็น ขนมหวานวางไว้บนถาดพลาสติก อาจใส่ถุงพลาสติกหรือกล่องโฟม มีการตักใส่ถุงก่อนที่จะจำหน่าย น้ำปั่น ทำสำเร็จมาจากบ้าน แล้วตักขาย ขายตั้งแต่เช้าจดเย็น ผู้บริโภคส่วนใหญ่อยู่บริเวณตลาดสี่แยกเกษตรหรือจากที่อื่น

ร้านค้า C อาหารคาววางไว้บนโต๊ะ ไม่มีอะไรปกปิด มีการตักอาหารใส่ถุงไว้ก่อนจำหน่าย มีการปรุงอาหารสำเร็จจากบ้าน ร้านขายบริเวณทางเท้ามีผู้คนเดินผ่านไปมา ขายตอนบ่ายถึงเย็น ประเภทเบเกอรี่ อาหารวางไว้บนโต๊ะ ไม่มีอะไรปกปิด บรรจุภัณฑ์ของอาหารมีการห่อด้วยถุงพลาสติกหรือกระดาษ บางชนิดไม่มีการห่อ มีการใช้ปากคีบคีบขนม ขนมหวานวางไว้บนถาดพลาสติก อาจใส่ถุงพลาสติกหรือกล่องโฟม มีการตักใส่ถุงก่อนที่จะจำหน่าย บางชนิดต้องใช้ช้อนหรือปากคีบตักใส่ถุง น้ำปั่น มีการปอกผลไม้ไว้ก่อนแล้วแช่ในถังแช่แข็ง เป็นร้านขายน้ำปั่นอย่างเดียว ขายช่วงบ่ายถึงเย็น ผู้บริโภคส่วนใหญ่อยู่บริเวณตลาดสี่แยกเกษตรหรือจากที่อื่น

ร้านค้า D อาหารวางไว้บนถาดพลาสติก ไม่มีอะไรปกปิด มีทั้งอาหารตักและอาหารที่บรรจุใส่ถุงแล้ว ร้านขายช่วงบ่ายถึงเย็น มีโต๊ะสำหรับนั่งทานในร้าน ประเภทเบเกอรี่ อาหารวางไว้บนถาดพลาสติก ไม่มีอะไรปกปิด อาหารส่วนใหญ่ไม่มีบรรจุภัณฑ์ห่อ จะใช้ช้อนตักและปากคีบ ขนมหวานวางไว้บนถาดพลาสติก อาจใส่ถุงพลาสติกหรือกล่องโฟมมีการตักใส่ถุงก่อนที่จะจำหน่าย จะใช้ช้อนตักและปากคีบ น้ำปั่น มีการปอกผลไม้ไว้ก่อนแล้วแช่ในถังแช่แข็งซึ่งแช่กับอาหารคาวด้วย ไม่ได้ขายน้ำปั่นอย่างเดียว ผู้บริโภคส่วนใหญ่อยู่บริเวณตลาดสี่แยกเกษตรหรือจากที่อื่น

2. การเลือกเก็บชนิดตัวอย่างอาหาร

อาหารที่เลือกเก็บมาศึกษาส่วนใหญ่เป็นอาหารที่มีการจำหน่ายอยู่เป็นประจำทุกวัน และหาซื้อได้จากร้านค้าต่างๆในบริเวณทั้ง 2 แห่ง โดยมีผู้ใช้บริการเป็นจำนวนมาก อาจจะมีบางร้านค้าที่ไม่มีการจำหน่ายในวันหยุดราชการ โดยแบ่งรายการอาหารออกเป็น 3 ประเภทคือ ประเภทอาหารคาว ประเภทเบเกอรี่ ประเภทขนมหวานและน้ำปั่น ซึ่งอาหารแต่ละชนิดที่เก็บจะต้องมีจำหน่ายในร้านค้าที่จำหน่ายอาหารทั้ง 2 แหล่ง

ตารางที่ 5 ตัวอย่างอาหารที่เลือกเก็บเป็นตัวอย่าง

ตัวอย่างอาหารที่จำหน่ายภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร		
ประเภทอาหารคาว	**ประเภทเบเกอรี่**	**ประเภทขนมหวานและน้ำปั่น**
แกงเขียวหวาน	เอแคร์	ข้าวต้มมัด
ยำหมูยอ	ขนมปังเนยสด	ข้าวเหนียวหน้าปลา
ไข่เจียว	แซนด์วิชทูน่า	ข้าวเหนียวสังขยา
ข้าวมันไก่	ขนมปังไส้สังขยา	ข้าวโพดหวาน
ไก่ทอดหั่น	ขนมปังไส้หมูหยอง	น้ำส้มปั่น
หมูทอดกระเทียม	โรลช็อคโกแลต	น้ำลิ้นจี่ปั่น
ผัดกระเพราหมูสับ	พายแฮม	น้ำมะพร้าวปั่น
ต้มข่าไก่	เค้กวานิลลา	น้ำแตงโมปั่น
ลาบหมู		
ผัดปลาดุก		
ลูกชิ้นทอด		
ไก่ผัดขิง		
ขนมจีน		
แพนงหมู		

3. การเก็บตัวอย่างอาหาร

ทำการเก็บตัวอย่างอาหารทั้ง 3 ประเภทจากร้านค้าที่จำหน่ายภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน และร้านค้าที่วางขายบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร โดยทำการสุ่มตัวอย่างหลากหลาย เพื่อตรวจว่าพบการปนเปื้อนของเชื้อ *S. aureus* ในอาหารประเภทใดมากที่สุด ซึ่งจะทำการสุ่มดูความหลากหลายของอาหาร 30 ชนิด แสดงรายละเอียดดังตารางที่ 5 ชนิดละ 16 ตัวอย่าง จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 480 ตัวอย่าง เป็นอาหารที่จำหน่ายภายในช่วงเวลาประมาณ 12.00 น. ถึง 15.00 น. และร้านค้าที่วางขายทางเท้าบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร ช่วงเวลา 16.00 น. – 19.00 น. รวมเป็นระยะเวลา 3 เดือน ซึ่งเป็นที่คาดว่าอาหารแต่ละอย่างออกวางขายมาแล้วไม่น้อยกว่า 3-4 ชั่วโมง และเป็นเวลาที่มีผู้ใช้บริการเลือกซื้ออาหารเป็นจำนวนมาก ซึ่งเมื่อสุ่มดูความหลากหลายของอาหารที่พบเชื้อ *S. aureus* มากที่สุดแล้วจะทำการเลือกอาหารดังกล่าวจากทั้ง 2 แห่ง เมื่อได้ตัวอย่างอาหารที่พบเชื้อ *S. aureus* มากที่สุดและบ่อยครั้งที่สุดจากการสุ่มตัวอย่างซ้ำ จะทำการสำรวจเป็นระยะเวลา 1 ปีตั้งแต่เดือนมีนาคม 2551 – กุมภาพันธ์ 2552 ตัวอย่างอาหารที่ซื้อมาทำการศึกษาสำหรับประเภทอาหารคาวกับประเภทขนมหวานและน้ำปั่น เป็นตัวอย่างที่บรรจุในถุงพลาสติกรัดปากถุงด้วยยางยืดส่วนประเภทเบเกอรี่เป็นตัวอย่างที่บรรจุในถุงพลาสติกใสหรือบรรจุกล่องกระดาษหรือบรรจุในกล่องพลาสติกแข็งอย่างดีแล้วทำการทดลองอย่างรวดเร็วที่สุดเมื่อเดินทางมาถึงห้องปฏิบัติการ

4. วิธีการตรวจวิเคราะห์ (Bennett and Lancette, 2001)

4.1 การตรวจนับจำนวน *S. aureus* ในตัวอย่างอาหาร

4.1.1 ชั่งตัวอย่างอาหารชนิดที่เป็นของแข็ง 25 กรัม ส่วนอาหารชนิดเหลวทำการปิเปต 25 ml ด้วยวิธี aseptic technique สำหรับอาหารแข็ง ใส่ถุงพลาสติกที่ใช้กับเครื่อง stomacher

4.1.2 เติม trypticase soy broth + 10 % NaCl ปริมาตร 225 มิลลิลิตร บดด้วยเครื่อง stomacher เป็นเวลา 2 นาที

4.1.3 เจือจางโดยใช้ 0.85% NaCl เป็น 1: 10, 1:100, 1:1,000 และ 1: 10,000 ปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 1:100 1:1,000 และ 1: 10,000 อย่างละ 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหาร Baird parker agar ที่เติม egg yolk และ tellurite ที่ระดับความเจือจางละ 3 จาน

4.1.4 ทำ spread plate โดยใช้แท่งแก้วงอที่ฆ่าเชื้อโดยวิธีจุ่มแอลกอฮอล์แล้วเผาไฟ เกลี่ยตัวอย่างบนอาหาร Baird parker agar ที่เติม egg yolk และ tellurite จนผิวหน้าของอาหารแห้ง นำไปบ่มที่ 35 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของ *S. aureus* ที่มีลักษณะโคโลนีมีสีดำ มันวาว และมีตะกอนขุ่นขาวรอบๆและมีโซนใสวงแคบอยู่รอบโคโลนีอีกชั้นหนึ่ง

4.2 การตรวจวิเคราะห์หา *S. aureus* ในตัวอย่างอาหาร

4.2.1 นำตัวอย่างอาหารจากข้อ 4.1.2 ที่ทำการบ่มที่ 35 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาทำการตรวจหาเชื้อ *S. aureus*

4.2.2 ปิเปตตัวอย่างอาหารจำนวน 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหาร Baird-Parker agar ตัวอย่างละ2 ซ้ำ

4.2.3 spread plate โดยใช้แท่งแก้วงอที่ฆ่าเชื้อโดยวิธีจุ่มแอลกอฮอล์แล้วเผาไฟ เกลี่ยตัวอย่างบนอาหาร Baird-Parker agar จนผิวหน้าของอาหารแห้ง

4.2.4 บ่มเชื้อที่ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4.2.5 คัดเลือกโคโลนีที่มีสีดำ เป็นมันวาว มีตะกอนขุ่นขาวรอบๆและมีโซนใสอยู่นอกโซนขุ่นอีกชั้นหนึ่ง (ภาพที่ 1, ภาคผนวก ง)

4.2.6 restreak ลงบนอาหาร Baird-Parker agar อีกครั้ง

4.2.7 เก็บเชื้อที่แยกได้ลงบนอาหาร nutrient agar slant สำหรับเป็น stock culture บ่มไว้ที่ 35-37 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง หลังจากเชื้อเจริญนำไปเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป (ฆรณี, 2545)

5. การศึกษาลักษณะบางประการของเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้ (Bennett and Lancette, 2001)

5.1 การย้อมสีแกรม เพื่อตรวจดูรูปร่างและการติดสีแกรม

ย้อมสีแกรมและส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า *S. aureus* จะติดสีแกรมบวก รูปร่างกลม อยู่กันเป็นกลุ่ม คล้ายพวงองุ่น (ภาพที่ 2, ภาคผนวก ง)

5.2 การทดสอบการเฟอร์เมนต์น้ำตาล mannitol

5.2.1 เขี่ยเชื้อ *S. aureus* ที่อายุ 24 ชั่วโมง ลงในอาหาร mannitol salt phenol red broth

5.2.2 บ่มหลอดอาหารที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

5.2.3 ตรวจผลการใช้น้ำตาล mannitol แล้วเกิดกรดซึ่ง *S.aureus* สามารถเฟอร์เมนต์น้ำตาล mannitol ได้ทำให้สารบ่งชี้ phenol red เปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง (ภาพที่ 4, ภาคผนวก ง)

5.3 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ catalase

5.3.1 ถ่ายเชื้อที่แยกได้ ลงบนอาหาร nutreint agar slant บ่มไว้ที่ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

5.3.2 หยด 3% H_2O_2 ลงบนแผ่นแก้วสะอาด 1 หยด

5.3.3 ใช้เข็มเขี่ยเชื้อจากข้อ 5.3.1 มาแตะลงในหยด H_2O_2 สังเกตว่ามีฟองแก๊สเกิดขึ้นหรือไม่ ถ้าไม่มีฟองแก๊สเกิดขึ้นแสดงผลเป็นลบ แสดงว่าเชื้อไม่สามารถสร้างเอนไซม์ catalase ได้ ถ้ามีฟองแก๊สเกิดขึ้นแสดงผลเป็นบวก (ภาพที่ 3, ภาคผนวก ง) แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ catalase ได้ปฏิกิริยาดังแสดงในสมการ

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} 2H_2O + O_2$$

การที่มีฟองแก๊สเกิดขึ้นเนื่องมาจากเอนไซม์ catalase ที่เชื้อสร้างขึ้นทำปฏิกิริยาย่อยสลาย H_2O_2 ซึ่งเป็นสับสเตรทของเอนไซม์ catalase แล้วให้แก๊สออกซิเจนออกมา (Bartelt, 2000)

5.4 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ coagulase

5.4.1 เพาะเชื้อที่แยกได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ trypticase soy broth นำไปบ่มที่ 35-37 องศาเซลเซียสเป็น เวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตการณ์เจริญโดยดูจากความขุ่น

5.4.2 เจือจางพลาสมากระต่าย โดยใช้ 0.85% NaCl ในอัตราส่วนเท่ากับ 1 : 2

5.4.3 ปิเปตพลาสมากระต่ายที่เจือจางแล้วลงในหลอดทดสอบขนาด 12 X 100 มิลลิเมตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

5.4.4 ปิเปต suspension ของเชื้อ *S.aureus* (อายุ 18-24 ชั่วโมง) ใน trypticase soy broth ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่ใส่พลาสมากระต่ายแล้วผสมให้เข้ากัน

5.4.5 นำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ตรวจผลทุกชั่วโมง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ถ้ายังไม่เกิดการแข็งตัวของพลาสมาให้บ่มต่อจนครบ 24 ชั่วโมง บันทึกผลการสร้างเอนไซม์ coagulase โดยใช้เครื่องหมาย +1, +2, +3, +4 ตามลำดับของการแข็งตัวจากน้อยไปมาก และเครื่องหมาย – แสดงถึงพลาสมาไม่แข็งตัวเลย แสดงว่าเชื้อไม่สร้างเอนไซม์ coagulase (ภาพที่ 6, ภาคผนวก ง)

5.5 การทดสอบการทนเกลือ

ทำการทดลองโดยใช้อาหาร TSB + 10% NaCl เพาะเชื้อที่แยกได้แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยดูการเจริญของเชื้อ (ภาพที่ 5, ภาคผนวก ง)

6. การทดสอบการสร้างเอนเทอโรท็อกซิน (พัชรี, 2548)

6.1 ถ่ายเชื้อ *S.aureus* ที่ให้ผลบวกในการสร้างเอนไซม์ coagulase ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutreint agar slant บ่มไว้ที่ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

6.2 เพาะเชื้อจากข้อ 6.1 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ trypticase soy broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร

6.3 บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่า (incubater shaker) ที่ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

6.4 แยกเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำเอาส่วนใส (supernatant) ไปทดสอบการสร้างเอนเทอโรท็อกซินโดยวิธี Reverse passive latex agglutination (RPLA) ต่อไป

7. การตรวจหาเอนเทอโรท็อกซินโดยวิธี Reverse Passive Latex Agglutination (RPLA) (Park and Szabo, 1986)

ใช้ชุดทดสอบ RPLA เป็นชุดทดสอบสำเร็จรูปของ oxoid (ภาพที่ 7, ภาคผนวก ง) ที่ผลิตโดยการเคลือบผิวเม็ด latex ด้วย IgG บริสุทธิ์ต่อเอนเทอโรท็อกซินชนิดต่างๆของเชื้อ *S. aureus* ในการนำไปใช้ตรวจหาเอนเทอโรท็อกซินนั้นอาศัยปฏิกิริยาการตกตะกอนของเม็ด latex ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาของแอนติบอดีที่เคลือบบนผิวเม็ด latex กับเอนเทอโรท็อกซินแต่ละชนิดที่เชื้อสร้างขึ้นในอาหาร

ข้อควรระวัง : latex ที่เคลือบด้วยแอนติบอดีจะอยู่ในขวด ลักษณะเป็น suspension จะต้องเขย่าขวดอย่างดีก่อนใช้ เพื่อให้เม็ด latex กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ

7.1 ดูดตัวอย่างที่ต้องการตรวจหาเอนเทอโรท็อกซิน ใส่ลงในหลุมของ microtiter plate แถวละ 2 หลุม (แถวที่ 1-แถวที่ 4) จำนวนหลุมละ 25 ไมโครลิตร

7.2 ในแถวที่ 1 ปิเปต latex ที่เคลือบด้วย anti-enterotoxin A จำนวน 25 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมของ microtiter plate 2 หลุม

7.3 ในแถวที่ 2 ปิเปต latex ที่เคลือบด้วย anti- enterotoxin B จำนวน 25 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมของ microtiter plate 2 หลุม

7.4 ในแถวที่ 3 ปิเปต latex ที่เคลือบด้วย anti- enterotoxin C จำนวน 25 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมของ microtiter plate 2 หลุม

7.5 ในแถวที่ 4 ปิเปต latex ที่เคลือบด้วย anti- enterotoxin D จำนวน 25 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมของ microtiter plate 2 หลุม

7.6 ในแถวที่ 5 เตรียมเป็น positive control สำหรับ enterotoxin A โดยจะดูดเอนเทอโรท็อกซินA จำนวน 25 ไมโครลิตร ผสมกับ latex ที่เคลือบด้วย anti- enterotoxin A จำนวน 25 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมของ microtiter plate 2 หลุม

7.7 ในแถวที่ 6 เตรียมเป็น negative control โดยจะปิเปต latex ที่ไม่ได้เคลือบด้วย anti- enterotoxin ชนิดใดเลย จำนวน 25 ไมโครลิตร ลงในหลุม แล้วปิเปตตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการตรวจการสร้างสารพิษ จำนวน 25 ไมโครลิตรใส่ลงในหลุมทำ 2 หลุม

7.8 เมื่อใส่สารครบหมดทุกหลุมแล้วให้เคาะ plate ด้านข้างกับฝ่ามือเบาๆหลายๆครั้งระวังอย่าให้ส่วนผสมหกออกนอกหลุมเพื่อให้สารทุกอย่างผสมเข้ากันดีหรืออาจจะใช้ micromixer ช่วยก็ได้

7.9 ใส่ plate ในกล่องความชื้นแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง

8. การทดสอบความไวของเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินต่อสารปฏิชีวนะ methicillin และ vancomycin โดยวิธี Kirby-Bauer method (Bauer *et al.*,1966)

เมื่อทดสอบการสร้างเอนเทอโรท็อกซินแล้ว นำทุกสายพันธุ์ที่พบว่าสร้างเอนเทอโรท็อกซินไปตรวจหาสายพันธุ์ที่ดื้อยาโดยทำการทดสอบดังนี้

8.1 ถ่ายเชื้อที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินชนิดต่างๆจาก stock culture ลงใน nutrient ager slant บ่มเชื้อที่ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

8.2 เขี่ยเชื้อจากข้อ 8.1 ใส่ลงในอาหาร brain heart infusion ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอด 4 มิลลิลิตร นำไปบ่มเชื้อในตู้บ่ม 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 ชั่วโมง

