

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) โครงการวิจัยนำร่องการประเมินและการจัดการความเสี่ยงของ *Listeria* spp. ในผลิตภัณฑ์ไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็ง

(ภาษาอังกฤษ) PILOT PROJECT OF RISK ASSESSMENT AND MANAGEMENT OF *Listeria* spp. IN COOKED FROZEN CHICKEN MEAT PRODUCT

ชื่อหัวหน้าโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร.สุวิมล กิริติพิบูล ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร คณะ/ สถาบัน คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อผู้ร่วมโครงการ น.สพ. รุจเวทย์ ทหารแก้ว สถาบัน ศูนย์วิจัยและพัฒนา เครื่องเบทาโกร

ชื่อผู้ร่วมโครงการ ดร.มงคล เวสารัชเวศย์ (นามไพศาลสุข) สถาบัน ศูนย์วิจัยและพัฒนา เครื่องเบทาโกร

ชื่อผู้ร่วมโครงการ นางสาวดารณี ศรีสิทธินาม สถาบัน ศูนย์วิจัยและพัฒนา เครื่องเบทาโกร

ชื่อผู้ร่วมโครงการ นางสาวพรณิดา เตชะหรุวิจิตร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะ/ สถาบัน คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากโครงการส่งเสริมการทำงานวิจัยเชิงลึกในสาขาวิชาที่มีศักยภาพสูง กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช หรือ CU-CLUSTER-FUND และธนาคารกสิกรไทย จำกัด

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความเสี่ยง โดยศึกษาแหล่งที่มาและเส้นทางการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. ในกระบวนการผลิตไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็งโดยใช้วิธีทางอนุชีววิทยา และหาแนวทางการควบคุม และจัดการความเสี่ยง เพื่อลดการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. ในผลิตภัณฑ์สุดท้าย งานวิจัยนี้ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) โดยเริ่มจากการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ได้คัดเลือกไพรเมอร์ 4 ชนิดจาก 14 ชนิด จากนั้นจึงศึกษาความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมกับไพรเมอร์ที่เลือก พบว่าไพรเมอร์ที่สามารถจำแนกสายพันธุ์ของ *L. innocua* ได้ดีคือ OMP-01, HLWL 74 , HLWL 85 และ Universal forward sequencing primer (UFS) ความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมกับไพรเมอร์ทั้ง 4 ชนิดคือ 5 ng/μl จากนั้นจึงตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยวิธี RAPD แล้วประเมินความสอดคล้องของการปนเปื้อนของเชื้อในผลิตภัณฑ์และในสิ่งแวดล้อม พบว่าตัวอย่างผลิตภัณฑ์และสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อน *Listeria* spp. รวม 415 ตัวอย่าง พบ *L. innocua* 82.3%, *L. welshimeri* 11.2%, *L. seeligeri* 5.5% และ *L. monocytogenes* 1% เมื่อจำแนกสายพันธุ์ของ *Listeria* spp. พบ *L. innocua* สายพันธุ์ LI 1.1, *L. welshimeri* สายพันธุ์ LW 1.5 และ *L. seeligeri* สายพันธุ์ LS 1 ในผลิตภัณฑ์ โดยพบ *L. innocua* สายพันธุ์ LI 1.1 ดำรงอยู่มากที่สุดในสิ่งแวดล้อมตลอดระยะเวลาการเก็บตัวอย่าง และพบแหล่งการปนเปื้อนที่สำคัญคือท่อระบายก๊าซไนโตรเจนของเครื่อง Liquid N₂ chiller, สายพานลำเลียงของเครื่องตรวจจับ โลหะ และท่อระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็ง ดังนั้นจึงได้มีการทบทวนวิธีการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อ และนำไปปฏิบัติใช้อย่างเข้มงวด เพื่อลดและกำจัดความเสี่ยงของการปนเปื้อนของ *Listeria* ในกระบวนการผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็งนี้

Abstract

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

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ข
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
สารบัญเรื่อง.....	จ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ.....	ซ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. วิธีดำเนินงานวิจัย.....	3
2.1 ศึกษากระบวนการผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็ง.....	3
2.2 หาคความชุกของการปนเปื้อน <i>Listeria</i> spp. ในผลิตภัณฑ์สุดท้าย และ ผลิตภัณฑ์ระหว่างขั้นตอนการผลิต.....	3
2.3 หาคความชุกของการปนเปื้อน <i>Listeria</i> spp. บริเวณพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมใน ส่วนหลังการปรุงสุก.....	4
2.4 หาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบสุ่มในการจำแนก <i>Listeria</i> spp.	5
2.4.1 คัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการแบบสุ่ม	6
2.4.2 ศึกษาความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมกับไพรเมอร์ที่เลือก.....	8
2.4.3 เปรียบเทียบวิธี RAPD กับวิธีที่ใช้ในทางการค้า.....	9
2.4.4 ทดสอบความสามารถในการทำซ้ำ (Reproducibility).....	9
2.5 ประเมินความสอดคล้องของการปนเปื้อนของ <i>Listeria</i> spp. ในผลิตภัณฑ์และ ในสิ่งแวดล้อม.....	9
2.6 เสนอวิธีการสำหรับการจัดการความเสี่ยง.....	9

	หน้า
3. ผลการดำเนินงานวิจัยและการวิจารณ์ผล.....	10
3.1 การปนเปื้อนของ <i>Listeria</i> ระดับชนิด (species) ในผลิตภัณฑ์และสิ่งแวดล้อม.....	10
3.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบสุ่ม.....	14
3.2.1 การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการแบบสุ่ม.....	14
3.2.2 การศึกษาความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมกับไพรเมอร์ที่เลือก...	17
3.2.3 การเปรียบเทียบวิธี RAPD กับวิธีที่ใช้ในทางการค้า (วิธี ribotyping).....	18
3.2.4 การทดสอบความสามารถในการทำซ้ำ (Reproducibility).....	20
3.3 ความชุกของ <i>Listeria</i> ชนิดต่างๆในระดับสายพันธุ์.....	21
3.4 การประเมินความสอดคล้องของการปนเปื้อนของ <i>Listeria</i> ในระดับสายพันธุ์ ในผลิตภัณฑ์และสิ่งแวดล้อม.....	36
3.5 การจัดการความเสี่ยง.....	40
4. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	43
รายการอ้างอิง.....	45
ภาคผนวก.....	48
ประวัตินักวิจัยและคณะ.....	53

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 จุดเก็บตัวอย่างสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิต แบ่งตามระดับความเสี่ยงของการปนเปื้อนสู่ผลิตภัณฑ์.....	4
2 ไพรมเมอร์ที่ใช้ทดสอบ.....	7
3 ความชุกและชนิดของ <i>Listeria</i> ที่พบในสิ่งแวดล้อมของกระบวนการผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็ง.....	10
4 ความชุกของ <i>Listeria</i> ชนิดต่างๆ บนพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิต แบ่งตามโซนการเก็บตัวอย่าง.....	12
5 จำนวนรูปแบบของผลผลิตลูกโซ่โพลีเมอเรสของตัวอย่าง <i>Listeria</i> ที่ใช้ทดสอบไพรมเมอร์ต่างๆ.....	17
6 ผลการจำแนกสายพันธุ์ <i>Listeria</i> ด้วยวิธีที่ใช้ในทางการค้า (วิธี ribotyping).....	19
7 ความชุกและสายพันธุ์ของ <i>L. innocua</i> ที่พบในกระบวนการผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็ง.....	22
8 ความชุกของ <i>L. innocua</i> สายพันธุ์ต่างๆ บนพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิต แบ่งตามโซนการเก็บตัวอย่าง.....	23
9 หมายเลขกำกับแหล่งที่พบ <i>L. innocua</i> LI 1.1 ในแผนผังแสดงพื้นที่ของบริเวณการผลิต.....	27
10 ความชุกและสายพันธุ์ของ <i>L. welshimeri</i> ที่พบในกระบวนการผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็ง.....	30
11 ความชุกของ <i>L. welshimeri</i> สายพันธุ์ต่างๆ บนพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิต แบ่งตามโซนการเก็บตัวอย่าง.....	31
12 การจำแนกในระดับสายพันธุ์ของ <i>L. monocytogenes</i> ที่พบ 4 ตัวอย่าง.....	35
13 การพบ <i>L. innocua</i> LI 1.1 ที่พื้นผิวของสิ่งแวดล้อมต่างๆ ในวันที่ผลิตผลิตภัณฑ์ที่พบการปนเปื้อนหรือวันที่ใกล้เคียง.....	37
14 การพบ <i>L. innocua</i> ที่ท่อระบายก๊าซฝั่งผลิตภัณฑ์เข้าและออกของเครื่อง liquid N ₂ chiller.....	39
15 ความชุกของ <i>Listeria</i> สายพันธุ์ต่างๆ ที่พบในสิ่งแวดล้อมของการผลิตหลังการจัดการความเสี่ยง.....	41