8.3 เจือจางเชื้อในข้อ 8.2 โดยใช้ 0.85 % NaCl ให้ได้ความขุ่นเท่ากับความขุ่นมาตรฐานของMc. Farland no. 0.5 (เตรียมจาก 1 % $BaCl_2$ 0.05 มิลลิลิตร และ 1 % H_2SO_4 9.95 มิลลิลิตร) เพื่อให้เชื้อเริ่มต้นมีปริมาณเท่าๆกันในแต่ละเชื้อและในแต่ละครั้งของการทดสอบ

8.4 เทอาหาร Mueller Hinton agar ลงในจานอาหาร แล้วต้องอบผิวหน้าอาหารให้แห้งประมาณ 30 นาที ก่อนเพาะเลี้ยง การเพาะเชื้อใช้ไม้พันสำลี (cotton swab) ที่อบฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงในหลอดเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมในข้อ 8.3 ถ้าชุ่มเกินไปให้แตะและหมุนตรงปลายสำลีกับข้างหลอดแก้วเสียก่อน แล้วจึงนำไปป้ายบนผิวหน้าอาหาร โดยป้ายเป็น 3 ระนาบให้ทั่วผิวหน้าอาหาร

8.5 ปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที เพื่อให้ผิวหน้าที่มีเชื้อแบคทีเรียค่อนข้างแห้งเสียก่อนแล้วจึงใช้ปากคีบๆ แผ่นยาวางบนผิวหน้าอาหาร ใช้ปากคีบกดแผ่นยาเบาๆให้ติดแนบกับพื้น agar (ปากคีบต้องผ่านการฆ่าเชื้อโดยจุ่มแอลกอฮอล์แล้วเผาไฟเสียก่อนใช้งาน) เสร็จแล้วนำ จานเพาะเชื้อไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

ผลและวิจารณ์

1. การเลือกเก็บชนิดตัวอย่างอาหาร

อาหารที่เลือกเก็บมาศึกษาส่วนใหญ่เป็นอาหารที่มีการจำหน่ายอยู่เป็นประจำทุกวัน และหาซื้อได้จากร้านค้าต่างๆในบริเวณทั้ง 2 แห่ง จากการสุ่มตัวอย่างอาหารทั้งหมด 480 ตัวอย่าง ที่หลากหลายชนิดจากร้านค้าที่จำหน่ายภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน และบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร เพื่อตรวจหาเชื้อ *S. aureus* แบ่งออกเป็นทั้ง 3 ประเภท คือ ประเภทอาหารคาวแห่งละ 112 ตัวอย่าง ประเภทเบเกอรี่แห่งละ 64 ตัวอย่าง ประเภทขนมหวานและน้ำปั่นแห่งละ 64 ตัวอย่าง ใช้ตัวอย่างอาหารทั้งหมด 480 ตัวอย่าง แสดงรายละเอียดในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 จำนวนตัวอย่างอาหาร แยกตามสถานที่เก็บตัวอย่างและประเภทของตัวอย่างอาหาร

ร้านค้าภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์		ร้านค้าบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร		รวม
ประเภทของอาหาร	จำนวนตัวอย่างอาหาร	ประเภทของอาหาร	จำนวนตัวอย่างอาหาร	
อาหารคาว	112	อาหารคาว	112	224
เบเกอรี่	64	เบเกอรี่	64	128
ขนมหวานและน้ำปั่น	64	ขนมหวานและน้ำปั่น	64	128
รวม	240	รวม	240	480

2. การตรวจนับจำนวน *S. aureus* ในตัวอย่างอาหาร

เมื่อพิจารณาจากสถานที่จำหน่ายอาหารทั้ง 2 แห่ง คือ ร้านอาหารที่จำหน่ายภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน และบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร เก็บตัวอย่างอาหารละ 2 ซ้ำ จำนวนร้านค้าที่จำหน่ายอาหารสถานที่ละ 4 แห่ง แบ่งเป็นประเภทอาหารคาวแห่งละ 112 ตัวอย่าง ประเภทเบเกอรี่แห่งละ 64 ตัวอย่าง ประเภทขนมหวานและน้ำปั่นแห่งละ 64 ตัวอย่าง จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 480 ตัวอย่าง 30 ชนิด แสดงรายละเอียดดังตารางที่ 5 จากผลการทดลองพบว่า ตัวอย่างอาหารคาวภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และร้านค้าบริเวณตลาดสี่แยกเกษตรพบเชื้อ *S.aureus* จากตัวอย่างอาหารข้าวมันไก่มากที่สุด ($2.4x10^6$ CFU/g, $3.2x10^6$ CFU/g) ตามลำดับ แสดงรายละเอียดดังตารางที่ 7 เนื่องจากข้าวมันไก่เป็นอาหารที่มีการสัมผัสกับมือของผู้ขายไม่ว่าผู้ขายนั้นจะสวมถุงมือหรือว่าไม่สวมถุงมือก็ตาม เพราะ *S.aureus* เป็นเชื้อที่พบตามส่วน

ต่างๆของร่างกาย เช่น ผิวหนัง ในจมูก คอ และผม เป็นแหล่งสำคัญที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนในอาหาร โดยในรูจมูกและผิวหนังจะพบเชื้อร้อยละ 10 -40 และพบเชื้อปริมาณมากกว่า 10^3 CFU/swab (Varnam, 1991) และอาจมีการตั้งอาหารทิ้งไว้เป็นระยะเวลานานก่อนออกสู่การจำหน่าย จึงเป็นสาเหตุให้พบเชื้อ *S.aureus* ในปริมาณที่สูงเมื่อเทียบกับอาหารชนิดอื่นที่ทำการทดลอง ในอาหารประเภทเบเกอรี่พบเชื้อ *S.aureus* จากตัวอย่างอาหารแซนด์วิชทูน่ามากที่สุด ($1.4x10^6$ CFU/g, $2.6x10^6$ CFU/g) ตามลำดับ แสดงรายละเอียดดังตารางที่ 8 แซนด์วิชทูน่าเป็นอาหารที่มีการสัมผัสกับมือผู้ขายตลอดเวลา ไม่ว่าจะเป็นขั้นตอนการตัดขนมปัง การบรรจุไส้ การห่อแซนด์วิช โดยส่วนใหญ่แล้วผู้ขายมักจะไม่สวมถุงมือหรือว่าสวมถุงมือเมื่อถอดแล้วก็ใช้ถุงมือเดิมและมีการนำออกวางขายตั้งแต่เช้าจนกระทั่งเย็น โดยทั่วไปปริมาณเชื้อ *S. aureus* จะต้องมีปริมาณมากถึง $10^5 – 10^6$ CFU/g ของอาหาร จึงจะสร้างสารพิษเอนเทอโรท็อกซินได้มากพอที่จะก่อโรคอาหารเป็นพิษ จากผลการทดลองจำนวนเชื้อที่พบทำให้เกิดโทษแก่ผู้บริโภค และเมื่อมีการวางขายเป็นระยะเวลานานทำให้เชื้อมีการเจริญมากยิ่งขึ้นและมากพอจนสามารถสร้างเอนเทอโรท็อกซินปนเปื้อนลงสู่อาหารเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ประเภทขนมหวานและน้ำปั่นจากร้านค้าภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน พบเชื้อ *S. aureus* จากตัวอย่างอาหารข้าวเหนียวสังขยามากที่สุด ($6.4x10^6$ CFU/g) ข้าวเหนียวสังขยา มีส่วนประกอบที่ทำจากนม ไข่ กะทิ ซึ่ง Varnam (1991) กล่าวไว้ว่าอาหารประเภทนี้มักตรวจพบเชื้อ *S. aureus* Peterson *et al*. (1962) ก็ได้มีรายงานสำหรับอาหารประเภทที่มีแป้งและน้ำตาลเป็นส่วนประกอบอยู่มาก ซึ่งจัดเป็นอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อ *S. aureus* นั้นส่งผลให้แบคทีเรียชนิดอื่นๆ เจริญแข่งขันกับเชื้อ *S. aureus* ได้น้อยลง ส่งผลให้พบเชื้อ *S. aureus* จำนวนมากกว่าอาหารชนิดอื่นๆ จากร้านค้าบริเวณตลาดสี่แยกเกษตรพบเชื้อ *S. aureus* จากตัวอย่างน้ำแตงโมปั่นมากที่สุด ($6.8x10^6$ CFU/ml) เนื่องจากน้ำแตงโมปั่นต้องมีการปอกเปลือกและมือของผู้ขายได้มีการสัมผัสกับแตงโม หรืออาจมีการปอกแตงโมทิ้งไว้เป็นระยะเวลานานและไม่ได้ทำความสะอาดก่อนที่จะนำมาปั่น แสดงรายละเอียดดังตารางที่ 9 จากผลการทดลองต้องดูชนิดของตัวอย่างอาหารว่าชนิดไหนพบเชื้อ *S.aureus* ในปริมาณที่ค่อนข้างสูงและพบบ่อยโดยเลือกการพบเชื้อ *S.aureus* ในระดับ $10^3 – 10^6$ และมีการพบเชื้อจากทั้งสองสถานที่ในปริมาณที่จะทำให้เกิดอันตรายแก่ผู้บริโภค และจากการเปรียบเทียบและวิเคราะห์พบว่าตัวอย่างอาหารที่ทำการคัดเลือกและจะนำมาสุ่มตัวอย่างเป็นระยะเวลา 1 ปี แบ่งเป็นประเภทอาหารคาว 3 ชนิด คือ ข้าวมันไก่ ไก่ทอดหั่น หมูทอดกระเทียม ประเภทเบเกอรี่ 2 ชนิด คือ แซนด์วิชทูน่า ขนมปังไส้สังขยา ประเภทขนมหวานและน้ำปั่น 4 ชนิดคือ ข้าวเหนียวสังขยา ข้าวเหนียวหน้าปลา น้ำแตงโมปั่น น้ำลิ้นจี่ปั่น (ตารางที่ 10) ซึ่งจะพบว่าเป็นอาหารที่สัมผัสกับมือและมีการสัมผัสกับอุปกรณ์ภาชนะที่ใส่อาหาร จำนวนโคโลนี *S.aureus* ที่นับได้จากตัวอย่างอาหารพบปริมาณค่อนข้างสูงและเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ตามข้อกำหนดของการควบคุมคุณภาพอาหารทางด้านจุลชีววิทยา

กำหนดไว้ว่าอาหารที่มีสุขลักษณะที่ดี จะต้องตรวจไม่พบจุลินทรีย์ก่อโรครวมทั้ง *S. aureus* ด้วย (พระราชบัญญัติอาหาร, 2522)

ตารางที่ 7 จำนวนเชื้อ *S. aureus* จากตัวอย่างอาหารคาวภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน และบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร

ตัวอย่าง	จำนวนโคโลนี *S.aureus* (CFU/g)	
	ภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ตลาดสี่แยกเกษตร
แกงเขียวหวาน	0	<30 CFU/plate
ยำหมูยอ	<30 CFU/plate	$1x10^2$
ไข่เจียว	<30 CFU/plate	<30 CFU/plate
ข้าวมันไก่	$2.4x10^6$	$3.2x10^6$
ไก่ทอดหั่น	$1.4x10^3$	$1.8x10^5$
หมูทอดกระเทียม	$1.2x10^5$	$2.5x10^5$
ผัดกระเพราหมูสับ	<30 CFU/plate	0
ต้มข่าไก่	0	<30 CFU/plate
ลาบหมู	$2.1x10^2$	<30 CFU/plate
ผัดปลาดุก	0	0
ลูกชิ้นทอด	0	0
ไก่ผัดขิง	<30 CFU/plate	<30 CFU/plate
ขนมจีน	<30 CFU/plate	<30 CFU/plate
แพนงหมู	0	<30 CFU/plate

ตารางที่ 8 จำนวนเชื้อ *S. aureus* จากตัวอย่างประเภทเบเกอรี่ภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน และบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร

ตัวอย่าง	จำนวนโคโลนี *S. aureus* (CFU/g)	
	ภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ตลาดสี่แยกเกษตร
ขนมปังเนยสด	0	<30 CFU/plate
เอแคล์	<30 CFU/plate	<30 CFU/plate
แซนด์วิชทูน่า	$1.4x10^6$	$2.6x10^6$
ขนมปังไส้สังขยา	$1.6x10^4$	$5.2x10^5$
ขนมปังไส้หมูหยอง	0	0
โรลช็อคโกแลต	0	0
พายแฮม	<30 CFU/plate	0
เค้กวานิลลา	0	0

ตารางที่ 9 จำนวนเชื้อ *S. aureus* จากตัวอย่างอาหารประเภทขนมหวานและน้ำปั่นภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน และบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร

ตัวอย่าง	จำนวนโคโลนี *S.aureus* ที่นับได้จากตัวอย่างอาหาร (CFU/g)	
	ภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ตลาดสี่แยกเกษตร
ข้าวต้มมัด	<30 CFU/plate	0
ข้าวเหนียวสังขยา	$6.4x10^6$	$2.3x10^4$
ข้าวเหนียวหน้าปลา	$1.3x10^4$	$5.3x10^6$
ข้าวโพดหวาน	$1.2x10^2$	0
น้ำส้มปั่น (CFU/ml)	0	0
น้ำแตงโมปั่น (CFU/ml)	$4.3x10^6$	$6.8x10^6$
น้ำลิ้นจี่ปั่น (CFU/ml)	$2.1x10^5$	$1.5x10^6$
น้ำมะพร้าวปั่น (CFU/ml)	0	<30 CFU/plate

ตารางที่ 10 ตัวอย่างอาหารที่ทำการคัดเลือกและนำมาสุ่มเก็บตัวอย่างเป็นระยะเวลา 1 ปี

ตัวอย่าง	จำนวนโคโลนี *S.aureus* ที่นับได้จากตัวอย่างอาหาร	
	ภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ตลาดสี่แยกเกษตร
ประเภทอาหารคาว		
ข้าวมันไก่	$2.4x10^6$	$3.2x10^6$
ไก่ทอดหั่น	$1.4x10^3$	$1.8x10^5$
หมูทอดกระเทียม	$1.2x10^5$	$2.5x10^5$
ประเภทเบเกอรี่		
แซนด์วิชทูน่า	$1.4x10^6$	$2.6x10^6$
ขนมปังไส้สังขยา	$1.6x10^4$	$5.2x10^5$
ประเภทขนมหวานและน้ำปั่น		
ข้าวเหนียวหน้าปลา	$1.3x10^4$	$5.3x10^6$
ข้าวเหนียวสังขยา	$6.4x10^6$	$2.3x10^4$
น้ำแตงโมปั่น	$4.3x10^6$	$6.8x10^6$
น้ำลิ้นจี่ปั่น	$2.1x10^5$	$1.5x10^6$

3. การตรวจวิเคราะห์หา *S. aureus* ในตัวอย่างอาหารเป็นระยะเวลา 1 ปี

ในการสุ่มตัวอย่างอาหารที่คัดเลือกเป็นระยะเวลา 1 ปีโดยทำการสุ่มตัวอย่างจากร้านค้าที่จำหน่ายภายในที่จำหน่ายภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน 4 ร้านค้าและบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร 4 ร้านค้า เดือนละ 36 ตัวอย่างจากชนิดของอาหาร 9 ชนิด ที่ทำการคัดเลือกมาแล้ว แบ่ง เป็นประเภทอาหารคาวแห่งละ 144 ตัวอย่าง ประเภทเบเกอรี่แห่งละ 96 ตัวอย่าง ประเภทขนมหวานและน้ำปั่นแห่งละ 192 ตัวอย่าง รวมตัวอย่างทั้งหมด 864 ตัวอย่าง (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 จำนวนตัวอย่างอาหารที่ทำการสุ่มเป็นระยะเวลา 1 ปี แยกตามประเภทของสถานที่และประเภทของตัวอย่างอาหาร

ร้านค้าภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์		ร้านค้าบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร		รวม
ประเภทของอาหาร	จำนวนตัวอย่างอาหาร	ประเภทของอาหาร	จำนวนตัวอย่างอาหาร	
อาหารคาว	144	อาหารคาว	144	288
เบเกอรี่	96	เบเกอรี่	96	192
ขนมหวานและน้ำปั่น	192	ขนมหวานและน้ำปั่น	192	384
รวม	432	รวม	432	864

จากผลการทดลองทำการสุ่มตัวอย่างอาหารจากอาหารที่จำหน่ายภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 432 ตัวอย่าง จำนวนตัวอย่างอาหารที่พบเชื้อ 142 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 32.87 จำนวนเชื้อที่แยกได้ 172 isolates ตัวอย่างอาหารที่จำหน่ายบริเวณตลาดสี่แยกเกษตรจำนวน 432 ตัวอย่าง จำนวนตัวอย่างอาหารที่พบเชื้อ 163 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 37.73 จำนวนเชื้อที่แยกได้ 195 isolates รวมเชื้อที่แยกได้ 367 isolates (ตารางที่ 12) และเมื่อตรวจลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบทางชีวเคมีคือ การย้อมแกรม, การทดสอบเอนไซม์ catalase, การทดสอบการเฟอร์เมนต์น้ำตาล mannitol, การทดสอบการทน 10% NaCl และการทดสอบการสร้างเอนไซม์ coagulase ก่อนที่จะทำการตรวจหาเชื้อสายพันธุ์ที่สามารถสร้างเอนเทอโรท็อกซินจำเป็นจะต้องทดสอบคุณสมบัติของเชื้อว่ามีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ coagulase ได้หรือไม่ ทั้งนี้เนื่องจากการสร้างเอนเทอโรท็อกซินของเชื้อ *S. aureus* ส่วนใหญ่จะสัมพันธ์กับการสร้างเอนไซม์ coagulase กล่าวคือสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ coagulase ก็มักจะสร้างเอนเทอโรท็อกซินได้ด้วย (สุมาลี, 2518) ซึ่งเชื้อ *S. aureus* 172 isolates ที่แยกได้จากร้านค้าที่จำหน่ายภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พบเชื้อที่สร้าง coagulase จำนวน 165 isolates และ *S. aureus* 195 isolates ที่แยกได้จากร้านค้าบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร พบเชื้อที่สร้าง coagulase จำนวน 170 isolates จำนวนเชื้อ *S. aureus* ที่สร้าง coagulase ที่แยกได้ทั้งหมด 335 isolates

ตารางที่ 12 จำนวนเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหาร ที่จำหน่ายภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร

	อาหารที่จำหน่ายภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	อาหารที่จำหน่ายบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร	รวม
จำนวนตัวอย่างอาหาร	432	432	864
จำนวนตัวอย่างอาหารที่พบเชื้อ	142 (ร้อยละ32.87)	163 (ร้อยละ37.73)	305 (ร้อยละ35.30
จำนวนเชื้อที่แยกได้ (isolates)	172	195	367