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ภาพ Gel electrophoresis ของตัวอย่าง <i>L. innocua</i> 15 ตัวอย่าง สำหรับใช้ในการคัดเลือกตัวอย่างเพื่อใช้ทดสอบไพรมอร์.....	14
2 ภาพ Gel electrophoresis ของตัวอย่าง <i>L. welshimeri</i> 7 ตัวอย่าง สำหรับใช้ในการคัดเลือกตัวอย่างเพื่อใช้ทดสอบไพรมอร์.....	15
3 ภาพ Gel electrophoresis ของตัวอย่าง <i>L. seeligeri</i> 10 ตัวอย่าง สำหรับใช้ในการคัดเลือกตัวอย่างเพื่อใช้ทดสอบไพรมอร์.....	15
4 ภาพ Gel electrophoresis ที่แต่ละความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบของ <i>L. innocua</i> จากไพรมอร์ (a) OMP-01, (b) HLWL74, (c) HLWL85 และ (d) UFS.....	18
5 ผลการจำแนกสายพันธุ์ <i>Listeria</i> ด้วยวิธี RAPD (4 ไพรมอร์) เพื่อใช้เปรียบเทียบกับวิธีที่ใช้ในทางการค้า.....	19
6 ภาพ Gel electrophoresis ของ (a) <i>Listeria</i> spp. จาก 4 ไพรมอร์เปรียบเทียบกันสองครั้งและ (b) <i>L. innocua</i> จากไพรมอร์ OMP-01	20
7 แผนผังแสดงการพบ <i>L. innocua</i> LI 1.1 ณ จุดต่างๆ ในบริเวณการผลิต.....	26
8 แผนผังแสดงการพบ <i>L. welshimeri</i> LW 1.7 ณ จุดต่างๆ ในบริเวณการผลิต.....	32
9 ภาพ Gel electrophoresis ของ <i>L. seeligeri</i> 22 ตัวอย่าง ที่พบปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมของบริเวณการผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็ง.....	33
10 แผนผังแสดงการพบ <i>L. seeligeri</i> LS 1 ณ จุดต่างๆ ในบริเวณการผลิต.....	34
11 แผนผังแสดงแหล่งการปนเปื้อนของ <i>L. innocua</i> LI 1.1 จากพื้นผิวสิ่งแวดล้อมสู่ผลิตภัณฑ์.....	38

1. คำนำ

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

ปัจจุบันความปลอดภัยของอาหารกลายเป็นกระแสที่ทั่วโลกให้ความสำคัญมาก และกลายเป็นมาตรการทางการค้าที่ประเทศผู้นำเข้านำมาใช้ยกอ้างเพื่อเป็นข้อจำกัดทางการค้ามากขึ้น ผลิตภัณฑ์อาหารที่จะส่งออกจึงต้องมีการควบคุมคุณภาพและความปลอดภัยให้เป็นไปตามข้อกำหนดของประเทศผู้นำเข้านั้นๆ นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ที่จะส่งออกนั้นจะต้องเป็นไปตามมาตรฐานสินค้าปศุสัตว์เพื่อการส่งออกของกรมปศุสัตว์ด้วย โดยกรมปศุสัตว์กำหนดให้โรงงานอุตสาหกรรมที่จะส่งออกต้องมีการจัดทำหลักเกณฑ์วิธีการผลิตที่ดีในการผลิต (Good Manufacturing Practices: GMP) และระบบการวิเคราะห์อันตรายและจุดวิกฤติที่ต้องควบคุม (Hazard Analysis and Critical Control Point: HACCP) ซึ่งเป็นระบบประกันคุณภาพของอาหาร เพื่อลดความเสี่ยงการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (Food borne disease bacteria) อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ผู้ผลิตจะดำเนินการตามหลักเกณฑ์วิธีการผลิตที่ดีในการผลิต และระบบการวิเคราะห์อันตรายและจุดวิกฤติที่ต้องควบคุมแล้วก็ตาม แต่ก็พบว่ายังคงมีปัญหาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคอยู่เรื่อยๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Listeria monocytogenes* ซึ่งมักปนเปื้อนภายหลังจากการปรุงสุก *L. monocytogenes* นี้เป็นจุลินทรีย์ก่อโรคที่ทั่วโลกให้ความสำคัญเป็นอย่างมากในปัจจุบัน และส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมอาหารพร้อมบริโภคทั้งประเภทแช่เย็นและแช่แข็ง เนื่องจากจุลินทรีย์นี้สามารถมีชีวิตอยู่รอดและเพิ่มจำนวนได้ที่อุณหภูมิต่ำ และ *L. monocytogenes* นี้ทำให้เกิดโรค Listeriosis ซึ่งมีอัตราการทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตสูงถึงประมาณร้อยละ 30 (Yucel et al., 2004) ในปี 2552 (ตั้งแต่เดือนมค.ถึงธค.) โรงงานผลิตไก่ปรุงสุกพร้อมบริโภคแช่เยือกแข็งเพื่อการส่งออกแห่งหนึ่งต้องสูญเสียรายได้จากสินค้าที่ปนเปื้อน *Listeria* spp. ถึง 12,158,000 บาท ซึ่งถึงแม้ว่ากฎหมายกำหนดให้ในผลิตภัณฑ์ต้องไม่พบ *L. monocytogenes* เท่านั้น ไม่ได้ครอบคลุมถึง *Listeria* species อื่นๆ แต่ในระดับลูกค้า

ด้วยกันเองในระดับสากล การพบเพียง *Listeria* spp. นั้นก็ไม่ได้รับการยอมรับ (ข้อมูลจากการสัมภาษณ์ผู้ผลิตรายหนึ่ง) ดังนั้นผู้ผลิตในอุตสาหกรรมอาหาร และนักวิจัยทั่วโลกจึงให้ความสำคัญกับปัญหานี้มากขึ้น และได้มีการศึกษาถึงแนวทางที่จะควบคุม *L. monocytogenes* อย่างกว้างขวาง แต่การปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* นี้มีแหล่งที่มาหลากหลาย ทำให้การควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อผู้ผลิตภัณฑ์ทำได้ยาก ปัจจุบันการวิเคราะห์ในโรงงานอุตสาหกรรมและหน่วยงานของรัฐจะเป็นการวิเคราะห์ในระดับชนิด (species) ของ *Listeria* เท่านั้น ไม่สามารถจำแนกในระดับสายพันธุ์ เมื่อพบการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์และการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมของกระบวนการผลิตก็ไม่สามารถหาความสัมพันธ์ของการปนเปื้อนได้ ทำให้ไม่สามารถควบคุมแหล่งที่มาของการปนเปื้อนในโรงงานอุตสาหกรรมได้ นอกจากนี้ผลงานวิจัยที่ผ่านมาถึงแม้ว่าจะมีการศึกษาการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. โดยใช้หลักการทางสถิติซึ่งพบว่าการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมส่งผลต่อการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ (Lekroengsin, Keeratipibul & Trakoonlerswilai, 2007) อย่างไรก็ตามก็ยังมีข้อจำกัดว่าเชื้อที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาจไม่ใช่เชื้อเดียวกันกับที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม การแก้ปัญหาจึงอาจจะไม่ตรงประเด็นกับปัญหาการปนเปื้อนที่แท้จริง

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

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

ขอบเขตของการวิจัย

การระบุแหล่งที่มาของการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. ในสิ่งแวดล้อมของกระบวนการผลิตของโรงงานไก่ปรุงสุกพร้อมบริโภคแช่แข็งที่มีความสัมพันธ์กับการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์สุดท้าย โดยดูความสัมพันธ์ในระดับสายพันธุ์ (strain) โดยใช้เทคนิคอนุชีววิทยา และแผนการสุ่มตัวอย่างแบบเข้มข้น (intensive)