ในตารางที่ 13 -15 แสดงจำนวนเชื้อ *S. aureus* ที่สร้างและไม่สร้างเอนไซม์ coagulase แยกตามแหล่งที่มาของตัวอย่างอาหาร เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างเปอร์เซ็นต์ของเชื้อที่สร้างและไม่สร้างเอนไซม์ coagulase ระหว่างเชื้อที่แยกได้จากอาหารที่จำหน่ายภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร ปรากฏว่า มีค่าใกล้เคียงกัน กล่าวคือ เชื้อที่ตรวจแยกได้จากร้านค้าที่จำหน่ายภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จำนวน 172 isolates เป็นเชื้อที่สร้างเอนไซม์ coagulase 165 isolates คิดเป็นร้อยละ 95.93 และเป็นเชื้อที่ไม่สร้างเอนไซม์ coagulase 7 isolates คิดเป็นร้อยละ 4.07 ส่วนเชื้อที่ตรวจแยกได้จากร้านค้าบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร จำนวน 195 isolates เป็นเชื้อที่สร้างเอนไซม์ coagulase 170 isolates คิดเป็น ร้อยละ 87.18 และเป็นเชื้อที่ไม่สร้างเอนไซม์ coagulase 25 isolates คิดเป็นร้อยละ 12.82 ดังนั้นจำนวนเชื้อ *S. aureus* ที่ตรวจแยกได้รวมทั้งสิ้น 367 isolates พบว่าเป็นสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ coagulase 335 isolates คิดเป็นร้อยละ 91.28 และเป็นสายพันธุ์ที่ไม่สร้างเอนไซม์ coagulase จำนวน 32 isolates คิดเป็น ร้อยละ 8.72 หลังจากที่ทดสอบลักษณะของเชื้อแล้วสามารถยืนยันได้ว่าตัวอย่างอาหารที่นำมาตรวจวิเคราะห์นั้นมีการปนเปื้อนของเชื้อ *S. aureus* การตรวจพบเชื้อนั้นอาจจะแสดงถึงการปนเปื้อนของเชื้อจากผู้สัมผัสอาหาร เช่น ผิวหนังช่องปาก จมูก มือและเล็บ อันแสดงถึงสุขลักษณะของผู้ประกอบอาหารจากร้านค้าในมหาวิทยาลัยและบริเวณตลาดสี่แยกเกษตรแต่ละแห่งหรืออาจจะเนื่องมาจากภาชนะอุปกรณ์และเครื่องมือในการประกอบอาหารไม่สะอาดเพียงพอ นอกจากนี้อาจจะเกิดจากการปนเปื้อนภายหลังการประกอบอาหารแล้ว (post contamination) เช่น จากฝุ่นละออง จากผู้ประกอบอาหารเอง หรือจากสภาพแวดล้อมในบริเวณจำหน่ายอาหารด้วย เช่น ผู้บริโภคที่มาใช้บริการ เนื่องจากเชื้อ *S. aureus* สามารถสร้างเอนเทอโรท็อกซินขึ้นในอาหารได้ถ้าอาหารนั้นๆอยู่ในสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญ สารพิษดังกล่าวจะทำให้เกิดโทษกับผู้บริโภคได้นั้นจะต้องมีปริมาณไม่ต่ำ

กว่า 0.1-1.0 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัมอาหาร ปริมาณเชื้อจะต้องมากถึง 10^6 เซลล์ต่อกรัมอาหารดังนั้น ถึงแม้ว่าเชื้อจะสร้างเอนเทอโรท็อกซินได้แต่ถ้าเซลล์มีปริมาณต่ำกว่า 10^6 เซลล์ต่อกรัมอาหารก็อาจจะไม่สามารถสร้างเอนเทอโรท็อกซินได้มากพอที่จะเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค และจากข้อมูลที่เกี่ยวกับเชื้อ *S. aureus* ว่าเชื้อที่สร้างเอนไซม์ coagulase ส่วนใหญ่มักจะสร้างเอนเทอโรท็อกซิน (Murray *et al*.,1994 ; Murray *et al*.,1998 ; Mahon *et al*., 2000) จึงได้นำเฉพาะเชื้อสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ coagulase รวมทั้งสิ้นจำนวน 335 isolates มาตรวจสอบการสร้างเอนเทอโรท็อกซินโดยเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร trypticase soy broth หลังจากบ่มเชื้อครบเวลาแล้ว นำมาปั่นเหวี่ยงแยกเอาอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรวจหาเอนเทอโรท็อกซินโดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป (ภาพที่7, ภาคผนวก ง) ด้วยวิธี reverse passive latex agglutination (RPLA)

ตารางที่ 13 จำนวนเชื้อ *S. aureus* ที่สร้างและไม่สร้างเอนไซม์ coagulase จากร้านค้าที่จำหน่ายภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน และบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร

สถานที่	จำนวนเชื้อ *S.aureus* ที่พบ	*S.aureus* ที่สร้าง coagulase		*S.aureus* ที่ไม่สร้าง coagulase	
		จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ
ภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	172	165	95.93	7	4.07
ตลาดสี่แยกเกษตร	195	170	87.18	25	12.82
รวม	367	335	91.28	32	8.72

ตารางที่ 14 จำนวนเชื้อ *S. aureus* ที่สร้างและไม่สร้างเอนไซม์ coagulase แยกตามร้านค้าที่จำหน่ายภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สถานที่	จำนวนเชื้อ *S.aureus* ที่พบ	*S.aureus* ที่สร้าง coagulase		*S.aureus* ที่ไม่สร้าง coagulase	
		จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ
ร้านค้า A	43	43	100	0	0
ร้านค้า B	25	22	88	3	12
ร้านค้า C	48	45	93.75	3	6.25
ร้านค้า D	56	55	98.21	1	1.79
รวม	172	165	95.93	7	4.07

ตารางที่ 15 จำนวนเชื้อ *S. aureus* ที่สร้างและไม่สร้างเอนไซม์ coagulase แยกตามร้านค้าบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร

สถานที่	จำนวนเชื้อ *S.aureus* ที่พบ	*S.aureus* ที่สร้าง coagulase		*S.aureus* ที่ไม่สร้าง coagulase	
		จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ
ร้านค้า A	56	50	89.29	6	10.71
ร้านค้า B	43	39	90.70	4	9.30
ร้านค้า C	36	32	88.89	4	11.11
ร้านค้า D	60	49	81.67	11	18.33
รวม	195	170	87.18	25	12.82

4. การตรวจหาเอนเทอโรท็อกซินโดยวิธี Reverse Passive Latex Agglutination (RPLA)

เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างร้อยละที่พบเชื้อที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินในตัวอย่างอาหารจากร้านค้าที่จำหน่ายภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน และร้านค้าที่จำหน่ายบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร ปรากฏว่าในตัวอย่างอาหารจากร้านค้าที่จำหน่ายภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พบเชื้อที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินในร้อยละที่ใกล้เคียงกันกับตัวอย่างอาหารจากร้านค้าบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร กล่าวคือ ตัวอย่างอาหารจากร้านค้าภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พบเชื้อที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินจำนวน 61 isolates จาก 165 isolates คิดเป็นร้อยละ 36.97 ส่วนตัวอย่างอาหารจากร้านค้าบริเวณตลาดสี่แยกเกษตรพบเชื้อที่สร้างเอนเทอโรท็อกซิน 76 isolates จาก 170 isolates คิดเป็นร้อยละ 44.71 จากผลการทดลอง พบเชื้อที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินชนิด A, B, C, A&B, A&C และA&B&C&D จำนวน 31, 41, 21, 20, 23 และ 1 isolates ตามลำดับ (ตารางที่ 16) แต่จากการทดลองในครั้งนี้มีข้อจำกัดในการตรวจหาเอนเทอโรท็อกซินชนิดอื่นๆ ทั้งนี้เนื่องจากชุดทดสอบสำเร็จรูปที่ใช้ในการทดลองสามารถตรวจสอบได้เฉพาะเอนเทอโรท็อกซินชนิด A-D เท่านั้น ซึ่งอาจจะทำให้ไม่ได้ข้อมูลในส่วนของเชื้อที่สามารถสร้างเอนเทอโรท็อกซินชนิดอื่นๆ ได้ เพราะเชื้อ *S. aureus* สามารถสร้างเอนเทอโรท็อกซินได้หลายชนิด (A-K) จากผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการทดลอง

Simkovicova and Gilbert (1971) รายงานว่าร้อยละ 92 ของเชื้อ *S. aureus* ที่พบในอาหารที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษกับผู้บริโภคในประเทศอังกฤษและเวลล์ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สร้างเอน

เทอโรท็อกซิน และยังพบว่า *S. aureus* 36 isolates ที่แยกได้จากอาหารนั้นมี 12 isolates ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินชนิด A, B, C และ D

Petras และ Maskova (1982) ทำการตรวจหา *S. aureus* ที่แยกได้จากอาหาร สิ่งส่งตรวจและจากแหล่งอื่นๆ พบว่าเชื้อส่วนใหญ่สร้างสารพิษชนิด A (ร้อยละ 50) หรือมิฉะนั้นก็มีทั้ง A และ D (ร้อยละ 21) ซึ่งก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษในสหรัฐอเมริกา พบว่ามีผู้ป่วยมากกว่า 7,000 ราย และประมาณ ร้อยละ 10 ของผู้ป่วยต้องเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล เชื้อส่วนใหญ่ที่ทำให้เกิดอาการพบว่าสร้างสารพิษชนิด A มากที่สุด ซึ่งผลไม่สอดคล้องกับการทดลองที่พบเชื้อสร้างสารพิษชนิด B มากที่สุด และพบในอาหารประเภทนมสร้างสารพิษชนิด C หรือ D ถ้าเป็นอาหารประเภทโปรตีนมักพบเชื้อสร้างสารพิษชนิด D ในปริมาณที่สูง

จริยาและคณะ (2530) จากการศึกษาที่วางขายในจังหวัดขอนแก่น จากจำนวนตัวอย่างอาหาร 193 ตัวอย่าง พบเชื้อ Staphylococcus ที่สร้างเอนไซม์ coagulase 17 ตัวอย่าง (ร้อยละ50.26) พบอาหารที่สร้างสารพิษอยู่ 34 ตัวอย่าง (ร้อยละ17.26) ชนิดของสารพิษที่พบมากที่สุดคือ ABCD (ร้อยละ 25.64) รองลงมาคือชนิด A (ร้อยละ23.08)

ภานุกิจและคณะ (2546) ตรวจแยกเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์สร้างเอนเทอโรท็อกซินและดื้อยาปฏิชีวนะในตัวอย่างอาหารจากร้านค้าในโรงพยาบาลรัฐบาล จำนวน 277 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อ *S. aureus* ในอาหาร 53 ตัวอย่าง (ร้อยละ 19.13) แยกได้เชื้อ 132 isolates ตัวอย่างอาหารจากร้านค้าในโรงพยาบาลเอกชน 248 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อ *S. aureus* ในอาหาร 41 ตัวอย่าง (ร้อยละ 16.53) แยกเชื้อได้ 100 isolates รวมเชื้อที่ตรวจแยกได้ 232 isolates เป็นสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ coagulase จำนวน 226 isolates เมื่อนำทั้ง 226 isolates มาทดสอบการสร้างเอนเทอโรท็อกซินโดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จ พบว่าเชื้อสร้างเอนเทอโรท็อกซินได้จำนวน 74 isolates (ร้อยละ 32.74) สร้างเอนเทอโรท็อกซินชนิด A, B, C, A&B และ A&C จำนวน 13, 28, 23, 4 และ 6 isolates

ตารางที่ 16 จำนวนเชื้อที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินจำแนกตามชนิดของเอนเทอโรท็อกซินจากร้านค้าที่จำหน่ายภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน และบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร

สถานที่	จำนวน isolates ของ *S. aureus* ชนิด coagulase positive	จำนวน isolates และร้อยละ ที่พบว่าสร้างเอนเทอโรท็อกซิน	ชนิดของเอนเทอโรท็อกซินและจำนวนของ *S. aureus* ที่สร้าง					
			A	B	C	A&B	A&C	A&B&C&D
ภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	165	61 (36.97)	13	20	12	6	10	0
ตลาดสี่แยกเกษตร	170	76 (44.71)	18	21	9	14	13	1
รวม	335	137 (40.90)	31	41	21	20	23	1

จากการตรวจหาเชื้อ *S. aureus* ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินจากร้านค้าภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน พบว่าร้านค้า D มีร้อยละที่พบการสร้างเอนเทอโรท็อกซินสูงที่สุด (ร้อยละ41.07) เมื่อเทียบกับร้านค้าอื่นๆ (ตารางที่ 17) และจากร้านค้าบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร พบว่าร้านค้า C มีร้อยละที่พบการสร้างเอนเทอโรท็อกซินสูงที่สุด (ร้อยละ52.78) เมื่อเทียบกับร้านค้าอื่นๆ (ตารางที่ 18) เนื่องจากลักษณะของร้าน D ภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และร้านค้า C บริเวณตลาดสี่แยกเกษตร เป็นร้านที่อาหารบรรจุในถาดอะลูมิเนียมหรือวางไว้บนโต๊ะ อาจมีกระจกหรือไม่มีกระจกปิด ตั้งไว้บนเค้าเตอร์ อาหารบางชนิดไม่ได้อยู่ในตู้กระจก มีการปรุงอาหารภายในร้านและล้างของภายในร้าน อาหารเป็นประเภทอาหารตักไม่ได้ทำทันที ประเภทเบเกอรี่ อาหารวางไว้บนถาดพลาสติก ไม่มีอะไรปกปิด วางไว้บนเคาเตอร์ บางชนิดมีบรรจุภัณฑ์ มีการห่อด้วยด้วยถุงพลาสติกหรือกระดาษ บางชนิดไม่มีบรรจุภัณฑ์ ขนมหวาน วางไว้บนถาดพลาสติก อาจใส่ถุงพลาสติกหรือกล่องโฟมมีการตักใส่ถุงก่อนที่จะจำหน่าย บางชนิดต้องใช้ช้อนและปากคีบ มีการอุ่นของหวานบ่อย น้ำปั่น มีการปอกผลไม้ไว้ก่อนแล้วแช่ในถังแช่แข็ง ซึ่งแช่กับอาหารคาวด้วย ผู้บริโภคเป็นนิสิตบุคลากรภายในมหาวิทยาลัย และจากภายนอกมหาวิทยาลัย เปิดขาย 07.00 – 20.00 น. เชื้อ *S. aureus* เมื่อมีสภาวะที่เหมาะสมจะสามารถสร้างสร้างพิษออกมาปนเปื้อนในอาหาร เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค เนื่องจากมีการขายอาหารตั้งแต่เช้าจดเย็น มีการอุ่น

อาหารบ่อย ทำให้เชื้อ *S. aureus* ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินทนความร้อนมีมากขึ้น เป็นการ enrichment เชื้อให้สามารถสร้างสารพิษได้มากขึ้นอีก

ตารางที่ 17 จำนวนเชื้อที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินจำแนกตามจำนวนและชนิดของเอนเทอโรท็อกซินจากร้านค้าภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ร้านค้า	จำนวนสายพันธุ์ของ *S. aureus* ชนิด coagulase positive	จำนวน Isolates ที่พบว่าสร้างเอนเทอโรท็อกซิน	ร้อยละที่พบว่าสร้างเอนเทอโรท็อกซิน	ชนิดของเอนเทอโรท็อกซินและจำนวนของ *S. aureus* ที่สร้าง					
				A	B	C	A&B	A&C	A&B&C&D
ร้านค้า A	43	11	25.58	2	4	1	3	1	0
ร้านค้า B	25	12	48	1	4	3	3	1	0
ร้านค้า C	48	15	31.25	4	5	5	0	1	0
ร้านค้า D	56	23	41.07	6	7	3	0	7	0
รวม	165	61	36.97	13	20	12	6	10	0

ตารางที่ 18 จำนวนเชื้อที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินจำแนกตามจำนวนและชนิดของเอนเทอโรท็อกซินจากร้านค้าบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร

ร้านค้า	จำนวนสายพันธุ์ของ *S.aureus* ชนิด coagulase positive	จำนวน Isolates ที่พบว่าสร้างเอนเทอโรท็อกซิน	ร้อยละที่พบว่าสร้างเอนเทอโรท็อกซิน	ชนิดของเอนเทอโรท็อกซินและจำนวนของ *S. aureus* ที่สร้าง					
				A	B	C	A&B	A&C	A&B&C&D
ร้านค้า A	56	15	26.79	6	6	1	0	2	0
ร้านค้า B	43	18	41.86	5	4	2	1	5	1
ร้านค้า C	36	19	52.78	6	3	1	5	4	0
ร้านค้า D	60	24	40	1	8	5	8	2	0
รวม	170	76	44.71	18	21	9	14	13	1

จากการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างอาหาร สามารถแสดงประเภทของอาหารที่พบเชื้อ *S. aureus* และสร้างเอนเทอโรท็อกซินจากร้านค้าที่จำหน่ายภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน และบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร พบว่าในประเภทอาหารคาว มีร้อยละที่พบเชื้อที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินสูงที่สุด (ร้อยละ49.02 และ ร้อยละ 58.93) ตามลำดับ เมื่อเทียบกับประเภทขนมหวานและน้ำปั่นและเบเกอรี่ อาจมีสาเหตุจากอาหารคาวจะมีการวางขายทิ้งไว้นานจนกว่าจะมีผู้มาซื้อไม่ได้ทำในทันทีเหมือนอาหารตามสั่ง และบางร้านไม่มีอะไรปกปิด เชื้อจากผู้ขายหรือผู้ซื้อหรือสิ่งแวดล้อมภายนอกก็มีส่วนทำให้อาหารมีการปนเปื้อนได้ โดยพบการสร้างเอนเทอโรท็อกซินชนิด B มากที่สุด รองลงมาคือเอนเทอโรท็อกซินชนิด A รายละเอียดแสดงในตารางที่ 19-20 ตามที่ Casman *et al*. (1967) รายงานว่า การเกิดอาหารเป็นพิษเนื่องจากเอนเทอโรท็อกซินชนิด A มากกว่าเอนเทอโรท็อกซินชนิด B อาจเนื่องมาจากในการสร้างเอนเทอโรท็อกซินนั้นเกิดเอนเทอโรท็อกซินชนิด A ก่อนและ pH ที่เชื้อ *S. aureus* จะสร้างเอนเทอโรท็อกซินชนิด A ใกล้เคียงกับ pH ของอาหารมากกว่า pH ที่เชื้อจะสร้างเอนเทอโรท็อกซินชนิด B นอกจากนี้ เชื้อ *S. aureus* ที่ตรวจพบมักจะเป็นสายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินชนิด A มากกว่าเอนเทอโรท็อกซินชนิด Bและคนมักจะเป็นหรือเกิดโรคได้ง่าย (susceptible) จากการได้รับเอนเทอโรท็อกซินชนิด A มากกว่าเอนเทอโรท็อกซินชนิด B แต่จากผลการทดลอง พบเชื้อสายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินชนิด B มากที่สุด อาจจะเนื่องมาจากในการทดลองครั้งนี้ ได้ทำการเก็บตัวอย่างอาหาร ซึ่งส่วนใหญ่เป็นช่วงระยะเวลาในฤดูร้อน สภาพอากาศร้อนอบอ้าว ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อ *S. aureus* อย่างยิ่งโดยเฉพาะเชื้อสายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินชนิด B เป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการทนร้อนได้มากที่สุด จึงน่าจะมีโอกาสเจริญเพิ่มจำนวนในตัวอย่างอาหารประเภทต่างๆได้มากกว่าเชื้อสายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินชนิดอื่น ดังนั้นจากผลการทดลองจึงพบเชื้อสายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินชนิด B มากที่สุด (กนกรัตน์, 2541)

ตารางที่ 19 จำนวนตัวอย่างอาหารที่พบเชื้อ *S. aureus* และจำนวนตัวอย่างที่เชื้อสร้างเอนเทอโรท็อกซิน แยกตามประเภทของตัวอย่างอาหาร ภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

ประเภทของอาหาร	จำนวนตัวอย่างอาหาร	จำนวน isolatesของ *S.aureus* ชนิด coagulase positive	จำนวน isolates ที่พบสร้างเอนเทอโรท็อกซิน	ร้อยละที่พบเชื้อที่สร้างเอนเทอโรท็อกซิน	ชนิดและจำนวนเอนเทอโรท็อกซิน
อาหารคาว	144	51	25	49.02	A(9), B(12), C(4)
เบเกอรี่	96	46	12	26.09	A(2), B(4), C(2), A&B(2),A&C(2)
ขนมหวานและน้ำปั่น	192	68	24	35.29	A(2), B(4), C(6), A&B(4), A&C(8)
รวม	432	165	61	36.97	A(13), B(20), C(12), A&B(6), A&C(10)

ตารางที่ 20 จำนวนตัวอย่างอาหารที่พบเชื้อ *S. aureus* และจำนวนตัวอย่างที่เชื้อสร้างเอนเทอโรท็อกซิน แยกตามประเภทของตัวอย่างอาหารบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร

ประเภทของอาหาร	จำนวนตัวอย่างอาหาร	จำนวน isolates ของ *S.aureus* ชนิด coagulase positive	จำนวน isolates ที่พบสร้างเอนเทอโรท็อกซิน	ร้อยละที่พบเชื้อที่สร้างเอนเทอโรท็อกซิน	ชนิดและจำนวนเอนเทอโรท็อกซิน
อาหารคาว	144	56	33	58.93	A(6), B(9), C(5), A&B(5), A&C(7), A&B&C&D(1)
เบเกอรี่	96	35	15	42.86	A(6), B(2), C(2), A&B(4), A&C(1)
ขนมหวานและน้ำปั่น	192	79	28	35.44	A(6), B(10), C(2), A&B(5), A&C(5)
รวม	432	170	76	44.71	A(18), B(21), C(9), A&B(14), A&C(13), A&B&C&D(1)

ตารางที่ 21 แสดงตัวอย่างอาหารจากร้านที่จำหน่ายภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขนและร้านค้าบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร แยกตามชนิดของตัวอย่างอาหารแบ่งเป็นประเภทอาหารคาวพบเชื้อ *S. aureus* ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินมากที่สุดคือ ข้าวมันไก่ ประเภทเบเกอรี่พบเชื้อ *S. aureus* ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินมากที่สุดคือ แซนด์วิชทูน่า ประเภทขนมหวานและน้ำปั่นพบเชื้อ *S. aureus* ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินมากที่สุดคือ ข้าวเหนียวสังขยาและน้ำแตงโมปั่น จากชนิดของอาหารที่พบมากที่สุดเห็นได้ว่าเป็นอาหารที่มีการสัมผัสกับมือของผู้ขายทำให้มีการปนเปื้อนของเชื้อลงสู่อาหารได้ เพราะ *S. aureus* เป็นแบคทีเรียที่มักพบบริเวณผิวหนังหรือบาดแผลที่ผิวหนังทำให้มือเป็นพาหะในการที่จะนำเชื้อปนเปื้อนลงสู่อาหาร ในงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ภานุกิจ (2546) ได้ศึกษาจากการตรวจแยกเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินจากร้านค้าในโรงพยาบาลของรัฐบาลและโรงพยาบาลเอกชน จำนวน 24 แห่งในกรุงเทพมหานครพบเชื้อ *S aureus* ในอาหารประเภทขนมหวานและไอศกรีม ในปริมาณที่สูงเมื่อเทียบกับประเภทอาหารคาว โดยพบในรวมมิตรมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 57.14

ตารางที่ 21 จำนวนร้อยละการพบเชื้อ *S. aureus* ในตัวอย่างอาหารจากร้านค้าที่จำหน่ายภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขนและร้านค้าที่วางขายบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร

ตัวอย่างอาหาร	จำนวนและร้อยละของตัวอย่างอาหารที่พบเชื้อ *S. aureus* ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินจากอาหารภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	จำนวนและร้อยละของตัวอย่างอาหารที่พบเชื้อ *S. aureus* ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซิน จากอาหารบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร
ประเภทอาหารคาว		
ข้าวมันไก่	5 (ร้อยละ10.42)	8 (ร้อยละ16.67)
ไก่ทอดหั่น	3 (ร้อยละ 6.25)	5 (ร้อยละ10.42)
หมูทอดกระเทียม	4 (ร้อยละ 8.33)	4 (ร้อยละ 8.33)
รวม	12 (ร้อยละ 8.33)	17 (ร้อยละ11.81)
ประเภทเบเกอรี่		
แซนด์วิชทูน่า	5 (ร้อยละ10.42)	6 (ร้อยละ12.5)
ขนมปังไส้สังขยา	4 (ร้อยละ8.33)	3 (ร้อยละ6.25)
รวม	9 (ร้อยละ9.38)	9 (ร้อยละ9.38)
ประเภทขนมหวานและน้ำปั่น		
ข้าวเหนียวสังขยา	6 (ร้อยละ12.5)	8 (ร้อยละ16.67)
ข้าวเหนียวหน้าปลา	4 (ร้อยละ8.33)	7 (ร้อยละ14.58)
น้ำแตงโมปั่น	6 (ร้อยละ 12.5)	9 (ร้อยละ18.75)
น้ำลิ้นจี่ปั่น	5 (ร้อยละ10.42)	5 (ร้อยละ 10.42)
รวม	21 (ร้อยละ 10.94)	29 (ร้อยละ15.10)
รวม	42 (ร้อยละ9.72)	55 (ร้อยละ12.73)

5. การทดสอบความไวของเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินต่อสารปฏิชีวนะ methicillin และ vancomycin

ผลการทดสอบความไวของเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินต่อยาปฏิชีวนะ methicillin และ vancomycin โดยวิธี Kirby-Bauer method ทำโดยการนำเชื้อ *S.aureus* สายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินจำนวน 137 isolates ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารที่จำหน่ายภายในมหาวิทยาเกษตรศาสตร์จำนวน 61 isolates จากตัวอย่างอาหารที่จำหน่ายบริเวณตลาดสี่แยก

เกษตรจำนวน 76 isolates มาทดสอบกับยาปฏิชีวนะทั้ง 2 ชนิด ตารางที่ 22 พบว่า ตัวอย่างอาหารที่จำหน่ายภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน พบเชื้อสายพันธุ์ที่ดื้อยา methicillin (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) คิดเป็นร้อยละ 8.20 และเชื้อที่ดื้อยา vancomycin (vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*, VRSA) ร้อยละ 6.56 ตัวอย่างที่พบได้แก่ น้ำแตงโมปั่น ข้าวเหนียวสังขยา น้ำลิ้นจี่ปั่น ไก่ทอดหั่น แซนด์วิชทูน่า ตัวอย่างอาหารที่จำหน่ายบริเวณตลาดสี่แยกเกษตรพบเชื้อสายพันธุ์ MRSA คิดเป็นร้อยละ 9.21 และเชื้อสายพันธุ์ VRSA ร้อยละ 3.95 ตัวอย่างที่พบได้แก่ ข้าวมันไก่ น้ำแตงโมปั่น ข้าวเหนียวหน้าปลา ข้าวเหนียวสังขยา ไก่ทอดหั่น จากผลดังกล่าวมีการพบเชื้อ *S.aureus* สายพันธุ์ที่ดื้อยาในร้อยละที่น้อย เชื้อสายพันธุ์ที่ดื้อยา 2 ชนิดดังกล่าว ส่วนใหญ่มักจะพบแพร่กระจายในโรงพยาบาลมากกว่าสิ่งแวดล้อมทั่วไป ดังนั้นจึงเป็นปัญหาที่สำคัญอย่างมากในการพบเชื้อที่ดื้อยาแพร่กระจายออกมาในอาหารที่จำหน่ายทั่วไป ผู้ประกอบอาหารควรคำนึงถึงในเรื่องของสุขลักษณะการปรุงอาหารและส่วนบุคคลให้มีสุขลักษณะที่ดีเพื่อความปลอดภัยต่อสุขภาพของผู้บริโภคด้วย และควรเข้มงวดในเรื่องของสุขาภิบาลของอาหารของผู้ประกอบอาหาร

ตารางที่ 22 ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ methicillin และ vancomycin ของเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินที่แยกได้

สถานที่	ผล (ร้อยละ)	ยาปฏิชีวนะ	
		Methicillin (ร้อยละ)	Vancomycin (ร้อยละ)
ภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	S	91.80	93.44
	I	0.0	0.0
	R	8.20	6.56
ตลาดสี่แยกเกษตร	S	90.79	96.05
	I	0.0	0.0
	R	9.21	3.95

หมายเหตุ :- R = resistance
I = Intermediate
S = sensitive

ตารางที่ 23 ร้านค้า A พบร้อยละดื้อยาปฏิชีวนะ methicillin และ vancomycin จากร้านค้าภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 18.18 และ 9.09 ตามลำดับ เนื่องจากร้านค้า A เป็นร้านที่ตั้งอยู่ใกล้โรงพยาบาล เชื้อสายพันธุ์ MRSA และ VRSA มักตรวจพบจากผู้ป่วยที่เข้ารักษาในโรงพยาบาล และผู้บริโภคส่วนมากของร้านค้า A จะเป็นบุคคลภายนอกที่มาใช้บริการ อาจมีสิ่งปนเปื้อนจากภายนอกหรือบริเวณโรงพยาบาล ปนเปื้อนลงสู่อาหารได้ ส่วนบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร พบเชื้อสายพันธุ์ MRSA มากที่สุดที่ ร้านค้า C คิดเป็นร้อยละ 15.79 และพบเชื้อสายพันธุ์ VRSA มากที่สุดที่ร้านค้า D คิดเป็นร้อยละ 8.33 อาจเนื่องมาจากบริเวณตลาดสี่แยกเกษตรมีผู้คนจำนวนมาก ไม่ว่าจะเป็นนิสิต พ่อค้า แม่ค้า และผู้คนที่อาศัยอยู่แถวนั้น หรือผู้ที่สัญจรมาบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร มาใช้บริการซื้ออาหารเป็นจำนวนมาก และบริเวณตลาดสี่แยกเกษตรก็มีโรงพยาบาล คลินิก เนื่องจากพบเชื้อสายพันธุ์ที่ดื้อยาในอาหาร จึงเป็นไปได้ว่าอาจจะมาจากผู้ขาย ผู้คนที่สัญจรมาบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร ผู้ที่อาศัยอยู่บริเวณตลาดสี่แยกเกษตร หรือเชื้อภายในอากาศก็ตาม มีโอกาสที่จะปนเปื้อนลงในอาหาร เพราะลักษณะร้านค้าคือ เป็นร้านที่ขายอาหารปรุงสำเร็จ มักจะตักหรือหยิบจับอาหารตามที่ผู้บริโภคสั่งและมีการวางขายอาหารตั้งแต่เช้าจดเย็น ฉะนั้นผู้ขายมักจะมีการสัมผัสกับอาหารโดยตรง

ตารางที่ 23 จำนวน isolates และร้อยละที่พบว่าดื้อยาปฏิชีวนะจากร้านค้าภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และบริเวณตลาดสี่แยกเกษตรแยกตามร้านค้า

ร้านค้า	จำนวน Isolates และร้อยละที่พบว่าดื้อยาปฏิชีวนะ							
	ภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์				ตลาดสี่แยกเกษตร			
	methicillin	ร้อยละ	vancomycin	ร้อยละ	methicillin	ร้อยละ	vancomycin	ร้อยละ
ร้านค้า A	2	18.18	1	9.09	0	0	1	6.67
ร้านค้า B	0	0	1	8.33	2	11.11	0	0
ร้านค้า C	1	6.67	1	6.67	3	15.79	0	0
ร้านค้า D	2	8.70	1	4.35	2	8.33	2	8.33
รวม	5	8.20	4	6.56	7	9.21	3	3.95

จากตารางที่ 24 พบร้อยละที่ดื้อยาปฏิชีวนะ methicillin และ vancomycin จากร้านค้าภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในอาหารประเภทเบเกอรี่ (ร้อยละ 8.33, ร้อยละ 8.33) ตามลำดับ ขนมหวานและน้ำปั่น (ร้อยละ 8.33, ร้อยละ 8.33) ตามลำดับ ส่วนบริเวณตลาดสี่แยกเกษตรพบสายพันธุ์ MRSA และ VRSA ในอาหารประเภทขนมหวานและน้ำปั่นมากที่สุด (ร้อยละ 10.71, ร้อยละ 7.14) ตามลำดับ ซึ่งจากผลการทดลองจะพบเชื้อสายพันธุ์ที่ดื้อยาในอาหารหวาน ซึ่งก็คือ เบเกอรี่ ขนมหวานและน้ำปั่น รายงานของ Peterson *et al*. (1964) รายงานว่า อาหารประเภทที่มีแป้งและน้ำตาลเป็นส่วนประกอบอยู่มาก เช่น พวกขนมปังขนมเค้กต่างๆ จัดเป็นอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อ *S. aureus* นั้นส่งผลให้แบคทีเรียชนิดอื่นๆ เจริญแข่งขันกับเชื้อ *S. aureus* ได้น้อยลง นอกจากนี้ยังพบว่า น้ำตาลซูโครสปริมาณเพียง 18 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้การเจริญของเชื้อ *S. aureus* ลดลงได้บ้าง แต่จะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆที่พบในอาหารได้เป็นอย่างดี ส่วนแป้งข้าวโพดเพียงร้อยละ 2.5 ในอาหารสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ลงได้เล็กน้อยแต่ก็ลดการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆลงไปด้วย และสำหรับอาหารที่ประกอบด้วยไข่ร้อยละ 25 และน้ำตาลซูโครสร้อยละ 14.5 จะทำให้จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆมีจำนวนคงที่อยู่นานกว่าปกติก่อนที่จะเริ่มเพิ่มจำนวน ซึ่งส่งผลให้เชื้อ *S. aureus* เจริญล่วงหน้าไปก่อน ส่วนอาหารที่เติมน้ำมันข้าวโพดร้อยละ 4 จะมีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารได้เฉพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เท่านั้น

ตารางที่ 24 จำนวน isolates และร้อยละที่พบว่าดื้อยาปฏิชีวนะจากร้านค้าภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร แยกตามประเภทของอาหาร

ประเภทอาหาร	จำนวน Isolates และร้อยละที่พบว่าดื้อยาปฏิชีวนะ							
	ภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์				ตลาดสี่แยกเกษตร			
	methicillin	ร้อยละ	vancomycin	ร้อยละ	methicillin	ร้อยละ	vancomycin	ร้อยละ
อาหารคาว	2	8	1	4	3	9.09	1	3.03
เบเกอรี่	1	8.33	1	8.33	1	6.67	0	0
ขนมหวานและน้ำปั่น	2	8.33	2	8.33	3	10.71	2	7.14
รวม	5	8.20	4	6.56	7	9.21	3	3.95

เนื่องจากปัจจุบันนิยมใช้ยาต้านจุลชีพกันอย่างแพร่หลายเพื่อรักษาโรคติดเชื้อต่างๆ ซึ่งอาจก่อให้เกิดปัญหาเชื้อดื้อยาขึ้นเนื่องมาจากการใช้ยาอย่างไม่ถูกต้อง โดยเชื้อ *S. aureus* เป็นตัวอย่างหนึ่งของปัญหาเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะ เนื่องจากเป็นเชื้อที่ระบาดง่ายและอาจมีโอกาสเกิดการแพร่กระจายมาปนเปื้อนอาหารได้ ดังนั้นเพื่อเป็นแนวทางในการควบคุมและป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ที่ดื้อยาจึงได้ทำการสำรวจว่าเชื้อ *S.aureus* สายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารในร้านค้าภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และบริเวณตลาดสี่แยกเกษตรจะมีความไวหรือดื้อยาปฏิชีวนะหรือไม่ โดยเน้นไปที่ยา 2 ชนิด คือ methicillin และ vancomycin เนื่องจากยา 2 ชนิดนี้เป็นยาที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อยากลุ่ม penicillin หรือดื้อยากลุ่มอื่น และมักตรวจพบเชื้อสายพันธุ์ MRSA และ VRSA จากผู้ป่วยที่เข้ารักษาในโรงพยาบาล (nosocomial infection)โดยที่มีการตรวจพบการดื้อยาครั้งแรกของ methicillin ในปีค.ศ. 1956 และ vancomycin ในปีค.ศ.1987 (วีรวรรณ, 2549) ดังนั้นการตรวจหาเชื้อ MRSA และ VRSA ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลและทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ ซึ่งถ้าพบเชื้อ 2 กลุ่มนี้แพร่กระจายอยู่ในอาหารที่มีวางขายทั่วไป อาจเป็นข้อบ่งชี้ได้ว่ามีการแพร่ของเชื้อเหล่านี้จากสภาพแวดล้อมในโรงพยาบาลออกสู่ภายนอก ซึ่งเป็นอันตรายอย่างยิ่งต่อผู้บริโภค ถึงแม้ว่าจะพบในจำนวนน้อยแต่เชื้อเหล่านี้มีโอกาสเพิ่มจำนวนในอาหารได้มากขึ้นและแพร่กระจายต่อไปได้

Tsen *et al*. (1998) ได้ศึกษาเชื้อ *S. aureus* 176 isolates ที่ตรวจแยกจากตัวอย่าง อาหารประเทศไต้หวัน พบว่า เชื้อสร้างเอนเทอโรท็อกซินชนิด SEA จำนวนร้อยละ75 ของสายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินทั้งหมดจากตัวอย่างอาหาร และเมื่อนำสายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินมาทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะต่างๆ เช่น penicillin, oxacillin, vancomycin, methicillin streptomycin, tetracycline, gentamicin และ kanamycin พบว่าเชื้อที่ตรวจแยกจากตัวอย่างอาหารสร้างเอนเทอโรท็อกซินจำนวน 64 isolates ซึ่ง 33 isolates (ร้อยละ51.6) ดื้อยา penicillin แต่มีความไวต่อยาปฏิชีวนะชนิดอื่น และ 8 isolates (ร้อยละ12.5) มีความไวต่อยาปฏิชีวนะทุกชนิด

ภานุกิจ (2546) ตรวจแยกเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์สร้างเอนเทอโรท็อกซินและดื้อยาปฏิชีวนะในตัวอย่างอาหารจากร้านค้าในโรงพยาบาลรัฐบาล จำนวน 277 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อ *S. aureus* ในอาหาร 53 ตัวอย่าง (ร้อยละ 19.13) แยกได้เชื้อ 132 isolates ตัวอย่างอาหารจากร้านค้าในโรงพยาบาลเอกชน 248 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อ *S. aureus* ในอาหาร 41 ตัวอย่าง (ร้อยละ16.53) แยกเชื้อได้ 100 isolates รวมเชื้อที่ตรวจแยกได้ 232 isolates เป็นสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ coagulase จำนวน 226 isolates เมื่อนำทั้ง 226 isolates มาทดสอบการสร้างเอนเทอโรท็อกซินโดยใช้ชุด