ผลประโยชน์ที่จะได้รับ

- ทราบถึงแหล่งต้นตอที่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนของ *Listeria* ในผลิตภัณฑ์
- สามารถติดตามการแพร่กระจายของ *Listeria* ภายในบริเวณการผลิตได้ และควบคุมการปนเปื้อนของ *Listeria* และภายในบริเวณการผลิตและการปนเปื้อนข้ามสู่ผลิตภัณฑ์อย่างมีประสิทธิภาพ
- ใช้เป็นแนวทางการติดตามการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคอื่นๆ ในโรงงานผลิตอาหารประเภทอื่นได้
- บทความวิจัยได้รับการตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 ศึกษากระบวนการผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็ง

กระบวนการผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็งนี้ประกอบด้วยกระบวนการปรุงสุกเนื้อไก่โดยการนึ่งด้วยไอน้ำร้อน 100°C จนอุณหภูมิใจกลางของชิ้นเนื้อไก่อยู่ที่ 80°C เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นจึงทำเนื้อไก่ให้เย็นลง โดยขั้นตอนการทำให้เย็นลงขั้นแรกจะใช้ liquid nitrogen โดยเนื้อไก่บนสายพานจะผ่านเครื่อง liquid N₂ chiller ซึ่งทำให้เนื้อไก่มีอุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 60°C แล้วจึงทำให้เย็นลงอีกครั้งด้วยลมเย็น จนเนื้อไก่จะมีอุณหภูมิประมาณ 10°C จากนั้นจึงหั่นเนื้อไก่ด้วยพนักงานหรือใช้เครื่องหั่น แช่เยือกแข็งชิ้นเนื้อไก่แบบ individual quick freezing (IQF) บรรจุเนื้อไก่แช่เยือกแข็งใส่ถุงพลาสติก ปิดฉนวนปากถุง โดยเครื่องปิดฉนวนผ่านการตรวจจับโลหะด้วยเครื่องตรวจจับโลหะ

2.2 หาความชุกของการปนเปื้อน *Listeria* spp. ในผลิตภัณฑ์สุดท้าย และผลิตภัณฑ์ระหว่างขั้นตอนการผลิต

เก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์สุดท้าย โดยเก็บผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ถูกบรรจุอยู่ในถุงพลาสติกแล้ว และเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ระหว่างการผลิตในแต่ละขั้นตอน ได้แก่ (1) หลังผ่านกระบวนการให้ความร้อน ณ จุดที่ออกจากเครื่องปรุงสุก (2) จุดที่ออกจากเครื่อง liquid N₂ chiller (3) จุดที่ออกจากเครื่อง chiller ด้วยลมเย็น (4) จุดที่ออกจากเครื่องหั่น หรือเนื้อไก่ที่หั่นเสร็จแล้วด้วยมือ (5) จุดที่ออกจากเครื่อง IQF

วิเคราะห์หาการมีอยู่ของ *Listeria* spp. ด้วยวิธี VIDAS[®] *Listeria* (LIS) (ภาคผนวก 1) และสำหรับตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่พบ *Listeria* spp. จะนำไปวิเคราะห์ต่อเพื่อหาชนิดของ *Listeria* spp. ตามวิธีมาตรฐานสากล ISO 11290-1:1996 (ภาคผนวก 2) นำข้อมูลการพบมาหาความชุกของ *Listeria* spp. ในผลิตภัณฑ์โดยเทียบกับอัตราส่วนระหว่างจำนวนตัวอย่างที่พบ *Listeria* spp. และจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่วิเคราะห์ในผลิตภัณฑ์นั้นๆ ดังสมการต่อไปนี้

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

การเก็บตัวอย่างจะเก็บทุกครั้งที่มีการผลิตโดยสุ่มตัวอย่างภายในช่วงเวลาการผลิต ซึ่งมีระยะเวลาการผลิต 20 ชั่วโมงต่อวัน แบ่งเป็นการผลิตช่วงกลางวันและช่วงกลางคืน โดยเก็บตัวอย่างทั้ง 2 ช่วงเวลา ในช่วงกลางวันเก็บตัวอย่างเมื่อเวลา 7.00 น. 10.00 น. และ 16.00 น. ในช่วงกลางคืนเก็บตัวอย่างเมื่อเวลา 19.00 น. 22.00 น. และ 04.00 น. เก็บตัวอย่างครั้งละประมาณ 100 ถึง 300 กรัม (ขึ้นกับขนาดของ

ผลิตภัณฑ์) เป็นระยะเวลา 3 วันใน 1 สัปดาห์ ได้แก่ วันอังคาร วันพฤหัสบดี และวันศุกร์ ทำทั้งสิ้น 10 สัปดาห์

2.3 หากความชุกของการปนเปื้อน *Listeria* spp. บริเวณพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิต แบ่งพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมบริเวณการผลิตหลังกระบวนการให้ความร้อน ตามระดับความเสี่ยงของการปนเปื้อนสู่ผลิตภัณฑ์ เป็น 3 โซน (zone) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 จุดเก็บตัวอย่างสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิต แบ่งตามระดับความเสี่ยงของการปนเปื้อนสู่ผลิตภัณฑ์

โซน	จุด swab
1 (พื้นผิวที่สัมผัสผลิตภัณฑ์)	สายพานออกจากเครื่องปรุงสุก สายพานขาเข้าและขาออกที่จุดต่างๆ สายพานเครื่องหัน ถาด/มีด/เขียง ถุงมือพนักงานที่จุดต่างๆ
2 (พื้นผิวที่ไม่สัมผัสผลิตภัณฑ์ แต่อยู่ใกล้ผลิตภัณฑ์ และพื้นผิวที่ทำความสะอาดได้ยาก)	ผู้ควบคุมเครื่องจักรต่างๆ สายพานลำเลียงระหว่างจุด มอเตอร์/ปลั๊กไฟสายพาน ท่อระบายก๊าซของเครื่อง liquid N ₂ chiller โต๊ะบรรจุผลิตภัณฑ์ โครง+ลูกกลิ้งสายพาน หน้าจอควบคุมเครื่องหัน สายพานเครื่องตรวจจับโลหะและเครื่องปิดผนึก เครื่องชั่ง
3 (พื้นผิวที่ไม่สัมผัสผลิตภัณฑ์ และอยู่ไกลจากผลิตภัณฑ์)	พื้นบริเวณต่างๆ ผนังด้านนอกของเครื่องแช่เยือกแข็ง ท่อระบายน้ำทิ้งของเครื่องแช่เยือกแข็ง

เก็บตัวอย่างพื้นผิวของ โซนที่บริเวณต่างๆ ที่คาดว่าจะพบ *Listeria* รวม 44 จุด เก็บตัวอย่าง 6 เวลา ต่อวัน ในช่วงกลางวันเก็บตัวอย่างเมื่อเวลา 7.00 น. 10.00 น. และ 16.00 น. ในช่วงกลางคืนเก็บตัวอย่างเมื่อ

เวลา 19.00 น. 22.00 น. และ 04.00 น. เป็นระยะเวลา 3 วัน ใน 1 สัปดาห์ ได้แก่ วันอังคาร วันพฤหัสบดี และ วันศุกร์ ทำทั้งสิ้น 10 สัปดาห์ โดย swab พื้นผิวด้วยก้าน swab ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วที่ชุ่มด้วยสารละลาย Dey/Engley (D/E) Neutralizing Broth เข้มข้น 3.9% แล้วจึงเก็บรักษาก้าน swab ใน D/E Neutralizing Broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร พื้นที่ swab ขึ้นอยู่กับพื้นผิวสิ่งแวดล้อมที่ swab โดย swab พื้นที่ 100 ตารางเซนติเมตรสำหรับพื้นผิวสิ่งแวดล้อมที่มีพื้นที่ผิวทั้งหมดมากกว่า 100 ตารางเซนติเมตร เช่น พื้นผิวสายพาน พื้นผนัง เป็นต้น และ swab พื้นที่ผิวทั้งหมดสำหรับพื้นผิวสิ่งแวดล้อมที่มีพื้นที่ผิวทั้งหมดน้อยกว่า 100 ตารางเซนติเมตร เช่น ถังมือพนักงาน ไบมัด ลูกกลิ้งสายพาน เป็นต้น จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาความชุกของ *Listeria* spp. โดยวิธี VIDAS® *Listeria* (LIS) และสำหรับตัวอย่างที่พบ *Listeria* spp. จะนำไปวิเคราะห์หาชนิดของ *Listeria* spp. ตามวิธีมาตรฐานสากล ISO 11290-1:1996 นำข้อมูลการพบมาหาความชุกของ *Listeria* spp. ของพื้นผิวสิ่งแวดล้อมโดยเท่ากับอัตราส่วนระหว่างจำนวนตัวอย่างที่พบ *Listeria* spp. ที่พื้นผิวสิ่งแวดล้อมนั้นๆ ใน 10 สัปดาห์และจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่วิเคราะห์ของพื้นผิวสิ่งแวดล้อมนั้นๆ ใน 10 สัปดาห์ ดังสมการต่อไปนี้

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

2.4 หาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบสุ่มในการจำแนก *Listeria* spp.