ทดสอบสำเร็จ พบว่าเชื้อสร้างเอนเทอโรท็อกซินได้จำนวน 74 isolates (ร้อยละ 32.74) สร้างเอนเทอโรท็อกซินชนิด A, B, C, A&B และ A&C จำนวน 13, 28, 23, 4 และ 6 isolates การตรวจหาสายพันธุ์ที่ดื้อยา โดยทดสอบความไวของเชื้อ *S. aureus* ต่อยาปฏิชีวนะและยาซัลฟา ผลปรากฏว่าเชื้อทุก isolates มีความไวต่อยา oxacillin, ciprofloxacin และ rifampicin คิดเป็นร้อยละ 100 ดื้อยา tetracycline ร้อยละ 43.24 ดื้อยา chloramphenicol ร้อยละ 17.57 และดื้อยา gentamicin ร้อยละ 4.05 มีเชื้อ 2-3 isolates ที่แสดงผลกึ่งกลาง (intermediate) ต่อยา chloramphenicol, vancomycin และ cotrimoxazole

Pesavento (2007) ทำการแยกเชื้อจาก raw meat (เนื้อไก่, เนื้อหมู, เนื้อวัว) ตัวอย่างอาหารทั้งหมด 176 ตัวอย่าง ทำการสุ่มตัวอย่างเป็นระยะเวลา 1 ปี พบว่าได้แยกเชื้อ *S. aureus* ได้ 42 isolates จากนั้นทดสอบกับยาปฏิชีวนะ 12 ชนิด ไม่พบการดื้อยา methicillin, teicoplanin และ vancomycin

อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ ในภาพรวมยังพบเชื้อ MRSA และVRSA จำนวนไม่มาก จึงเป็นเรื่องที่ดีสำหรับผู้ที่มีหน้าที่ทางสาธารณสุขที่จะคิดวางแผนควบคุมหรือเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของเชื้อสายพันธุ์ดื้อยาต่อไป โดยเฉพาะ MRSA พบว่าเป็นสาเหตุการเสียชีวิตของผู้ป่วยที่ติดเชื้อในโรงพยาบาล จากการตรวจเอกสารพบว่า เชื้อ MRSA นี้เป็นปัญหาใหญ่ของหลายประเทศทั่วโลก (Chang *et al*., 1994 ; Aires de Sousa *et al*., 1998 ; Gottlieb and David, 1998) และเชื้อดื้อยา VRSA ก็เริ่มเป็นปัญหาในหลายประเทศ (Marchese *et al*., 2000) จึงสอดคล้องกับผลในการศึกษาครั้งนี้ก็พบเชื้อ *S. aureus* ดื้อยา vancomycin ในตัวอย่างอาหาร ถึงแม้ว่าพบในปริมาณที่น้อยมากก็ตาม แต่ก็น่าจะเป็นปัญหาสำคัญต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้ในอนาคต

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การตรวจแยกเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินและดื้อยาปฏิชีวนะ methicillin และ vacomycin ในตัวอย่างอาหารทั้ง 3 ประเภท คือ ประเภทอาหารคาว ประเภทเบเกอรี่ และประเภทขนมหวานและน้ำปั่น จากร้านค้าภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร จำนวน 8 แห่ง โดยจะทำการคัดเลือกตัวอย่างอาหารที่พบเชื้อ *S.aureus* มากและมีการพบที่บ่อยโดยการนับจำนวนโคโลนีของตัวอย่างอาหารใช้ตัวอย่างอาหารทั้งหมด 480 ตัวอย่าง ตัวอย่างอาหารจากร้านค้าภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 240 ตัวอย่าง ตัวอย่างอาหารจากร้านค้าบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร 240 ตัวอย่าง (ประเภทอาหารคาวแห่งละ 112 ตัวอย่างประเภทเบเกอรี่แห่งละ 64 ตัวอย่าง ประเภทของหวานและไอศครีมแห่งละ 64 ตัวอย่าง) ซึ่งตัวอย่างอาหารที่ทำการสุ่มจะมีทั้งหมด 24 ชนิด แบ่งเป็นประเภทอาหารคาว 14 ชนิด ได้แก่ แกงเขียวหวาน, ยำหมูยอ, ไข่เจียว, ข้าวมันไก่, ไก่ทอดหั่น, หมูทอดกระเทียม, ผัดกระเพราหมูสับ, ต้มข่าไก่, ลาบหมูผัดปลาดุก, ลูกชิ้นทอด, ไก่ผัดขิง, ขนมจีน, แพนงหมู ประเภทเบเกอรี่ 8 ชนิด คือ ขนมปังเนยสด, เอแคล์, แซนด์วิชทูน่า, ขนมปังไส้สังขยา, ขนมปังไส้หมูหยอง, โรลช็อคโกแลต, พายแฮม, เค้กวานิลลา ประเภทขนมหวานและน้ำปั่น 8 ชนิด คือ ข้าวต้มมัด, ข้าวเหนียวสังขยา, ข้าวเหนียวหน้าปลา, ข้าวโพดหวาน, น้ำส้มปั่น, น้ำแตงโมปั่น, น้ำลิ้นจี่ปั่น, น้ำมะพร้าวปั่น และจากการเปรียบเทียบและวิเคราะห์พบว่าตัวอย่างอาหารที่ทำการคัดเลือกโดยการนับจำนวนโคโลนีโดยพิจารณาว่าตัวอย่างอาหารจากร้านค้าภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร พบเชื้อ *S.aureus* ในปริมาณที่สูงและเมื่อสุ่มหลายครั้งก็พบทุกครั้ง หลังจากนั้นจึงทำการสุ่มตัวอย่างอาหารประเภทดังกล่าวเป็นระยะเวลา 1 ปีเพื่อคัดแยกเชื้อ *S.aureus* แบ่งเป็นประเภทอาหารคาว 3 ชนิด คือ ข้าวมันไก่, ไก่ทอดหั่น, หมูทอดกระเทียม ประเภทเบเกอรี่ 2 ชนิด คือ แซนด์วิชทูน่า, ขนมปังไส้สังขยา ประเภทขนมหวานและน้ำปั่น 4 ชนิด คือ ข้าวเหนียวสังขยา, ข้าวเหนียวหน้าปลา, น้ำแตงโมปั่น, น้ำลิ้นจี่ปั่น

ในการสุ่มตัวอย่างอาหารที่คัดเลือกเป็นระยะเวลา 1 ปีโดยทำการสุ่มตัวอย่างจากร้านค้าที่จำหน่ายภายในที่จำหน่ายภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 4 ร้านค้าและบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร 4 ร้านค้า เดือนละ 36 ตัวอย่างจากอาหาร 9 ชนิดที่ทำการคัดเลือกมาแล้ว แบ่งเป็นประเภทอาหารคาวแห่งละ 144 ตัวอย่าง, ประเภทเบเกอรี่แห่งละ 96 ตัวอย่าง ประเภทขนมหวานและน้ำปั่นแห่งละ 192 ตัวอย่าง รวมตัวอย่างทั้งหมด 864 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างอาหารจากภายในมหาวิทยาลัย

เกษตรศาสตร์ทั้งหมด 432 ตัวอย่าง พบเชื้อ *S. aureus* ในตัวอย่างอาหาร 142 ตัวอย่าง คิดเป็น ร้อยละ 32.87 จำนวนเชื้อ *S. aureus* ที่ตรวจแยกได้ 172 isolates พบว่าเป็นสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ coagulase จำนวน 165 isolates คิดเป็นร้อยละ 95.93 และเป็นสายพันธุ์ที่ไม่สร้างเอนไซม์ coagulase จำนวน 7 isolates คิดเป็นร้อยละ 4.07 ตัวอย่างอาหารจากร้านค้าบริเวณตลาดสี่แยกเกษตรทั้งหมด 432 ตัวอย่าง พบเชื้อ *S. aureus* 163 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 37.73 จำนวนเชื้อ *S.aureus* ที่ตรวจแยกได้ 195 isolates พบว่าเป็นสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ coagulase จำนวน 170 isolates คิดเป็นร้อยละ 87.18 และเป็นสายพันธุ์ที่ไม่สร้างเอนไซม์ coagulase จำนวน 25 isolates คิดเป็นร้อยละ 12.82 ดังนั้นจำนวนเชื้อ *S. aureus* ที่ตรวจแยกได้รวมทั้งสิ้นจำนวน 367 isolates พบว่าเป็นสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ coagulase จำนวน 335 isolates คิดเป็นร้อยละ 91.28 และเป็นสายพันธุ์ที่ไม่สร้างเอนไซม์ coagulase จำนวน 32 isolates คิดเป็น ร้อยละ 8.72

จำนวนเชื้อที่ตรวจแยกได้จากตัวอย่างอาหารบน Baird Parker medium ที่พบว่าเป็นเชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ coagulase ได้ จำนวน 335 isolates เมื่อนำมาทดสอบหาเชื้อที่สามารถสร้างเอนเทอโรท็อกซินได้โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป (kit test) ด้วยวิธี Revers Passive Latex Agglutination (RPLA) พบเชื้อ *S. aureus* ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินทั้งสิ้น จำนวน 137 isolates คิดเป็นร้อยละ 40.90 โดยจำนวนเชื้อสายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินชนิด A, B, C, A&B, A&C และ A&B&C&D จำนวน 31, 41, 21, 20, 23 และ 1 isolates ตามลำดับ

เชื้อที่ตรวจแยกได้ในตัวอย่างอาหารจากร้านค้าภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน พบเชื้อที่สร้างเอนเทอโรท็อกซิน จำนวน 61 isolates จาก 165 isolates คิดเป็นร้อยละ 36.97 โดยที่เชื้อสร้างเอนเทอโรท็อกซินชนิด A, B, C, A&B และ A&C จำนวน 13, 20, 12, 6 และ 10 isolates ตามลำดับ ในตัวอย่างอาหารประเภทอาหารคาว พบเชื้อที่สร้างเอนเทอโรท็อกซิน 25 isolates จาก 51 isolates คิดเป็น ร้อยละ 49.02 [(A(9),B(12),C(4)] ในตัวอย่างอาหารประเภทเบเกอรี่ พบเชื้อที่สร้างเอนเทอโรท็อกซิน จำนวน 12 isolates จาก 46 isolates คิดเป็น ร้อยละ 26.09 [A(2),B(4),C(2), A&B(2) , A&C (2)] และในตัวอย่างอาหารประเภทขนมหวานและน้ำปั่น พบเชื้อที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินจำนวน 24 isolates จาก 68 isolates คิดเป็นร้อยละ 35.29 [A(2),B(4),C(6),A&B(4),A&C(8)]

เชื้อที่ตรวจแยกได้ในตัวอย่างอาหารจากร้านค้าบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร พบเชื้อที่สร้างเอนเทอโรท็อกซิน จำนวน 76 isolates จาก 170 isolates คิดเป็นร้อยละ 44.71 โดยที่เชื้อสร้างเอนเทอโรท็อกซินชนิด A, B, C, A&B, A&C และ A&B&C&D จำนวน 18, 21, 9, 14,13 และ 1 isolates

ตามลำดับในตัวอย่างประเภทอาหารคาว พบเชื้อที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินจำนวน 33 isolates จาก 56 isolates คิดเป็นร้อยละ 58.93 [A(6),B(9),C(5), A&B(5),A&C(7), A&B&C&D(1)] ในตัวอย่างอาหารประเภทเบเกอรี่พบเชื้อที่สร้างเอนเทอโรท็อกซิน จำนวน 15 isolates จาก 35 isolates คิดเป็นร้อยละ 42.86 [A(6),B(2),C(2), A&B(4),A&C(1)] และในตัวอย่างอาหารประเภทขนมหวานและน้ำปั่น พบเชื้อที่สร้างเอนเทอโรท็อกซิน จำนวน 28 isolates จาก 79 isolates คิดเป็นร้อยละ 35.44 [A(6),B(10),C(2), A&B(5),A&C(5)]

ชนิดของเอนเทอโรท็อกซินที่ตรวจพบมากที่สุดจากทั้งร้านค้าที่จำหน่ายภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร คือ เอนเทอโรท็อกซินชนิด B (41 isolates) รองลงมา คือ เอนเทอโรท็อกซินชนิด A (31 isolates), เอนเทอโรท็อกซินชนิด A&C (23 isolates), เอนเทอโรท็อกซินชนิด C (21 isolates), เอนเทอโรท็อกซินชนิด A&B (20 isolates) และเอนเทอโรท็อกซินชนิด A&B&C&D (1 iolates) ตรวจไม่พบสายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินชนิด D, A&D, B&C

ตัวอย่างอาหารที่พบเชื้อสายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินมากที่สุดจากร้านค้าภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ คือข้าวเหนียวสังขยาและน้ำแตงโมปั่น (ร้อยละ12.5) รองลงมา คือน้ำลิ้นจี่ปั่น, แซนด์วิชทูน่าและข้าวมันไก่ (ร้อยละ10.42) , ขนมปังไส้สังขยาและหมูทอดกระเทียม (ร้อยละ8.33)และไก่ทอดหั่น (ร้อยละ6.25) ตามลำดับ

ตัวอย่างอาหารที่พบเชื้อสายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินมากที่สุดจากร้านค้าบริเวณตลาดสี่แยกเกษตรคือ น้ำแตงโมปั่น (ร้อยละ18.75) รองลงมาคือข้าวเหนียวสังขยาและข้าวมันไก่ (ร้อยละ16.67), แซนด์วิชทูน่า (ร้อยละ12.5), ข้าวเหนียวหน้าปลา (ร้อยละ14.58), ไก่ทอดหั่นและน้ำลิ้นจี่ปั่น (ร้อยละ10.42), หมูทอดกระเทียม (ร้อยละ8.33) และขนมปังไส้สังขยา (ร้อยละ6.25) ตามลำดับ

ในการตรวจหาเชื้อสายพันธุ์ดื้อยา โดยทดสอบความไวของเชื้อ *S. aureus* ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินทั้ง 137 isolates ต่อยาปฏิชีวนะ methicillin และ vancomycin ผลปรากฏว่าเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารที่จำหน่ายภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ดื้อยา methicillin จำนวน 5 isolates จาก 61 isolates คิดเป็นร้อยละ 8.20 ดื้อยา vancomycin จำนวน 4 isolates จาก 61 isolates คิดเป็นร้อยละ 6.56 เชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารที่จำหน่ายบริเวณตลาดสี่แยกเกษตรดื้อยา methicillin จำนวน 7 isolates จาก 76 isolates คิดเป็นร้อยละ 9.21 ดื้อยา vancomycin จำนวน 3 isolates จาก 76

isolates คิดเป็นร้อยละ 3.95 ในร้านค้า A พบร้อยละดื้อยาปฏิชีวนะ methicillin และ vancomycin จากร้านค้าภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 18.18 และ 9.09 ตามลำดับ ส่วนบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร พบเชื้อสายพันธุ์ MRSA มากที่สุดที่ร้านค้า C คิดเป็นร้อยละ 15.79 และพบเชื้อสายพันธุ์ VRSA มากที่สุดที่ร้านค้า D คิดเป็นร้อยละ 8.33 พบร้อยละที่ดื้อยาปฏิชีวนะ methicillin และ vancomycin จากร้านค้าภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในอาหารประเภทเบเกอรี่ (ร้อยละ 8.33, ร้อยละ 8.33) ตามลำดับ ขนมหวานและน้ำปั่น (ร้อยละ 8.33, ร้อยละ 8.33) ตามลำดับ ส่วนบริเวณตลาดสี่แยกเกษตรพบสายพันธุ์ MRSA และ VRSA ในอาหารประเภทขนมหวานและน้ำปั่นมากที่สุด (ร้อยละ 10.71, ร้อยละ 7.14)

จากการตรวจพบเชื้อ *S. aureus* ในตัวอย่างอาหารหลากหลายชนิดดังกล่าว รวมทั้งการพบว่าเชื้อบาง isolates สามารถสร้างเอนเทอโรท็อกซินและดื้อยาปฏิชีวนะ methicillin และ vancomycin ทำให้สามารถบ่งชี้ได้ว่าอาหารหลายชนิดไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค เพราะเชื้อที่สร้างสารพิษดังกล่าวสามารถก่อโรคอาหารเป็นพิษ ซึ่งข้อมูลดังกล่าวน่าจะใช้เป็นแนวทางในการควบคุมคุณภาพของอาหารที่จำหน่ายภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน และบริเวณตลาดสี่แยกเกษตรได้ต่อไป

ข้อเสนอแนะ

จากการตรวจพบเชื้อ *S. aureus* ในตัวอย่างอาหารหลากหลายชนิดดังกล่าว รวมทั้งการพบว่าเชื้อบาง isolates สามารถสร้างเอนเทอโรท็อกซินและดื้อยาปฏิชีวนะ methicillin และ vancomycin ทำให้สามารถบ่งชี้ได้ว่าอาหารหลายชนิดไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค เพราะเชื้อที่สร้างสารพิษดังกล่าวสามารถก่อโรคอาหารเป็นพิษ ข้อมูลที่ได้นี้สามารถใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ถึงความปลอดภัยของอาหารต่อผู้บริโภคที่ใช้บริการ เป็นแนวทางในการควบคุมและป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อดังกล่าว เป็นแนวทางในการลดปัญหาด้านสาธารณสุขในโรคอาหารเป็นพิษ ซึ่งจะช่วยลดการสูญเสียทางด้านเศรษฐกิจ กำลังคน กำลังทรัพย์ และเป็นแนวทางให้หน่วยราชการที่รับผิดชอบเกี่ยวกับสุขาภิบาลอาหารได้นำไปใช้ประโยชน์ ควบคุมอาหารเป็นพิษได้ดียิ่งขึ้น ส่วนภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร ข้อมูลที่ได้นี้อาจนำไปเป็นมาตรการเสนอให้ผู้ที่เกียวข้องแนะนำต่อผู้ประกอบการอาหาร อาจให้มีการสุ่มตัวอย่างอาหาร swab อุปกรณ์และมือของผู้ประกอบการ เพื่อไม่ให้มีการปนเปื้อนของเชื้อลงสู่อาหาร

ในการทดลองได้ทำการแยกเชื้อ *S. aureus* ได้หลาย isolates และในการวิจัยครั้งต่อไปอาจนำเชื้อที่แยกได้มาศึกษาทางชีวโมเลกุล ในเรื่องของสายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินและการดื้อยาต่อไป

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กนกรัตน์ ศิริพานิชกร. 2541ก. **คู่มือการเรียนปฏิบัติการจุลชีววิทยาสำหรับวิชาโรคติดเชื้อ.** ภาควิชาจุลชีววิทยา, คณะสาธารณสุขศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.

_____. 2541ข. **โรคติดเชื้อ.** ภาควิชาจุลชีววิทยา, คณะสาธารณสุขศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.

พระราชบัญญัติอาหาร. 2522**. ข้อกำหนดของการควบคุมคุณภาพอาหารทางด้านจุลชีววิทยา.** กระทรวงสาธารณสุข

จันทร์พร เจริญเกียรติ. 2531. **การศึกษาชนิดของฟาจ์กและภาวะการเจริญของ *S. aureus* ที่แยกได้จากปลาร้าและกะปิในความเข้มข้นของเกลือและความเป็นกรดระดับต่าง ๆ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยมหิดล.

จริยา ชมวารินทร์, ดรุณ โกฏิมนัสวนิชย์, อรุณรัฐ ร่มพฤกษ์ และ วีระพงศ์ ลุลิตานนท์. 2530. **การตรวจหาความสัมพันธ์ของเชื้อสแตฟฟิโลคอกคัส ออเรียส ที่สร้างสารพิษในอาหารกับที่พบในผู้ประกอบการ**. รายงานการวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ชัยวัฒน์ ศีตะจิตต์. 2518. **การตรวจหาสายพันธุ์ของสแตฟฟิโลคอคไค ซึ่งสามารถสร้างสารพิษในกับข้าวสำเร็จรูป.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ฆรณี ตุ้ยเต็มวงศ์. 2545. **เอกสารประกอบการเรียนวิชา Food Microbiology.** ภาควิชาจุลชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. (อัดสำเนา)

ดวงพร ศรีมงคล. 2547. **ผลการดำเนินงานโครงการสุขาภิบาลอาหารของแผงลอยจำหน่ายอาหารในโรงเรียนในเขตเทศบาลเมือง จังหวัดนครนายก**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พัชรี สุนทรนันท. 2548. **เอกสารประกอบการเรียนวิชาโรคติดเชื้อและภูมิคุ้มกัน**. ภาควิชาจุลชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. (อัดสำเนา)

ภานุกิจ กันหาจันทร์. 2546. **การแยกเชื้อ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซินและทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะในตัวอย่างอาหารจากร้านค้าในโรงพยาบาลในกรุงเทพมหานคร.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วีรวรรณ ลุวีระ. 2549. การดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย. **สงขลานครินทร์เวชสาร** 24 (5): 454-459.

วรรณดี เชยเดช, ลักษณาภรณ์ คงเจริญพร, ฐิติมา วงศาโรจน์ และ อรุณ บ่างตระกูลนนท์. 2542. การศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารปรุงสำเร็จจากร้านอาหาร ภายในกระทรวงสาธารณสุข. **วารสารโรคติดต่อ** 25 (3): 295 – 301.

นัยนา ไช้เทียมวงษ์. 2546. นานาความรู้สู่การสร้างสิ่งแวดล้อมกินอย่างไรปลอดภัยโรค และสารพิษในโรงเรียน. กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข.

สุมณฑา วัฒนสินธิ์, จุไรรัตน์ รุ่งโรจนารักษ์ และ ธัญลักษณ์ นินบดี. 2533. การศึกษาเอนเทอโรท็อกซินของเชื้อ *Staphylococcus aureus* . **วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์** 22 (4): 193-206.

สุมาลี ณีศะนันท์. 2518. **การสำรวจหาเชื้อสตั๊ฟฟิลโลคอคไคในน้ำนมที่รีดใหม่ๆของโคนมเขตภาคกลางของประเทศไทยและการทดสอบความไวต่อการถูกทำลายของเชื้อด้วยสารปฏิชีวนะและซัลฟาบางชนิด**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุมาลี เหลืองสกุล. 2535. **จุลชีววิทยาทางอาหาร**. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒประสานมิตร, กรุงเทพฯ.

สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. **สรุปการตรวจสอบข่าวการระบาดของโรคในประเทศไทยระหว่างปี พ. ศ. 2527 – 2535.**

สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. **สรุปการตรวจสอบข่าวการระบาดของโรคในรอบสัปดาห์. สัปดาห์ที่ 12 ระหว่างวันที่ 18 – 24 มีนาคม 2550.**

อภัสรา วรราช และ วัชรชัย ณรงค์ศักดิ์. 2547. การใช้เทคนิค multiplex PCR ตรวจหาเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อต่อยา methicillin. *ใน* **การประชุมสัมมนาวิชาการปศุสัตว์ ครั้งที่ 19**. ปทุมธานี

อรัญ หันพงศ์กิตติกูล. 2533. การตรวจวิเคราะห์สตาฟิโลคอกคัส ออเรียสในอาหารทะเลแช่เยือกแข็ง. **มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์วารสาร**. 78-89.

อรุณ บ่างตระกูลนนท์, ศรีรัตน์ พรเรืองวงศ์ และ สุมาลี บุญมา. 2551. การสำรวจหาเชื้อโรคอาหารเป็นพิษในอาหารพร้อมปรุงที่จำหน่ายในซุปเปอร์มาร์เก็ตจากเขตพื้นที่ 3 จังหวัด. *ใน* **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38 (สาขาสัตวแพทยศาสตร์).** มหสวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อารยา เจียไพบูลย์. 2541. **การสุขาภิบาลร้านอาหารในมหาวิทยาลัยของรัฐ.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อาทิตย์ นูกูลกิจ และ นธี แซ่ลี้. 2540. **การตรวจสอบหาแบคทีเรียก่อโรคลำไส้ จากอาหารพร้อมบริโภค อุปกรณ์ประกอบอาหาร ผู้อุปกรณ์ประกอบการ จากร้านอาหารในสถาบันราชภัฏสวนสุนันทา**. ปัญหาพิเศษ มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา.

Adesiyum, A.A., M. Eschbach, W. Lenz and K.P. Schaal. 1992. **Detection of enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strain : a comparative use of the modified Ouchterlony precipitation test, reversed passive latex agglutination test, and avidin - biotin ELISA.**Can. J. Microbiol. 38: 1097-1101.

Aires de Sousa, M., C. Bartzavali, I. Spiliopoulou, I.S. Sanches, M.I. Crisostomo and H. de Lencastre. 2003. Two international methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones endemic in a University Hospital in Patras, Greece. **J. Clin. Microbiol.** 41 (5): 2027-2032.

Atanassova, V., A. Meindl and C. Ring. 2001. **Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham-a comparism ofclassical culturing detection and RFLP-PCR**. Int. J. Food Microbiol. 68: 105-113.

Balaban, N. and A. Rasooly. 2000. Staphylococcal enterotoxins. **Int. J. Food Microbiol**. 61: 1-10.

Bankes, P. and A.S. Rose. 1989. Rapid detection of Staphylococcal enterotoxins in foods with A modification of the reversed passive latex agglutination assay. **J. Appl. Bacteriol.** 67: 395-399**.**

Baron, E.J. and S.M. Finegold. 1990. **Diagnostic Microbiology**. 8th ed., the C.V. Mosby Company, United States of America.

Bartelt, M.A. 2000. **Diagnostic Bacteriology : A Study guide**. F.A. Davis company, United States of America.

Bauer, A.W., W.M.M. Kirby, J.C. Snerris and M. Turck. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method**. Clinical Pathology**. 45: 493-496.

Bennett, R. and G.A. Lancette. 2001. ***Staphylococcus aureus***. Bacteriological Analytical Manual Online chapter 12

Betley, M.J. and Mekalanos, J.J. 1985. Staphylococcal enterotoxin A is encoded by a phage. **Science** 229: 185-187.

Bhatia, A. and S. Zahoor. 2007. *Staphylococcus aureus* Enterotoxins: A Review. **J. Clinical and Diagnostic Research.** 1 (3): 188-197.

Bohach, G.A. and Schlievert, P.M. 1987. Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C1 and relatedness to other pyrogenic toxins. **Mol. Gen. Genet**. 209: 15-20.

Bohach, G.A. and Schlievert, P.M. 1989. Conservation of the biological active portions of staphylococcal enterotoxin C1 and C2. **Infect. Immun**. 57: 2249-2252.

Bryan, F.L. 1976. *Staphylococcus aureus*. pp. 12-105. *Cited* M.P. Defigueiredo and D.F. Splittstoesser,eds. **Food Microbiology: Public Health and Spoilage Aspects**. AVI Publ. Co. Inc., Westport, Connecticut.

Casman, E.P.,A.E. Dorsey and J.A. Issa. 1967. Identification of a fourth Staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D. **J. Bacteriol.** 94: 1875-1882.

Chang, S.C., W.C. Hsieh and K.T. Luh. 1994. Fluoroquinolone resistance among methicillin resistant Staphilococci after usage of fluoroquinolones other than ciprofloxacin in Taiwan. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 19 : 143-147.

Chu, F.S., K.Thadhani, E.J. Schantz and M.S. Bergdoll. 1966. Purification and characterization of Staphylococcal enterotoxin A. **Biochemistry.** 5 : 3281-3289.

Cliver, D.O. and H.P. Riemann. 2002. **Foodborne Disease**. 2nd ed. Elsevier Science Ltd., Academic Press, New York.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. **Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighteenth Informational Supplemen**t. 28 (1).

Couch, J.L., Soltis, M.T. and M.J. Betley. 1988. Cloning and nucleotide sequence of the type E staphylococcal enterotoxin gene**. J. Bacteriol.** 170: 2954-2960.

Dinges, M.M., P.M. Orwin and P.M. Schlievert. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clin. Microbiol. Rev**. 13: 16-34.

Eiff, C., R.R. Reinert, M. Kresken, J. Brauers, D. Hafner and G. Peters. 2000. Nationwide German multicenter study on prevalence of antibiotic resistance in staphylococcal bloodstream isolates and comparative in vitro activities of quinupristin-dalfopristin. **J. Clin. Microbiol.** 38 (8): 2819-2823.

Fitzgerald, J.R., S.R. Monday, T.J. Foster, G.A. Bohach, P.J. Hartigan, W.J. Meaney and C.J. Smith, 2001. Characterization of putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. **J. Bacteriol.** 183: 63-70.

Fujikawa, H. and H. Igarashi. 1988. Rapid latex agglutination test for detection of Staphylococcal enterotoxins A to E that uses high-density latex particles. **Appl. Environ. Microbiol.** 54: 2345-2348.

Gottlieb, T. and D. Mitchell. 1998. The independent evolution of resistance to ciprofloxacin, rifampicin, and fusidic acid in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Australian teaching hospitals (1990-1995). **J. Ant Chem.** 42: 67-73.

Hovde, C.J., Hackett, S.P. and Bohach, G.A. 1990. Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C3 gene: sequence comparison of all three type C staphylococcal enterotoxins. **Mol. Gen. Genet.** 220: 329-333.

Huang, I.Y., T.Shih, C.R.Borja, R.M.Avena and M.S. Bergdoll. 1967. Amino acid composition and terminal amino acids of Staphylococcal enterotoxin C. **Biochemistry.** 6: 1480-1483.

Hui, Y.H., J.R. Gorham, K.D. Murrell and D.O. Cliver. 1994. **Foodborne Disease Handbook.** Marcel Dekker, Inc., United States of America.

Humpreys, H. 2002. *Staphylococus*. pp. 168-173. *Cited* D. Greenwoods, R.C.B. Slack and J.F. Peutherer, eds**. Medical Microbiology**. China.

Jarraud, S., M.A. Peyrat, A. Lim, A. Tristan, M. Bès, C. Mougel, J. Etienne, F. Vandenesch, M. Bonneville and G. Lina. 2001. egc, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **J. Immunol**. 166: 669-677.

Johns Jr, M.B. and S.A. Kahn. 1988. Staphylococcal enterotoxin B gene is associated with a discrete genetic element. **J. Bacteriol.** 170: 4033-4039.

Kawabata, A., S. Ichiyama, Y. Iinuma, Y. Hasegawa, M. Ohta and K. Shimokata. 1997. Exfoliative toxin detection using reverse passive latex agglutination : clinical and epidemiologic applications. **J. Clin. Microbiol**. 35: 1984-1987.

Kenneth, T. 2005. Staphylococcus and staphylococcal Disease. Available Source: http://www.bioinfo.bact.wisc.edu/.../staph.html. Jan 22, 2009.

Larsson, A. and J. Sjoquist. 1989. Novel latex agglutination method with chicken antiprotein a for detection of *Staphylococcus aureus* infections. **J. Clin. Microbiol**. 27: 2856-2857.

Leeuwen W.B., C. Pelt, A. Luijendijk, H.A. Verbrugh and W.H.F. Goessens. 1999. Rapid detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates by the MRSA Screen Latex Agglutination Test. **J. Clin. Microbiol.** 37 (9): 3029-3030.

Mahon, C.R. and G. Manuselies. 2000**. Diagnostic microbiology**. 2nd ed., W.B. Saunders Company, United States of America.

Martin, S.E., E.R. Myers and J.J. Iandolo. 2001. ***Staphylococcus aureus*.** pp. 345-381. *Cited* Y. H. Hui, M.D. Dierson and J.R. Gorham, eds. Foodborne disease. 2nd ed. United State of America.

Marchese, A., G. Balistreri, E. Tonoli, E.A. Debbia and G.C. Schito. 2000. Heterogeneous vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* starins isolated in a large Italian.

Murray, P.R., K.S. Rosenthal, G.S. Kobayashi and M.A. Pfaller. 1994. **Medical microbiology.** 2nd ed., Mosby-Year Book, Inc., United States of America.

_____, _____ and _____. 1998. **Medical microbiology.** 3rd ed., Mosby-Year Book, Inc., United States of America.

_____, _____ and _____. 2002. **Medical Microbiology**. 4th ed. United State of America.

Orwin, P.M., D.Y.M. Leung, H.L. Donahue, R.P. Novick and P.M. Schlievert. 2001. Biochemical and biological properties of Staphylococcal enterotoxin K. **Infect. Immune.** 69: 360-366.

Park, C.E. and R. Szabo. 1986. Evaluation of the reversed passive latex agglutination (RPLA) test kits for detection of Staphylococcal enterotoxins A,B,C, and D in foods. **Can. J. Microbiol.** 32: 723-727.

Park, C.E., D. Warburton, P.J. Laffey and Collaborators. 1996. A Collaborative study on the detection of Staphylococcal enterotoxins in food with and enzyme immunoassay kit (TERCA). **J. Food Prot.** 59 (4): 390-397.

Pesavento, G., B. Ducci, N. Comodo and A. Lo Nostro. 2007. Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: A research for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **J. Food control**. 18 (3): 196-200.

Peterson, A.C., J.J. Black and M.F. Gunderson. 1962. Staphylococci in competition I. Growth of naturally occuring mixed populations in precooked frozoen foods during desfrost. **Appl. Microbiol.** 10: 16-22.

Petras,P. and L.Maskova. 1982. Detection of staphylococcal enterotoxigenicity. **journal of hygiene epidemiology**. 984 (28): 287-295.

Razem, D. and B. Katusin. 1994. The incidence and cost of foodborne diseases in Croatia. **J Food Prot.** 57 (8): 746 - 753.

Rasooly, A. and R.S. Rasooly. 1998. Detection and analysis of Staphylococcal enterotoxin A in food by western immunoblotting. **J. Food. Microbiol.** 41: 205-212.

Renolds, D., H.S. Tranter, R. Sage and P. Hambleton. 1988. Novel method for purification of Staphylococcal enterotoxin A. **Appl. Environ. Microbiol.** 54: 1761-1765.

Schantz, E.J., W.G. Roessler, J. Wagman, L. Spero, D.A. Dunnery and M.S. Bergdoll. 1965. Purification of Staphyloccoccal enterotoxin B. **Biochemistry.** 4: 1011-1016.

Schlievert, P.M., L.M. Jablonski, M. Roggiani, I.Sadler, S. Callantine, D.T. Mitchell, D.H. Ohlendorf and G.A. Bohach. 2000. Pyrogenic toxic superantigen site specificity in toxic shock syndrome and food poisoning in animals. **Infect. Immune.** 68: 3630-3634.

Simkovicova, M. and R.J. Gilbert. 1971. Serological detection of enterotoxin from Foodpoisoning strains of *Staphylococcus aureus*. **J. Med. Microbiol.** 4: 19-30.

Smith, J.L., R.L. Buchanon and S.A. Palumbo. 1983. Effect of food environment on staphylococcal enterotoxin synthesis: A review. **J. Food Prot**. 46 (6): 545 - 555.

Su, Y.C. and A.C.L. Wong. 1995. Optimal condition for the production of unidentified Staphylococcal enterotoxins. **J. Food Prot.** 56: 313-316.

Thompson, N.E., M. Razdan, G. Kuntsmann, J.M. Aschenbach, M.L. Evenson and M.S. Bergdoll. 1986. Detection of Staphylococcal enterotoxins by Enzyme-Linked Immunosorbent Assays and Radioimmunoassaya : comparison of monoclonal and polyclonal antibody systems. **Appl. Environ. Microbiol.** 51: 885-890.

Tsen, H.Y., G.K. Yu, K.C. Wang, S.J. Wang, M.Y. Chang and L.Y. Lin. 1998. Comparison of the enterotoxigenic types toxic shock syndrome toxin I (TSST-1) strains and antibiotic susceptibilities for enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from food and clinical samples. **Food Microbiol.** 15: 33-41.

Varnam A.H. 1991. Foodborne pathogens: An illustrated text. Wolfe publishing Ltd. England.

Wagman, J., R.C. Edwards and E.J. Schantz. 1965. Molecular size, homogeneity, and hydrodynamic properties of purified Staphylococcal enterotoxin B. **Biochemistry.** 4: 1017-1023.