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

การเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ

เตรียมดีเอ็นเอต้นแบบจากตัวอย่างที่วิเคราะห์ชนิดของ *Listeria* spp. แล้ว โดยถ่าย colony เดียวของ *Listeria* spp. จากจานเพาะเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) ที่มีส่วนผสมของ 0.6% Yeast extract แล้วบ่มที่ 37°C นาน 14-16 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์จำนวน 3 ml แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงดูดสารละลายส่วนใสออก ล้างตะกอนเซลล์ด้วย Double distilled water ที่ผ่านการฆ่าเชื้อจำนวน 150 µl แล้วจึงปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นย่อยสารละลายเซลล์ด้วยเอนไซม์ lysozyme

เข้มข้น 5 mg/ml จำนวน 200 μ l บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 40 นาที แล้วต้มสารละลาย เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้สารละลายเย็นลงอย่างรวดเร็ว แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ (RBC) ทำการสกัดดีเอ็นเอและทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ แล้ววัดความเข้มข้นของสารละลายโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm จากนั้นจึงเก็บรักษาสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20°C

การตรวจวิเคราะห์ผลผลิตลูกโซ่โพลีเมอร์

นำผลผลิตลูกโซ่โพลีเมอร์จำนวน 1 μ l (จาก 1 ไพร์เมอร์) มาวิเคราะห์หาขนาดของผลผลิตลูกโซ่โพลีเมอร์ด้วยเครื่อง Agilent 2100 Bioanalyzer โดยใช้ชิป (chip) รุ่น Agilent DNA 7500

การหาภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์แบบสุ่มในงานวิจัยนี้ ประกอบด้วย

2.4.1 คัดเลือกไพร์เมอร์ (Primer) ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการแบบสุ่ม

งานวิจัยนี้แบ่งขั้นตอนการคัดเลือกไพร์เมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการแบบสุ่มออกเป็น 2 ขั้นตอน โดยขั้นตอนที่ 1 เป็นการคัดเลือกตัวอย่าง *Listeria* เพื่อใช้ทดสอบไพร์เมอร์ และขั้นตอนที่ 2 เป็นการคัดเลือกไพร์เมอร์ โดยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์แบบสุ่มของไพร์เมอร์กับตัวอย่าง *Listeria* ที่คัดเลือก ดังมีรายละเอียดต่อไปนี้

ตอนที่ 1 คัดเลือกตัวอย่างเพื่อใช้ทดสอบไพร์เมอร์

จำแนกตัวอย่าง *L. innocua* 15 ตัวอย่าง *L. welshimeri* 7 ตัวอย่าง และ *L. seeligeri* 10 ตัวอย่างที่แยกได้จากตัวอย่างที่พบ *Listeria* spp. ในบริเวณการผลิตของโรงงานผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ โดยใช้ไพร์เมอร์ Universal Forward Sequencing (UFS; 5' TTATGTAAAACGACGGCCAGT 3') ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์ แล้วจึงคัดเลือกตัวอย่าง 10 ตัวอย่างเพื่อใช้ในการทดสอบไพร์เมอร์ โดยคัดเลือก *L. innocua* 5 ตัวอย่าง *L. welshimeri* 3 ตัวอย่าง และ *L. seeligeri* 2 ตัวอย่าง โดยในแต่ละชนิดของตัวอย่าง *Listeria* ที่คัดเลือกมีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ซึ่งแสดงถึงสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน

ตอนที่ 2 คัดเลือกไพร์เมอร์

ใช้ไพร์เมอร์แต่ละตัวทั้ง 14 ตัวในตารางที่ 2 ทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์กับตัวอย่าง *Listeria* 10 ตัวอย่างที่คัดเลือกจากตอนที่ 1 แล้วคัดเลือกไพร์เมอร์ 4 ไพร์เมอร์ที่มีความสามารถจำแนกตัวอย่าง *Listeria* ทั้ง 10 ตัวอย่างได้ดีที่สุด โดยพิจารณาจากความหลากหลายของรูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากผลผลิตลูกโซ่โพลีเมอร์ของไพร์เมอร์แต่ละตัว

ตารางที่ 2 ไพรมเมอร์ที่ใช้ทดสอบ

ไพรมเมอร์ / ลำดับเบส	สารละลายของ ปฏิกิริยา PCR	สภาวะของ ปฏิกิริยา PCR	อ้างอิงจาก
<u>Universal forward sequencing primer</u> / 5' TTATGTAACGA CGGCCAGT 3'	1X PCR Buffer 1.5 mM MgCl ₂ 200 μM dNTP	94°C 3 min 94°C 45 sec 26°C 2 min	Macgowan et al. (1993)
<u>Sequencing primer for Tn21</u> / 5'G GGCGTTGTCGGTGTCATG 3'	0.5 μM DNA Primer 0.1 U <i>Taq</i> DNA	72°C 2 min 94°C 45 sec	
<u>Sequencing primer for the ampC gene</u> / 5' ACAGGTCCAACAAAA GCTGG 3'	Polymerase 5-10 μl of Genomic DNA	36°C 1 min 72°C 2 min 72°C 5 min	30 รอบ
<u>UBC155</u> / 5' CTGGCGGCTG 3'	1X PCR Buffer	94°C 2 min	
<u>UBC156</u> / 5' GCCTGGTTGC 3'	3 mM MgCl ₂	94°C 1 min	Farber & Addison (1994)
<u>UBC127</u> / 5' ATCTGGCAGC 3'	200 μM dNTP 1 μM DNA Primer	35°C 1 min 72°C 2 min 30 sec	
	0.5 U <i>Taq</i> DNA Polymerase	72°C 5 min	
	2 ng of Genomic DNA		
<u>CsM13</u> / 5' GAGGGTGGCGG TTCT 3'	1X PCR Buffer 3 mM MgCl ₂	94°C 1 min 94°C 30 sec	Chambel et al. (2007)
<u>inIAF</u> / 5' CAGGCAGCTACAAT TACACA 3'	0.2 mM dNTP 1 mM DNA Primer	35°C 1 min 72°C 1 min	
<u>PH</u> / 5' AAGGAGGTGATCCA GCCGCA 3'	1 U <i>Taq</i> DNA Polymerase 0.5 μl of Genomic DNA	72°C 4 min	

ตารางที่ 2 (ต่อ) ไพรมเมอร์ที่ใช้ทดสอบ

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

2.4.2 ศึกษาความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมกับไพรมเมอร์ที่เลือก

แปรความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบเป็น 8 ระดับ ได้แก่ 3, 5, 10, 20, 40, 80, 100 และ 300 ng/μl แล้วจึงทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสกับไพรมเมอร์ที่คัดเลือกจากข้อ 2.4.1 ตอนที่ 2 โดยระดับความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมจะทำให้เกิดผลผลิตลูกโซ่โพลีเมอเรสที่มีจำนวนแถบดีเอ็นเอครบทุกชั้น และมองเห็นได้ชัดเจน