Zhang, S., J.J. Iandolo, and G.C. Stewart. 1998. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (*sej*). **FEMS. Microbiol. Lett.** 168: 227-233.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Baird-Parker agar

ส่วนประกอบของอาหาร Baird-Parker agar base

Pancreatic digest of casein	10	กรัม
Beef extract	5	กรัม
Yeast extract	1	กรัม
Lithium chloride	5	กรัม
Sodium pyruvate	10	กรัม
Glycine	12	กรัม
Agar	17	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ปรับ pH สุดท้ายเป็น 7.0 + 0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ส่วนประกอบของ supplement

Bacto egg yolk tellurite enrichment
(1% potassium tellurite ผสมกับ 50% egg yolk)

วิธีเตรียม

1. ชั่งอาหาร Baird-Parker agar base ให้ได้สัดส่วนกับน้ำ 1 ลิตร แต่เติมน้ำเพียง 950 มิลลิลิตร

2. ต้มจนเดือด หรือใช้ไมโครเวฟ คนให้อาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

3. ทำอาหารให้ปราศจากเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. รอให้อาหารมีอุณหภูมิลดลงประมาณ 50 องศาเซลเซียส ในขณะเดียวกัน อุ่นsupplement (egg yolk tellurite enrichment) โดยคุมให้อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส

5. ผสม 50 มิลลิลิตร ของ supplement ลงใน agar base เขย่าเบาๆให้ผสมกัน เทใส่จานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อบางๆ ประมาณ 12-15 mL/plate รอให้อาหารแข็งและผิวหน้าแห้งจึงจะนำมาใช้ได้

2. Trypticase Soy Broth

ส่วนประกอบ

Pancreatic digest of casein	17	กรัม
Papaic digest of soybean mea	13	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Dipotassium phosphate	2.5	กรัม
Dextrose	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ปรับ pH สุดท้ายเป็น 7.3 + 0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

วิธีเตรียม

1. ชั่งอาหารให้ได้ตามสูตรผสมกับน้ำ 1 ลิตร

2. ต้มจนเดือด หรือใช้ไมโครเวฟ คนให้อาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

3. ทำอาหารให้ปราศจากเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. Nutrient agar

ส่วนประกอบ

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

1. ชั่งอาหารให้ได้ตามสูตรผสมกับน้ำ 1 ลิตร

2. ต้มจนเดือด หรือใช้ไมโครเวฟ คนให้อาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

3. บรรจุลงหลอดทดลอง หลอดละ 5-6 มิลลิลิตร

4. ทำอาหารให้ปราศจากเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. Mueller Hinton agar

ส่วนประกอบ

Beef infusion	300	กรัม
H casein peptone	17.5	กรัม
Starch	1.5	กรัม
Agar	17	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH สุดท้ายเป็น 7.4 + 0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

วิธีเตรียม

1. ชั่งอาหาร Mueller Hinton agar จำนวน 38 กรัม (เนื่องจากการทดลองครั้งนี้ใช้อาหารสำเร็จรูป) ต่อปริมาตรน้ำ 1 ลิตร

2. ต้มจนเดือด หรือใช้ไมโครเวฟ คนให้อาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

3. ทำอาหารให้ปราศจากเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. รอให้อาหารมีอุณหภูมิลดลงประมาณ 50 องศาเซลเซียสเทใส่จานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อบางๆ ประมาณ 12-15 mL/plate รอให้อาหารแข็งและผิวหน้าแห้งจึงจะนำมาใช้ได้

5. Mannitol salt phenol red broth

ส่วนประกอบ

Mannitol	0.5 – 1	กรัม
Phenol red	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

1. ชั่ง phenol red 0.5 – 1 กรัม ผสมกับน้ำ 1 ลิตร เติม Mannitol 15 กรัมคนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

2. บรรจุลงหลอดทดลอง หลอดละ 5-6 มิลลิลิตร

3. ทำอาหารให้ปราศจากเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

แสดงผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *S. aureus* จากตัวอย่างอาหารที่จำหน่ายภายใน
มหาวิทยาเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน และบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร

ตารางภาคผนวกที่ ข1 ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซิน 61 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารจากร้านค้าภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตัวอย่างอาหาร	ร้านค้า	ชนิดของเอนเทอโรท็อกซิน	Methicillin	Vancomycin
ข้าวมันไก่	A	A	17 (S)	16 (S)
ข้าวมันไก่	A	A	18 (S)	17 (S)
ข้าวมันไก่	A	B	19 (S)	18 (S)
แซนด์วิชทูน่า	A	B	21 (S)	17 (S)
หมูทอดกระเทียม	A	B	21 (S)	20 (S)
หมูทอดกระทียม	A	B	22 (S)	17 (S)
แซนด์วิชทูน่า	A	C	21 (S)	16 (S)
ข้าวเหนียวหน้าปลา	A	A&B	18 (S)	15 (S)
น้ำแตงโมปั่น	A	A&B	8 (R)	11 (R)
น้ำแตงโมปั่น	A	A&B	18 (S)	18 (S)
น้ำลิ้นจี่ปั่น	A	A&C	19 (S)	19 (S)
ข้าวมันไก่	B	A	17 (S)	17 (S)
ข้าวมันไก่	B	B	23 (S)	17 (S)
ไก่ทอดหั่น	B	B	22 (S)	18 (S)
ไก่ทอดหั่น	B	B	21 (S)	16 (S)
ไก่ทอดหั่น	B	B	6 (R)	16 (S)
หมูทอดกระเทียม	B	C	18 (S)	17 (S)
แซนด์วิชทูน่า	B	C	19 (S)	18 (S)
ข้าวมันไก่	B	C	17 (S)	19 (S)
ขนมปังไส้สังขยา	B	A&B	19 (S)	17 (S)
ขนมปังไส้สังขยา	B	A&B	21 (S)	16 (S)
น้ำแตงโมปั่น	B	A&B	22 (S)	15 (S)
น้ำแตงโมปั่น	B	A&C	23 (S)	18 (S)
ข้าวมันไก่	C	A	18 (S)	17 (S)
หมูทอดกระเทียม	C	A	19 (S)	16 (S)
แซนด์วิชทูน่า	C	A&C	18 (S)	10 (R)
แซนด์วิชทูน่า	C	A&C	17 (S)	16 (S)
ขนมปังไส้สังขยา	C	B	18 (S)	16 (S)
ขนมปังไส้สังขยา	C	B	19 (S)	15 (S)

ตารางภาคผนวกที่ ข1 (ต่อ)

ตัวอย่างอาหาร	ร้านค้า	ชนิดของเอนเทอโรท็อกซิน	Methicillin	Vancomycin
ขนมปังไส้สังขยา	C	B	18 (S)	17 (S)
ข้าวมันไก่	C	B	18 (S)	18 (S)
ข้าวเหนียวหน้าปลา	C	B	19 (S)	15 (S)
ข้าวเหนียวหน้าปลา	C	C	20 (S)	16 (S)
ข้าวเหนียวหน้าสังขยา	C	C	8 (R)	17 (S)
ข้าวเหนียวหน้าสังขยา	C	C	18 (S)	18 (S)
น้ำลิ้นจี่ปั่น	C	C	19 (S)	17 (S)
น้ำลิ้นจี่ปั่น	C	C	18 (S)	16 (S)
น้ำลิ้นจี่ปั่น	C	A&C	7 (R)	6 (R)
ไก่ทอดหั่น	D	A	21 (S)	18 (S)
ไก่ทอดหั่น	D	A	22 (S)	17 (S)
ไก่ทอดหั่น	D	A	21 (S)	15 (S)
หมูทอดกระเทียม	D	A	23 (S)	16 (S)
ขนมปังไส้สังขยา	D	A	22 (S)	18 (S)
ขนมปังไส้สังขยา	D	A	19 (S)	19 (S)
ข้าวมันไก่	D	B	18 (S)	16 (S)
ข้าวเหนียวหน้าปลา	D	A	17 (S)	18 (S)
ข้าวมันไก่	D	B	16 (S)	19 (S)
ข้าวเหนียวหน้าปลา	D	A	19 (S)	17 (S)
ข้าวเหนียวหน้าสังขยา	D	B	21 (S)	16 (S)
ข้าวมันไก่	D	B	22 (S)	16 (S)
ข้าวมันไก่	D	B	19 (S)	17 (S)
ข้าวเหนียวหน้าสังขยา	D	C	18 (S)	9 (R)
ข้าวมันไก่	D	C	23 (S)	17 (S)
ข้าวมันไก่	D	C	17 (S)	18 (S)
น้ำแตงโมปั่น	D	A&B	19 (S)	15 (S)
น้ำแตงโมปั่น	D	A&C	10 (R)	16 (S)
น้ำแตงโมปั่น	D	A&C	19 (S)	19 (S)
น้ำแตงโมปั่น	D	A&C	18 (S)	20 (S)
น้ำลิ้นจี่ปั่น	D	A&C	22 (S)	16 (S)
น้ำลิ้นจี่ปั่น	D	A&C	23 (S)	16 (S)
น้ำลิ้นจี่ปั่น	D	A&C	22 (S)	17 (S)

ตารางภาคผนวกที่ ข2 ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรท็อกซิน 76 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารจากร้านค้าบริเวณตลาดสี่แยกเกษตร

ตัวอย่างอาหาร	ร้านค้า	ชนิดของเอนเทอโรท็อกซิน	Methicillin	Vancomycin
หมูทอดกระเทียม	A	A	18 (S)	17 (S)
หมูทอดกระเทียม	A	A	22 (S)	16 (S)
หมูทอดกระเทียม	A	A	19 (S)	15 (S)
ไก่ทอดหั่น	A	A	21 (S)	16 (S)
ไก่ทอดหั่น	A	A	21 (S)	15 (S)
ไก่ทอดหั่น	A	B	18 (S)	17 (S)
ข้าวมันไก่	A	B	6 (R)	11 (R)
ข้าวมันไก่	A	B	18 (S)	17 (S)
ข้าวมันไก่	A	B	17 (S)	18 (S)
ข้าวเหนียวสังขยา	A	A	18 (S)	19 (S)
ข้าวเหนียวหน้าปลา	A	B	22 (S)	15 (S)
แซนด์วิชทูน่า	A	C	21 (S)	16 (S)
แซนด์วิชทูน่า	A	A&C	23 (S)	16 (S)
น้ำแตงโมปั่น	A	A&C	19 (S)	15 (S)
น้ำแตงโมปั่น	B	A&C	6 (R)	17 (S)
น้ำลิ้นจี่ปั่น	B	A&C	17 (S)	15 (S)
น้ำลิ้นจี่ปั่น	B	A	19 (S)	16 (S)
แซนด์วิชทูน่า	B	A	23 (S)	16 (S)
แซนด์วิชทูน่า	B	A	21 (S)	17 (S)
แซนด์วิชทูน่า	B	B	22 (S)	15 (S)
หมูทอดกระเทียม	B	B	13 (R)	16 (S)
ข้าวเหนียวหน้าปลา	B	B	18 (S)	16 (S)
ข้าวเหนียวหน้าปลา	B	C	18 (S)	17 (S)
ข้าวเหนียวสังขยา	B	C	18 (S)	18 (S)
น้ำแตงโมปั่น	B	A&B	19 (S)	15 (S)
ข้าวมันไก่	B	A&C	22 (S)	16 (S)
ข้าวมันไก่	B	A&C	21 (S)	15 (S)
ไก่ทอดหั่น	B	A&C	21 (S)	16 (S)
ไก่ทอดหั่น	B	A&C	18 (S)	15 (S)

ตารางภาคผนวกที่ ข2 (ต่อ)

ตัวอย่างอาหาร	ร้านค้า	ชนิดของเอนเทอโรท็อกซิน	Methicillin	Vancomycin
ไก่ทอดหั่น	B	A&B&C&D	18 (S)	8 (R)
หมูทอดกระเทียม	C	A	19 (S)	16 (S)
น้ำแตงโมปั่น	C	A	17 (S)	15 (S)
แซนด์วิชทูน่า	C	A	18 (S)	17 (S)
แซนด์วิชทูน่า	C	A	19 (S)	18 (S)
แซนด์วิชทูน่า	C	A	23 (S)	16 (S)
ขนมปังไส้สังขยา	C	A	21 (S)	15 (S)
ขนมปังไส้สังขยา	C	B	22 (S)	17 (S)
น้ำลิ้นจี่ปั่น	C	B	19 (S)	19 (S)
ข้าวเหนียวสังขยา	C	B	11 (R)	18 (S)
ข้าวเหนียวสังขยา	C	B	17 (S)	17 (S)
ข้าวเหนียวสังขยา	C	B	19 (S)	19 (S)
น้ำแตงโมปั่น	C	B	21 (S)	16 (S)
น้ำแตงโมปั่น	C	B	22 (S)	18 (S)
น้ำแตงโมปั่น	C	B	23 (S)	16 (S)
ข้าวมันไก่	C	C	20 (S)	6 (R)
ข้าวมันไก่	C	A&B	20 (S)	17 (S)
ไก่ทอดหั่น	C	A&B	21 (S)	18 (S)
ไก่ทอดหั่น	C	A&B	9 (R)	16 (S)
ไก่ทอดหั่น	C	A&B	18 (S)	15 (S)
หมูทอดกระเทียม	C	A&B	21 (S)	17 (S)
หมูทอดกระเทียม	C	A&C	19 (S)	15 (S)
หมูทอดกระเทียม	C	A&C	19 (S)	16 (S)
หมูทอดกระเทียม	C	A&C	11 (R)	17 (S)
น้ำลิ้นจี่ปั่น	D	A	19 (S)	16 (S)
น้ำแตงโมปั่น	D	B	20 (S)	17 (S)
น้ำแตงโมปั่น	D	B	21 (S)	18 (S)
น้ำแตงโมปั่น	D	B	22 (S)	15 (S)
ข้าวมันไก่	D	B	21 (S)	15 (S)
ข้าวมันไก่	D	B	23 (S)	15 (S)
ข้าวมันไก่	D	B	11 (R)	16 (S)

ตารางภาคผนวกที่ ข2 (ต่อ)

ตัวอย่างอาหาร	ร้านค้า	ชนิดของเอนเทอโรท็อกซิน	Methicillin	Vancomycin
ไก่ทอดหั่น	D	B	18 (S)	17 (S)
ไก่ทอดหั่น	D	C	19 (S)	16 (S)
ไก่ทอดหั่น	D	C	22 (S)	17 (S)
ไก่ทอดหั่น	D	C	21 (S)	16 (S)
ไก่ทอดหั่น	D	C	21 (S)	15 (S)
แซนด์วิชทูน่า	D	C	20 (S)	17 (S)
ขนมปังไส้สังขยา	D	A&B	19 (S)	18 (S)
ขนมปังไส้สังขยา	D	A&B	23 (S)	18 (S)
ขนมปังไส้สังขยา	D	A&B	24 (S)	18 (S)
ขนมปังไส้สังขยา	D	A&B	26 (S)	16 (S)
ข้าวเหนียวหน้าปลา	D	A&B	18 (S)	15 (S)
ข้าวเหนียวหน้าปลา	D	A&B	23 (S)	16 (S)
ข้าวเหนียวหน้าปลา	D	A&B	22 (S)	15 (S)
ข้าวเหนียวหน้าปลา	D	A&B	19 (S)	16 (S)
ข้าวเหนียวหน้าปลา	D	A&C	21 (S)	17 (S)
ข้าวเหนียวหน้าปลา	D	A&C	13 (R)	15 (S)

ภาคผนวก ค

การเตรียมความขุ่นมาตรฐานและความกว้างของ inhibition zone เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบการทดสอบความไวต่อการถูกทำลายของเชื้อด้วยยาปฏิชีวนะ

การเตรียมความขุ่นมาตรฐาน

(Mc.Farland nephelometer Standards)

การเตรียมความขุ่นมาตรฐานตามวิธีของ McFarland (McFarland nephelometer) โดยใช้กรดซัลฟูริค และแบเรียมคลอไรด์ มีขั้นตอนการเตรียมดังต่อไปนี้

1. เตรียม 1% ของ H_2SO_4 บริสุทธิ์

2. เตรียม 1% aqueous solution ของ $BaCl_2$

3. ผสมสารในข้อ 1 และ 2 ในหลอดทดสอบใหม่ๆ ที่ไม่มีรอยฝ้ามัว และต้องล้างให้สะอาด การผสมสารทั้ง 2 ในปริมาณเท่าใดขึ้นอยู่กับความต้องการว่าจะเตรียมเป็น McFarland tube number ที่เท่าใด ถ้าเตรียม tube number สูงขึ้นก็จะมีความขุ่นมากขึ้น ซึ่งจะเทียบได้กับปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียมากขึ้น

ในการผสม 1% H_2SO_4 และ 1% $BaCl_2$ ปริมาณเท่าใดในตารางข้างล่าง

ตารางผนวกที่ ค1 การเตรียมความขุ่นมาตรฐาน (Mc.Farland Standards)

Tube number	0.5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1% $BaCl_2$ (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1
1% H_2SO_4 (ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9
Approx.cell density (x 10^8 / ml)	1.5	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

ตารางผนวกที่ ค2 ความกว้างของ inhibition zone เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบการทดสอบความไวต่อการถูกทำลายของเชื้อด้วยยาปฏิชีวนะ (CLSI, 2008)

Group	Antimicrobial Agent	Disk content	Zone Diameter,Nearest Whole mm		
			R	I	S
		Penicillins			
A	Penicillin	10 units	≤ 28	-	≥ 29
	Oxacillin	30μg cefoxitin	≤ 21	-	≥ 22
		1μg oxacillin	≤ 10	11-12	≥ 13
O	Ampicillin	10 μg	≤ 28	-	≥ 29
	Methicillin	5 μg	≤ 9	10-13	≥ 14
	Nafcillin	1 μg			
		β-Lactam/ β-Lactamase inhibitor combinations			
O	Amoxicillin-clavulanic acid	20/10μg	≤ 19	-	≥ 20
O	Ampicillin-sulbactam	10/10μg	≤ 11	12-14	≥ 15
O	Piperacillin-tazobactam	100/10μg	≤ 17	-	≥ 15
O	Ticarcillin-clavulanic acid	75/10μg	≤ 22		≥ 23
		Cephems (Parental)			
O	Cefamandole	30μg	≤ 14	15-17	≥ 18
O	Cefazolin	30μg	≤ 14	15-17	≥ 18
O	Cefepime	30μg	≤ 14	15-17	≥ 18
O	Cefmetazole	30μg	≤ 12	13-15	≥ 16
O	Cefonicid	30μg	≤ 14	15-17	≥ 18
O	Cefoperazone	75μg	≤ 15	16-20	≥ 21
O	Cefotaxime	30μg	≤ 14	15-22	≥ 23
O	Cefotetan	30μg	≤ 12	13-15	≥ 16
O	Ceftazidime	30μg	≤ 14	15-17	≥ 18
O	Ceftizoxime	30μg	≤ 14	15-19	≥ 20

ตารางผนวกที่ ค2 (ต่อ)

Group	Antimicrobial Agent	Disk content	Zone Diameter,Nearest Whole mm		
			R	I	S
O	Ceftriaxone	30μg	≤ 13	14-20	≥ 21
O	Cefuroxime (parenteral)	30μg	≤ 14	15-17	≥ 18
O	Cephalothin	30μg	≤ 14	15-17	≥ 18
O	Moxalactam	30μg	≤ 14	15-22	≥ 23
		Cephems (oral)			
O	Cefaclor	30μg	≤ 14	15-17	≥ 18
O	Cefdinir	5 μg	≤ 16	17-19	≥ 20
O	Cefpodoxime	10 μg	≤ 17	18-20	≥ 21
O	Cefprozil	30μg	≤ 14	15-17	≥ 18
O	Cefuroxime (oral)	30μg	≤ 14	15-22	≥ 23
O	Loracarbef	30μg	≤ 14	15-17	≥ 18
		Carbapenems			
O	Ertapenem	10μg	≤ 15	16-18	≥ 19
O	Imipenem	10μg	≤ 13	14-15	≥ 16
O	Meropenem	10μg	≤ 13	14-15	≥ 16
		Glycopeptides			
B	Vancomycin	30μg	-	-	≥ 15
Inv	Teicoplanin	30μg	≤ 10	11-13	≥ 14
		Aminoglycosides			
C	Gentamicin	10μg	≤ 12	13-14	≥ 15
O	Amikacin	30μg	≤ 14	15-16	≥ 17
O	Kanamycin	30μg	≤ 13	14-17	≥ 18
O	Netilmicin	30μg	≤ 12	13-14	≥ 15
O	Tobramycin	10μg	≤ 12	13-14	≥ 15

ตารางผนวกที่ ค2 (ต่อ)

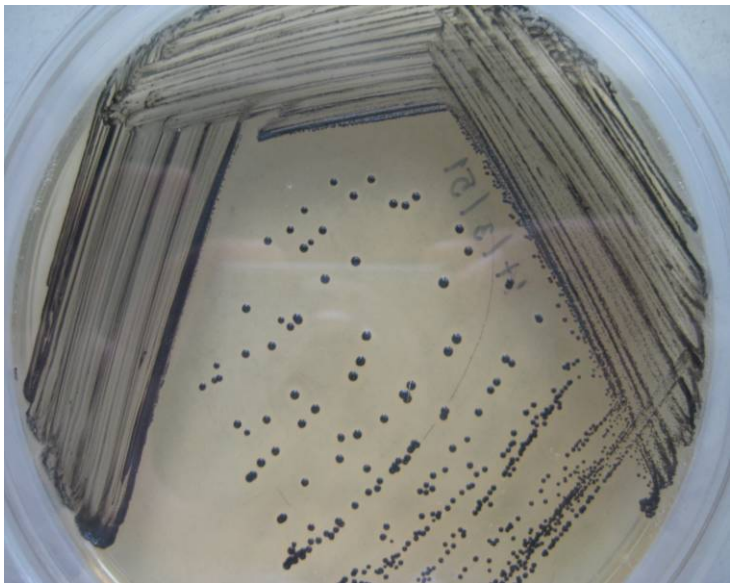
Group	Antimicrobial Agent	Disk content	Zone Diameter,Nearest Whole mm		
			R	I	S
		Macrolides			
A	Azithromycin or	15μg	≤ 13	14-17	≥ 18
A	clarithromycin or	15μg	≤ 13	14-17	≥ 18
A	erythromycin	15μg	≤ 13	14-22	≥ 23
O	Dirithromycin	15μg	≤ 15	16-18	≥ 19
		Ketolides			
B	Telithromycin	15μg	≤ 18	19-21	≥ 22
		Tetracyclines			
B	Tetracycline	30μg	≤ 14	15-18	≥ 19
B	Doxycycline	30μg	≤ 12	13-15	≥ 16
O	Minocycline	30μg	≤ 14	15-18	≥ 19
		Fluoroquinolones			
C	Ciprofloxacin or	5μg	≤ 15	16-20	≥ 21
C	levofloxacin or	5μg	≤ 15	16-18	≥ 19
C	ofloxacin	5μg	≤ 14	15-17	≥ 18
C	Moxifloxacin	5μg	≤ 20	21-23	≥ 24
U	Lomefloxacin	10μg	≤ 18	19-21	≥ 22
U	Norfloxacin	10μg	≤ 12	13-16	≥ 17
O	Gatifloxacin	5μg	≤ 19	20-22	≥ 23
O	Grepafloxacin	5μg	≤ 14	15-17	≥ 18
O	Sparfloxacin	5μg	≤ 15	16-18	≥ 19
Inv	Fleroxacin	5μg	≤ 15	16-18	≥ 19
		Nitrofurantoins			
U	Nitrofurantoin	300μg	≤ 14	15-16	≥ 17
		Lincosamides			

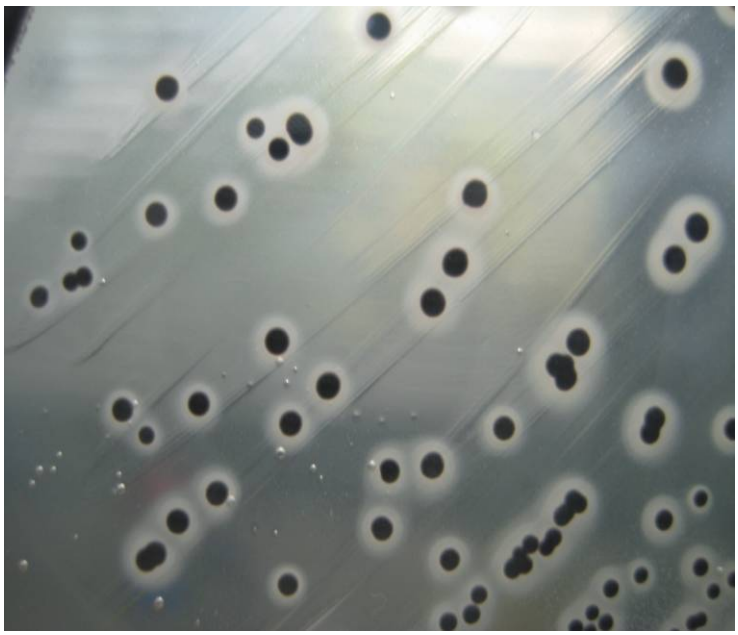
ตารางผนวกที่ ค2 (ต่อ)

Group	Antimicrobial Agent	Disk content	Zone Diameter,Nearest Whole mm		
			R	I	S
A	Clindamycin	2μg	≤ 14	15-20	≥ 21
		Folate pathway inhibitors			
A	Trimethoprim-sulfamethoxazole	1.25/23.75μg	≤ 10	11-15	≥ 16
U	Sulfonamides	250 or 300μg	≤ 12	13-16	≥ 17
U	Trimethoprim	5μg	≤ 10	11-15	≥ 16
		Phenicoles			
C	Chloramphenicol	30μg	≤ 12	13-17	≥ 18
		Ansamycins			
B	Rifampin	5μg	≤ 16	17-19	≥ 20
		Streptogramins			
C	Quinupristin-dalfopristin	15μg	≤ 15	16-18	≥ 19
		Oxazolidinones			
B	Linezolid	30μg	-	-	≥ 21

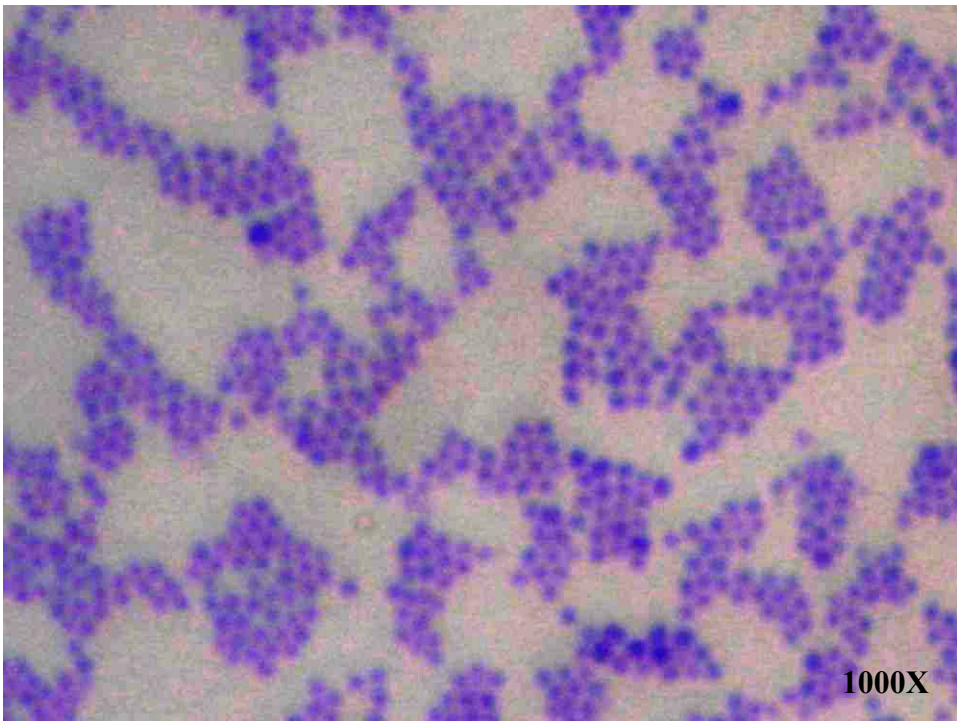
ภาพผนวก ง

ภาพแสดงลักษณะโคโลนี รูปร่างเชื้อ *S. aureus* การยืนยันผลด้วยวิธีทางจุลชีววิทยาและชีวเคมี การทดสอบเอนเทอโรท็อกซิน และการทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะ

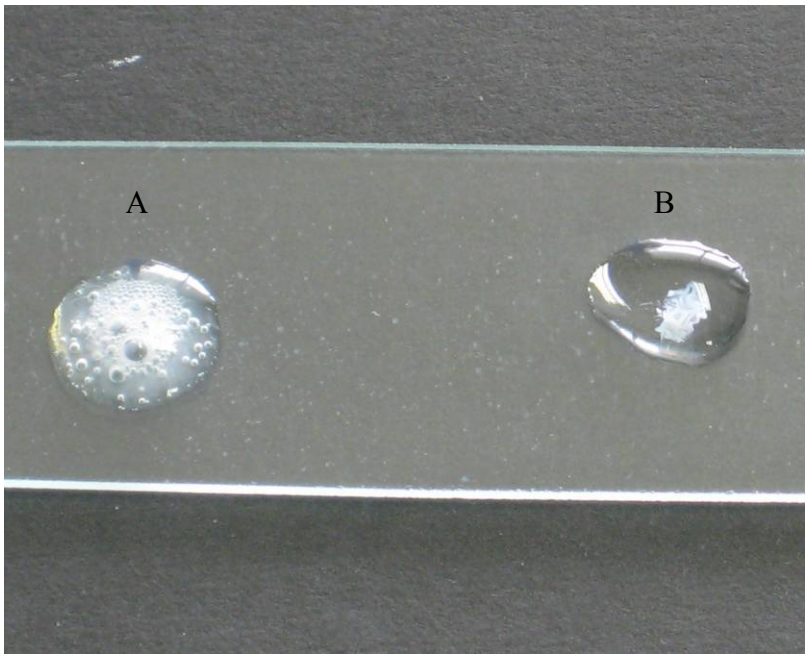




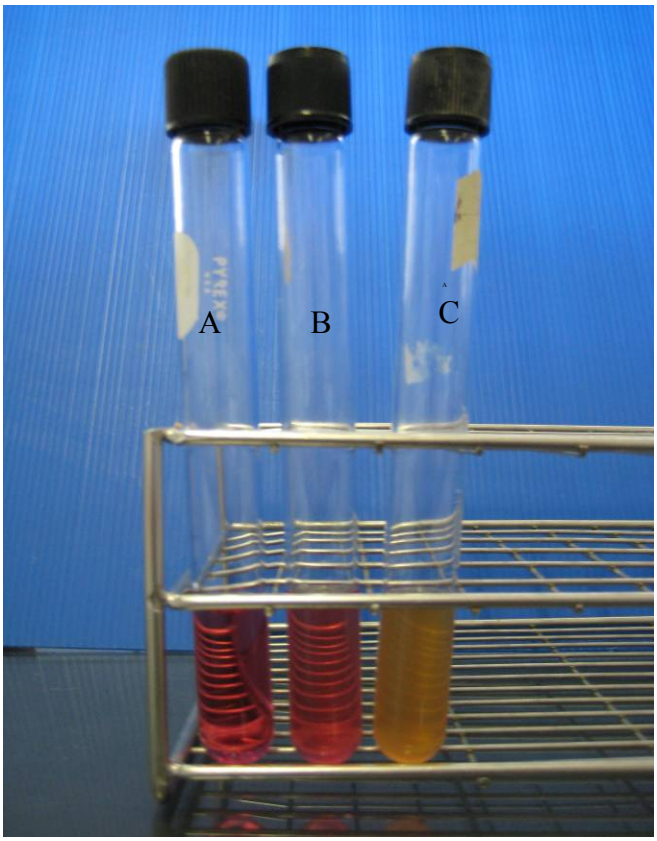
ภาพผนวกที่ ง1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *S. aureus* อายุ 48 ชั่วโมง บนอาหาร Baird-Parker Agar โคโลนีสีดำมันวาว มีตะกอนขุ่นขาวรอบนอก และมีโซนใสอยู่รอบนอกอีกที



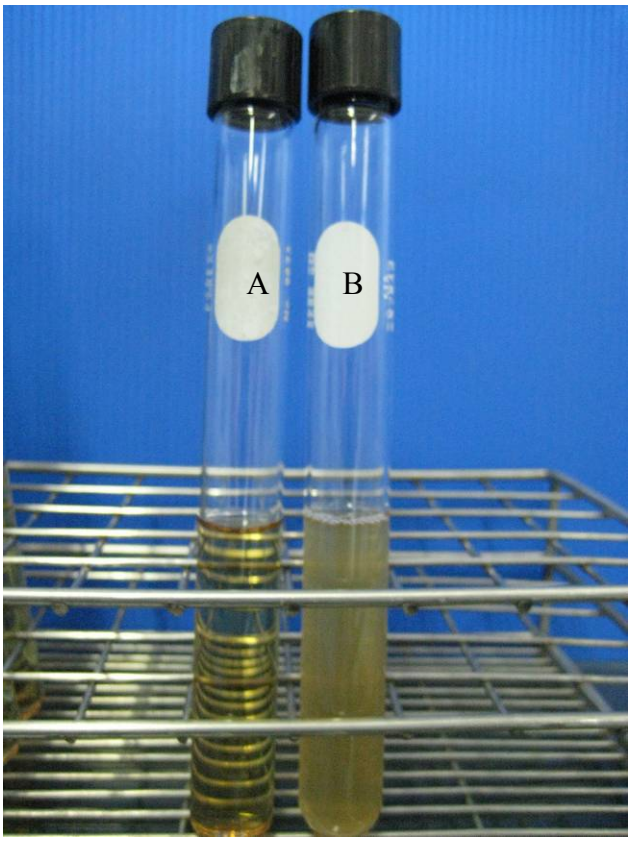
ภาพผนวกที่ ง2 ลักษณะรูปร่างของเชื้อ *S.aureus* เมื่อย้อมสีแกรมและส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า *S. aureus* จะติดสีแกรมบวก รูปร่างกลม อยู่กันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น



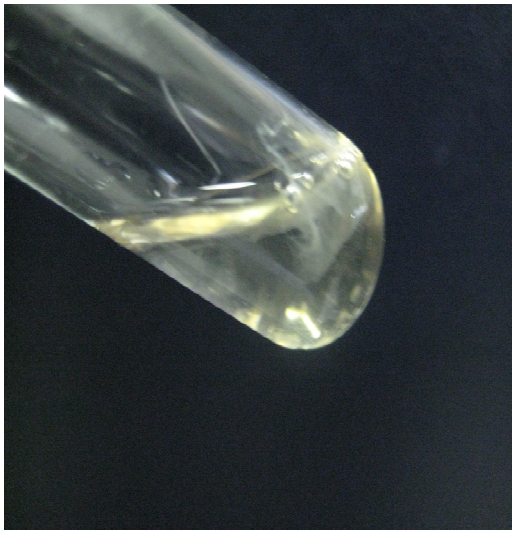
ภาพผนวกที่ ง3 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ catalase ภาพ A แสดง positive control มีการเกิดฟองแก๊ส ภาพ B แสดง negative control ไม่มีการเกิดฟองแก๊ส



ภาพผนวกที่ ง4 การเฟอร์เมนต์น้ำตาล mannitol ภาพ A แสดง negative control ภาพ B แสดงเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* ที่ไม่สามารถเฟอร์เมนต์น้ำตาล mannitol ได้ ภาพ C แสดงเชื้อ *S.aureus* ที่สามารถเฟอร์เมนต์น้ำตาล mannitol ได้ ทำให้สารบ่งชี้ phenol red เปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง

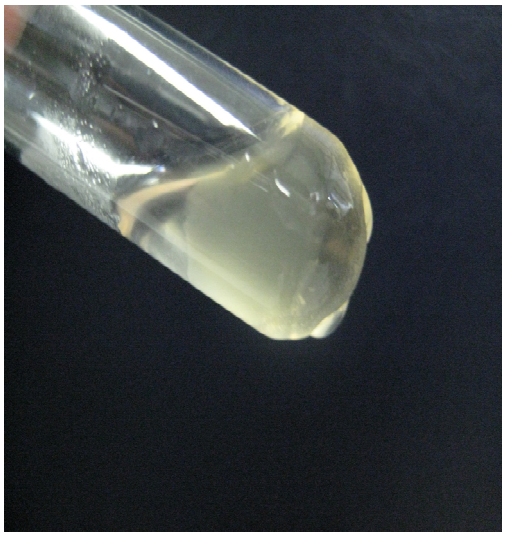


ภาพผนวกที่ ง5 การทดสอบการทนเกลือ 10% NaCl ภาพ A แสดง negative control ภาพ B แสดง positive control เชื้อ *S.aureus* สามารถทนเกลือได้ถึง 10% โดยดูการเจริญจากความขุ่น

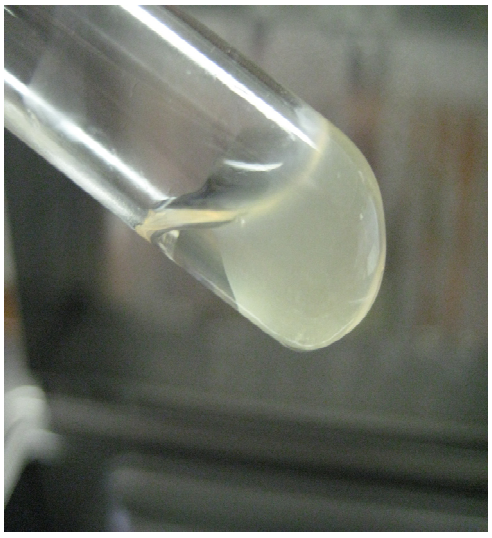


+

++



+++

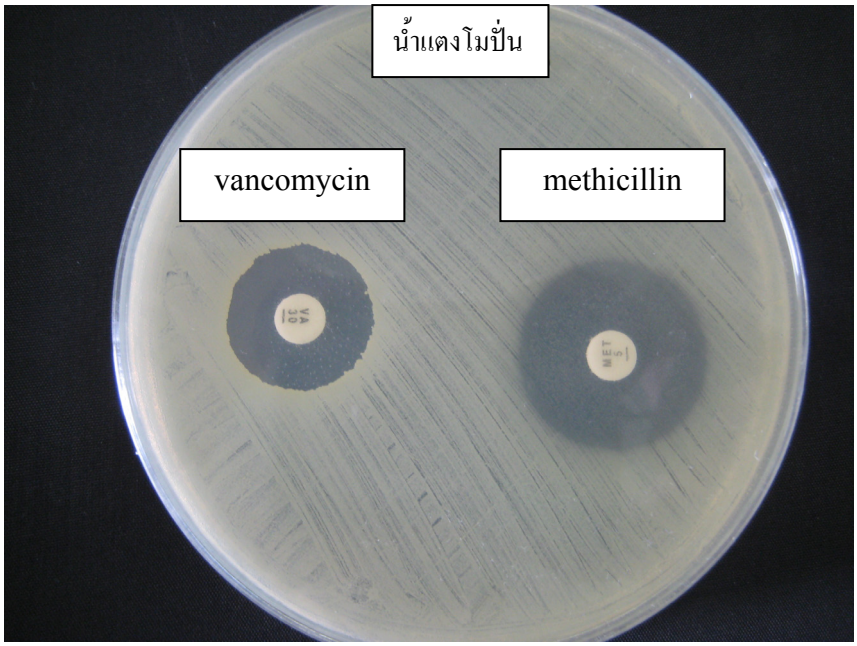


++++

ภาพผนวกที่ ง6 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ coagulase

ภาพผนวกที่ ง7 ตัวอย่างชุดทดสอบสำเร็จรูป (kit test) สำหรับใช้ตรวจหาเอนเทอโรท็อกซินชนิดต่างๆ ที่สร้างจากเชื้อ *S. aures* โดยวิธี Reverse Passive Latex Agglutination (RPLA)

ภาพผนวกที่ ง8 แสดงตัวอย่างผลิตภัณฑ์ยาปฏิชีวนะสำเร็จรูป Oxoid ที่ใช้ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *S. aureus*



ภาพผนวกที่ ง9 แสดงผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ methicillin และ vancomycin ของเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากน้ำแตงโมปั่น จากร้านค้าที่จำหน่ายภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาว พราว ศุภจริยาวัตร
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันจันทร์ ที่ 10 กันยายน พ.ศ. 2527
สถานที่เกิด	จังหวัดมหาสารคาม
ประวัติการศึกษา	วทบ.(ชีววิทยา)
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	ได้รับรางวัลผลงานวิจัยดีประเภทบรรยาย กลุ่มวิทยาศาสตร์สุขภาพ ในการประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติครั้งที่ 11 ณ มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ในพระบรมราชูปถัมภ์
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-