2.4.3 เปรียบเทียบวิธี RAPD กับวิธีที่ใช้ในทางการค้า

คัดเลือกตัวอย่าง *Listeria* 12 ตัวอย่าง ได้แก่ *L. innocua* 6 ตัวอย่าง *L. welshimeri* 4 ตัวอย่าง และ *L. seeligeri* 2 ตัวอย่างที่แยกได้จากตัวอย่างที่พบ *Listeria* spp. ในบริเวณการผลิตของโรงงานผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ แล้วจึงส่งจำแนกสายพันธุ์กับบริษัท DuPont™ จำกัด ซึ่งจำแนกโดยใช้วิธี restriction fragment length polymorphism of ribosomal DNA หรือ ribotyping จากนั้นตัวอย่าง *Listeria* 12 ตัวอย่างนี้ก็จะนำมาทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสกับไพรเมอร์ที่คัดเลือกจากข้อ 2.4.1 ตอนที่ 2 แล้วจึงเปรียบเทียบผลการจำแนก โดยพิจารณาจากความหลากหลายของสายพันธุ์ของ *Listeria* ที่วิธีที่ใช้ในทางการค้าและวิธี RAPD

2.4.4 ทดสอบความสามารถในการทำซ้ำ (Reproducibility)

ใช้ตัวอย่าง *Listeria* 12 ตัวอย่างชุดเดียวกันกับข้อ 2.4.3 ทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสด้วยไพรเมอร์ทั้ง 4 ไพรเมอร์ที่คัดเลือกไว้อีกครั้ง แล้วเปรียบเทียบผลระหว่างการทำปฏิกิริยาครั้งที่ 1 ในข้อ 2.4.3 กับครั้งที่ 2 นี้ โดยผลการทำปฏิกิริยาทั้งสองครั้งจะต้องไม่มีความแตกต่างกันจึงจะถือว่าวิธี RAPD ด้วย 4 ไพรเมอร์ที่คัดเลือกในงานวิจัยนี้มีความสามารถในการทำซ้ำได้

2.5 ประเมินความสอดคล้องของการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. ในผลิตภัณฑ์และในสิ่งแวดล้อม

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

2.6 เสนอวิธีการสำหรับจัดการความเสี่ยง

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

3. ผลการดำเนินงานวิจัย

3.1 การปนเปื้อนของ *Listeria* ระดับชนิด (species) ในผลิตภัณฑ์และสิ่งแวดล้อม

ในการเก็บตัวอย่างตามแผนการสุ่มเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ในระดับสายพันธุ์นั้น ตลอดระยะเวลาการสุ่มเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์ระหว่างขั้นตอนการผลิตทั้งหมด 5 ขั้นตอน ได้แก่ หลังการปรุงสุก หลังการทำให้เป็นด้วยเครื่อง liquid N₂ chiller หลังการทำให้เป็นด้วยลมเย็น โดยเครื่อง chiller หลังการหั่นทั้งการหั่นด้วยมือและเครื่องหั่น หลังการแช่เยือกแข็ง รวมตัวอย่างผลิตภัณฑ์ระหว่างขั้นตอนๆละ 865 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 5 ขั้นตอนได้ 4,325 ตัวอย่าง ปรากฏว่าไม่พบตัวอย่างผลิตภัณฑ์ระหว่างขั้นตอนการผลิตที่ปนเปื้อน *Listeria* spp. อยู่เลย แต่พบการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. อยู่ในผลิตภัณฑ์สุดท้าย และเมื่อนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ปนเปื้อน *Listeria* spp. ไปวิเคราะห์ชนิดของ *Listeria* พบว่าเป็น *L. innocua* 12 ตัวอย่าง *L. welshimeri* 1 ตัวอย่างและ *L. seeligeri* 1 ตัวอย่าง ซึ่งคิดความชุกของ *Listeria* spp. ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายได้ 1.6 % โดยการพบ *Listeria* spp. ในผลิตภัณฑ์สุดท้าย แต่กลับไม่พบในผลิตภัณฑ์ระหว่างขั้นตอนการผลิตนั้น ไม่ได้หมายความว่าไม่มีการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. อยู่ในผลิตภัณฑ์ระหว่างขั้นตอนการผลิต แต่เป็นผลเนื่องมาจากการสุ่มเก็บตัวอย่างที่ไม่พบตัวอย่างที่ปนเปื้อนเท่านั้น

ในการหาแหล่งของการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. ในสิ่งแวดล้อมของกระบวนการผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็ง ได้แบ่งพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมตามระดับความเสี่ยงในการปนเปื้อนสู่ผลิตภัณฑ์ออกเป็น 3 โซน จากผลการ swab ในพื้นผิวทั้ง 3 โซน พบว่ามีการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. ในโซน 1, 2 และ 3 คิดเป็นความชุกได้ 1.1, 5.8 และ 13.4 % ตามลำดับ โดยเมื่อนำไปวิเคราะห์ชนิดพบว่าเป็น *L. innocua* มากที่สุด คิดเป็น 82.3 % ของตัวอย่างพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมทั้งหมดที่ปนเปื้อน *Listeria* spp. รองลงมาเป็น *L. welshimeri* 11.2 %, *L. seeligeri* 5.5 % และ *L. monocytogenes* 1.0 % ดังผลแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ความชุกและชนิดของ *Listeria* ในสิ่งแวดล้อมของกระบวนการผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็ง

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

^a สัดส่วนจำนวนตัวอย่างของ *Listeria* ชนิดนั้นต่อจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่พบ *Listeria*

สำหรับการปนเปื้อนของ *L. innocua* ซึ่งมีความชุกสูงที่สุดในบรรดา *Listeria* ชนิดอื่นๆ จากตารางที่ 4 พบว่ามีความชุกมากอยู่ในพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในโซน 3, 2 และ 1 ตามลำดับ โดยพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในโซน 3 ซึ่งเป็นพื้นผิวที่ไม่ได้สัมผัสกับผลิตภัณฑ์และยังอยู่ห่างไกลจากผลิตภัณฑ์ เช่น พื้นท่อระบายน้ำ พบความชุกของเชื้อมากและมีชนิดของ *Listeria* ที่ปนเปื้อนอยู่อย่างหลากหลายมากกว่าโซนอื่น รองลงมาคือพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในโซน 2 แต่กลับพบท่อระบายก๊าซของเครื่อง liquid N₂ chiller ซึ่งเป็นพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในโซน 2 มีความชุกของ *L. innocua* อยู่มากที่สุดถึง 78.7 % ของพื้นผิวสิ่งแวดล้อมจากทุกโซน นอกจากนี้ในโซน 2 พบว่าที่สายพานของเครื่องปิดผนึกและสายพานของเครื่องตรวจจับโลหะมีความชุกของ *L. innocua* อยู่ถึง 13.2 % ซึ่งทั้งสองจุดนี้ยังพบ *L. welshimeri* ร่วมอยู่ด้วย สำหรับความชุกของ *L. innocua* ที่พื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในโซน 1 พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้ออยู่ที่พื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในโซน 1 ในทุกขั้นตอนของกระบวนการผลิต ซึ่งถึงแม้ว่าจะมีความชุกของเชื้ออยู่น้อย แต่ก็มีความเสี่ยงมากที่จะก่อให้เกิดการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ เนื่องจากพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในโซน 1 เป็นพื้นผิวที่มีการสัมผัสกับผลิตภัณฑ์โดยตรง

ตารางที่ 4 ความชุกของ *Listeria* ชนิดต่างๆ บนพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิต แบ่งตามโซนการเก็บตัวอย่าง

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

ตารางที่ 4 (ต่อ) ความชุกของ *Listeria* ชนิดต่างๆ บนพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิต แบ่งตามโซนการเก็บตัวอย่าง

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

จากตารางที่ 4 ยังพบการปนเปื้อนของ *L. welshimeri* มากที่พื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในโซน 3, 2 และ 1 ตามลำดับ โดยพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในโซน 3 ที่พบความชุกของ *L. welshimeri* อยู่มากที่สุดได้แก่ ท่อระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็ง ผนังของเครื่องแช่เยือกแข็ง พื้นห้องบรรจุ และพื้นบริเวณเครื่องปรุงรส ตามลำดับ พื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในโซน 2 ที่พบ *L. welshimeri* ได้แก่ สายพานเครื่องปิดผนึกและเครื่องตรวจจับโลหะ หน้าจอควบคุมของเครื่องหัน โครงเครื่องหัน และท่อระบายก๊าซของเครื่อง liquid N₂ chiller ตามลำดับ และการปนเปื้อนของ *L. welshimeri* ในโซน 1 พบที่ถุงมือของพนักงานควบคุมคุณภาพที่สายพานขาออกของเครื่องแช่เยือกแข็ง และถุงมือของพนักงานบรรจุ

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

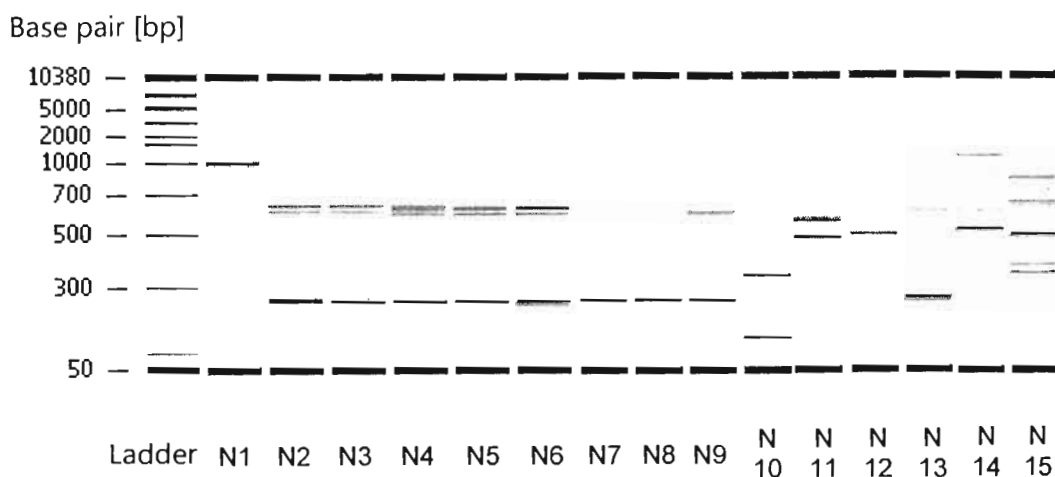
ในกรณีการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* ที่พบในสิ่งแวดล้อมของกระบวนการผลิตนี้ ตลอดระยะเวลาของแผนการสุ่มเก็บตัวอย่างพบการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* อยู่ 4 ตัวอย่าง คิดความชุกที่พื้นผิวของสิ่งแวดล้อมได้เท่ากับ 0.05 % โดยเป็นการปนเปื้อนของตัวอย่างสิ่งแวดล้อมในโซน 1 คือ

ตะแกรงต่อจากสายพานขาออกของเครื่องแช่เยือกแข็ง ตัวอย่างสิ่งแวดล้อมใน โซน 2 คือถุงมือของพนักงานควบคุมคุณภาพหลังการบรรจุ และตัวอย่างสิ่งแวดล้อมใน โซน 3 คือพื้นห้องบรรจุ

3.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบสุ่ม

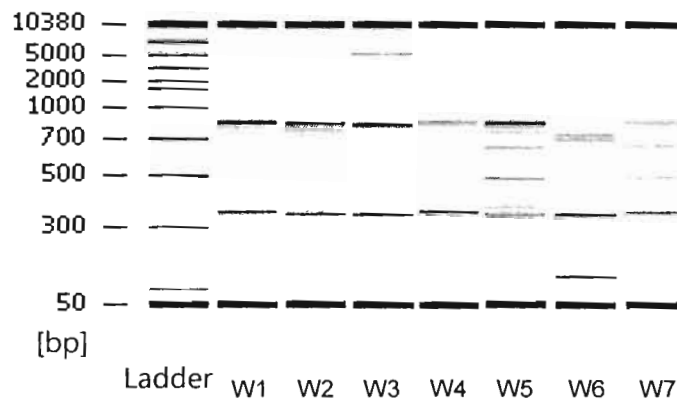
3.2.1 การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการแบบสุ่ม

ในงานวิจัยนี้แบ่งการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมออกเป็น 2 ขั้นตอน คือการคัดเลือกตัวอย่าง *Listeria* เพื่อใช้ในการทดสอบไพรเมอร์ และการคัดเลือกไพรเมอร์ โดยคัดเลือกไพรเมอร์ที่สร้างรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่าง ซึ่งรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันสามารถแปลความหมายได้สองลักษณะ คือตัวอย่าง *Listeria* spp. เหล่านั้นมีสายพันธุ์เดียวกัน หรือไพรเมอร์ Universal Forward Sequencing (UFS) ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบสุ่มกับตัวอย่าง *Listeria* ที่ใช้ในการคัดเลือกตัวอย่างไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของตัวอย่าง *Listeria* เหล่านั้นได้ ดังนั้นในการเลือกตัวอย่างเชื้อที่จะนำมาใช้ในการคัดเลือกไพรเมอร์จึงต้องเลือกตัวอย่างเชื้อที่มีความแตกต่างกันอย่างแน่นอนจากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบสุ่มด้วยไพรเมอร์ UFS กับตัวอย่างดีเอ็นเอจาก *L. innocua* จำนวน 15 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างดีเอ็นเอจาก *L. innocua* ที่มีรูปแบบของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันสามารถแบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่ม ดังแสดงในภาพที่ 1 จึงทำการเลือกตัวอย่างดีเอ็นเอจาก *L. innocua* จำนวน 5 ตัวอย่างจากแต่ละกลุ่ม ได้แก่ ตัวอย่าง N3, N10, N12, N14 และ N15 มาใช้ในการคัดเลือกไพรเมอร์ต่อไป



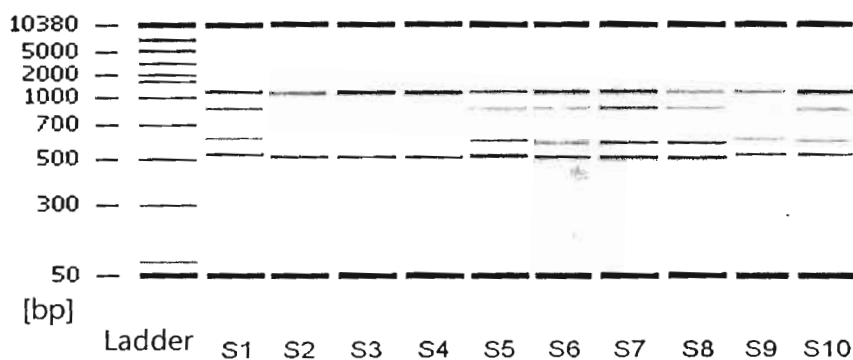
ภาพที่ 1 ภาพ Gel electrophoresis ของตัวอย่าง *L. innocua* 15 ตัวอย่าง
 สำหรับใช้ในการคัดเลือกตัวอย่างเพื่อใช้ทดสอบไพรเมอร์

ในกรณีของ *L. welshimeri* จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบสุ่มของตัวอย่างดีเอ็นเอต้นแบบของ *L. welshimeri* 7 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างดีเอ็นเอจาก *L. welshimeri* ที่มีรูปแบบของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม ดังผลแสดงในภาพที่ 2 จึงทำการเลือกตัวอย่างดีเอ็นเอจาก *L. welshimeri* จำนวน 3 ตัวอย่างจากแต่ละกลุ่ม ได้แก่ ตัวอย่าง W3, W5 และ W6 มาใช้ในการคัดเลือกไพรเมอร์ต่อไป



ภาพที่ 2 ภาพ Gel electrophoresis ของตัวอย่าง *L. welshimeri* 7 ตัวอย่าง
สำหรับการคัดเลือกตัวอย่างเพื่อใช้ทดสอบไพรเมอร์

สำหรับ *L. seeligeri* จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบสุ่มของตัวอย่างดีเอ็นเอต้นแบบของ *L. seeligeri* 10 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างดีเอ็นเอจาก *L. seeligeri* ที่มีรูปแบบของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ดังผลแสดงในภาพที่ 3 จึงทำการเลือกตัวอย่างดีเอ็นเอจาก *L. welshimeri* จำนวน 2 ตัวอย่างจากแต่ละกลุ่ม ได้แก่ ตัวอย่าง S1 และ S2 มาใช้ในการคัดเลือกไพรเมอร์ต่อไป



ภาพที่ 3 ภาพ Gel electrophoresis ของตัวอย่าง *L. seeligeri* 10 ตัวอย่าง
สำหรับการคัดเลือกตัวอย่างเพื่อใช้ทดสอบไพรเมอร์

ในการหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบสุ่มจำเป็นจะต้องมีการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการจำแนก *L. innocua*, *L. welshimeri* และ *L. seeligeri* ด้วย ในงานวิจัยส่วนใหญ่จะให้ความสำคัญกับ *L. monocytogenes* เป็นหลัก เนื่องจาก *L. monocytogenes* สามารถก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ได้ ดังนั้นงานวิจัยส่วนใหญ่จึงรายงานเฉพาะไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการจำแนก *L. monocytogenes* แต่อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้ศึกษาการปนเปื้อนของ *Listeria* ชนิดอื่นๆนอกเหนือจาก *L. monocytogenes* ด้วย จึงจำเป็นต้องคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการจำแนก *L. innocua*, *L. welshimeri* และ *L. seeligeri* ซึ่งเป็น *Listeria* นอกจากชนิด *monocytogenes* ที่พบในกระบวนการผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็งที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ โดยหลังจากการทำปฏิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบสุ่มของตัวอย่างดีเอ็นเอต้นแบบของ *Listeria* ที่คัดเลือกกับไพรเมอร์ 14 ไพรเมอร์ที่มีรายงานว่าสามารถจำแนก *L. monocytogenes* ได้ดี คณะผู้วิจัยได้คัดเลือกไพรเมอร์ 4 ไพรเมอร์ที่มีความสามารถดีที่สุดในการจำแนก *Listeria* ชนิดต่างๆ เพื่อให้สามารถจำแนกความแตกต่างของ *Listeria* ที่พบในตำแหน่งต่างๆของบริเวณการผลิตได้มากที่สุด

สำหรับการคัดเลือกไพรเมอร์ ในงานวิจัยนี้ได้คัดเลือก 4 ไพรเมอร์ที่มีความสามารถในการจำแนก *L. innocua*, *L. welshimeri* และ *L. seeligeri* ได้ดีที่สุด ได้แก่ ไพรเมอร์ OMP-01, HLWL 74, HLWL 85 และ UFS ผลการทำปฏิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบสุ่มจากทั้ง 14 ไพรเมอร์แสดงดังในตารางที่ 5 โดยไพรเมอร์ที่สามารถจำแนก *L. innocua* ได้ดีที่สุดคือ ไพรเมอร์ OMP-01 โดยจำแนกความแตกต่างของ *L. innocua* ที่ใช้ทดสอบได้ทั้ง 5 ตัวอย่าง พิจารณาจากการได้รูปแบบของผลผลิตลูกโซ่โพลีเมอเรสที่แตกต่างกัน 5 รูปแบบ สำหรับไพรเมอร์ที่สามารถจำแนก *L. welshimeri* ได้ดีที่สุดคือ ไพรเมอร์ HLWL 74 และ HLWL 85 โดยจำแนกความแตกต่างของ *L. welshimeri* ที่ใช้ทดสอบได้ทั้ง 3 ตัวอย่าง พิจารณาจากการได้รูปแบบของผลผลิตลูกโซ่โพลีเมอเรสที่แตกต่างกัน 3 รูปแบบ ส่วนไพรเมอร์ที่สามารถจำแนก *L. seeligeri* ได้ดีคือ ไพรเมอร์ OMP-01, HLWL 74, HLWL 85 และ UFS โดยจำแนกความแตกต่างของ *L. seeligeri* ที่ใช้ทดสอบได้ทั้ง 2 ตัวอย่าง พิจารณาจากการได้รูปแบบของผลผลิตลูกโซ่โพลีเมอเรสที่แตกต่างกัน 2 รูปแบบ

ตารางที่ 5 จำนวนรูปแบบของผลผลิตลูกโซ่โพลีเมอเรสของตัวอย่าง *Listeria* ที่ใช้ทดสอบไพรเมอร์ต่างๆ

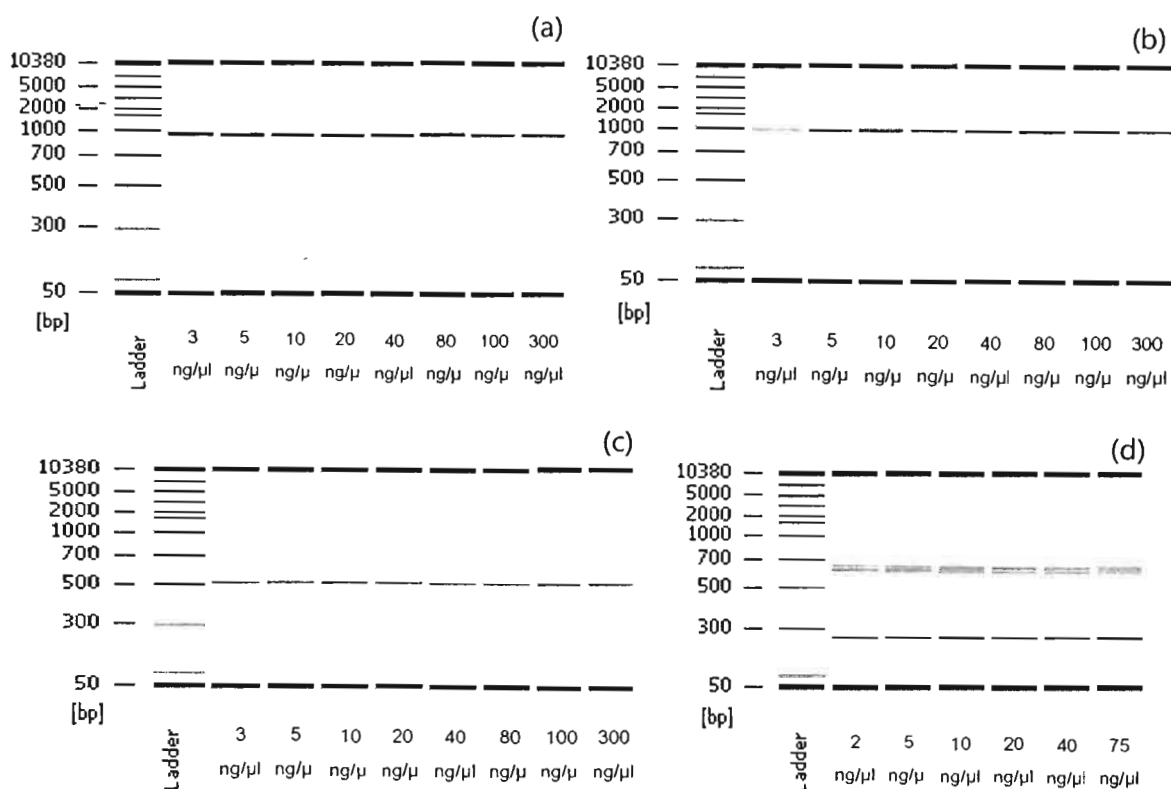
ไพรเมอร์	จำนวนรูปแบบของผลผลิตลูกโซ่โพลีเมอเรส		
	จาก <i>L. innocua</i> 5 ตัวอย่าง	จาก <i>L. welshimeri</i> 3 ตัวอย่าง	จาก <i>L. seeligeri</i> 2 ตัวอย่าง
OMP-01	5	2	2
HLWL 74	4	3	2
HLWL 85	4	3	2
UFS	4	2	2
Amp C	3	2	1
UBC 127	3	2	1
UBC 155	3	2	1
UBC 156	3	2	1
Tn 21	x ^a	x	x
PB 1	x	x	x
PB 4	x	x	x
CsM 13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

^a ไม่มีผลผลิตลูกโซ่โพลีเมอเรสเกิดขึ้น พิจารณาจากการไม่มีแถบดีเอ็นเอแสดงให้เห็น

3.2.2 การศึกษาความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมกับไพรเมอร์ที่เลือก

ในการศึกษาหาความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมกับไพรเมอร์แต่ละตัวที่คัดเลือกไว้ โดยการแปรความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบของตัวอย่าง *L. innocua* N14 เป็น 8 ระดับ ได้แก่ 3, 5, 10, 20, 40, 80, 100 และ 300 ng/μl แล้วทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบสุ่มกับไพรเมอร์ที่คัดเลือกไว้ ซึ่งได้แก่ ไพรเมอร์ OMP-01, HLWL 74, HLWL 85 และ UFS พบว่าความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบมีอิทธิพลต่อรูปแบบของแถบดีเอ็นเอของผลผลิตลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบในช่วงความเข้มข้น 3 ถึง 80 ng/μl ยังไม่มีผลทำให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของผลผลิตลูกโซ่โพลีเมอเรสจากทั้ง 4 ไพรเมอร์เปลี่ยนไป แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบถึง 100 และ 300 ng/μl พบว่ารูปแบบของแถบดีเอ็นเอของผลผลิตลูกโซ่โพลีเมอเรสเปลี่ยนไป โดยมีแถบดีเอ็นเอหายไปหนึ่งแถบ ดังผลแสดงในภาพที่ 4 ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงใช้ความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่ 5

ng/μl ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสของทั้ง 4 ไพรเมอร์ เนื่องจากให้แถบดีเอ็นเอที่เห็นได้ชัดเจน และสะดวกในการใช้งาน



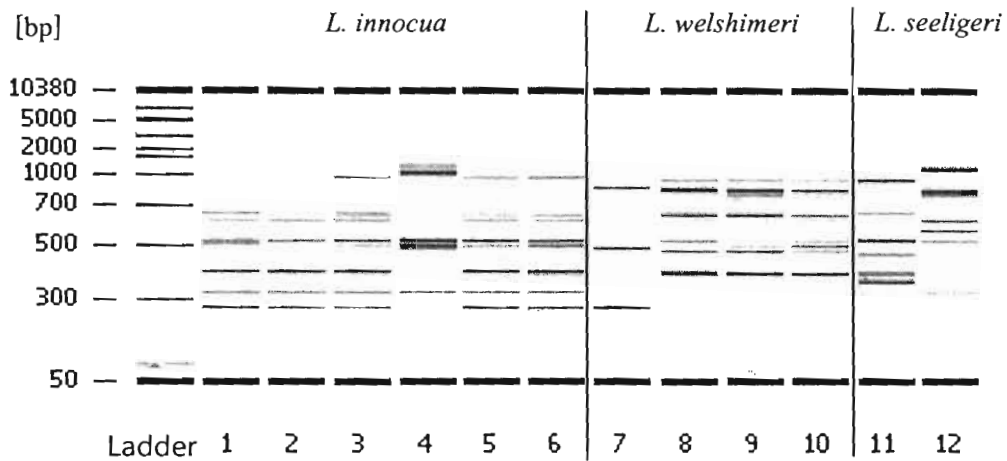
ภาพที่ 4 ภาพ Gel electrophoresis ที่แต่ละความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบของ *L. innocua* จากไพรเมอร์ (a) OMP-01, (b) HLWL74, (c) HLWL85 และ (d) UFS

3.2.3 การเปรียบเทียบวิธี RAPD กับวิธีที่ใช้ในการค้า (วิธี ribotyping)

ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธี RAPD กับวิธี ribotyping (จากบริษัท DuPont™ จำกัด) พบว่าวิธี RAPD มีความสามารถเหนือกว่าวิธี ribotyping ในการจำแนก *L. welshimeri* เนื่องจากวิธี ribotyping ไม่สามารถแยกความแตกต่างของตัวอย่าง *L. welshimeri* 4 ตัวอย่างได้ (ตัวอย่างที่ 7 ถึง 10) โดยให้รหัสเป็น *L. welshimeri* 1079 ดังแสดงในตารางที่ 6 แต่วิธี RAPD โดยใช้ 4 ไพรเมอร์ที่คัดเลือกไว้สามารถแยกความแตกต่างของ *L. welshimeri* ตัวอย่างที่ 7 ได้ ดังแสดงในภาพที่ 5 และทั้งสองวิธีมีความสามารถเท่าเทียมกันในการจำแนก *L. innocua* (ตัวอย่างที่ 1 ถึง 6) และ *L. seeligeri* (ตัวอย่างที่ 11 ถึง 12) โดยวิธี ribotyping และวิธี RAPD สามารถจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ของ *L. innocua* ตัวอย่างที่ 4 (รหัส DuPont™ - *L. innocua* 1006) และ *L. seeligeri* ตัวอย่างที่ 12 (รหัส DuPont™ - *L. seeligeri* 1063) ได้เหมือนกัน

ตารางที่ 6 ผลการจำแนกสายพันธุ์ *Listeria* ด้วยวิธีที่ใช้ในทางการค้า (วิธี ribotyping)

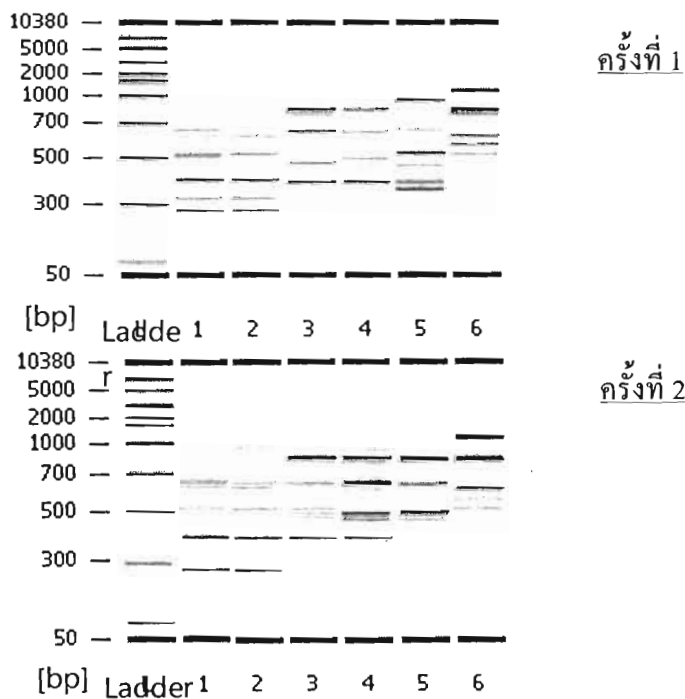
ตัวอย่างที่	รหัสจาก DuPont™
1	<i>L. innocua</i> 1010
2	<i>L. innocua</i> 1010
3	<i>L. innocua</i> 1010
4	<i>L. innocua</i> 1006
5	<i>L. innocua</i> 1010
6	<i>L. innocua</i> 1010
7	<i>L. welshimeri</i> 1079
8	<i>L. welshimeri</i> 1079
9	<i>L. welshimeri</i> 1079
10	<i>L. welshimeri</i> 1079
11	<i>L. seeligeri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



ภาพที่ 5 ผลการจำแนกสายพันธุ์ *Listeria* ด้วยวิธี RAPD (4 ไพรมเมอร์)
เพื่อใช้เปรียบเทียบกับวิธีที่ใช้ในทางการค้า (วิธี ribotyping)

3.2.4 การทดสอบความสามารถในการทำซ้ำ (Reproducibility)

ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบสุ่มของตัวอย่าง *Listeria* ชุดเดียวกัน 2 ครั้ง พบว่าผลผลิตลูกโซ่โพลีเมอเรสจากการทำปฏิกิริยาในครั้งที่ 1 และ 2 ให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน ดังแสดงในภาพที่ 6 ดังนั้นวิธี RAPD ที่ใช้ในงานวิจัยนี้จึงมีความสามารถในการทำซ้ำได้ แต่อย่างไรก็ตามเริ่มแรกในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบสุ่มของวิธี RAPD พบปัญหาว่าไม่สามารถในการทำซ้ำรูปแบบของแถบดีเอ็นเอของผลผลิต PCR ได้ ซึ่งผู้วิจัยก็พบว่าวิธีการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบของตัวอย่าง *Listeria* มีผลต่อความสามารถในการทำซ้ำของวิธี RAPD เนื่องจากเริ่มแรกผู้วิจัยใช้เพียงวิธีการต้มสารละลายเซลล์ในน้ำเดือด นาน 10 นาที พบว่าไม่สามารถทำซ้ำรูปแบบของแถบดีเอ็นเอได้ เป็นผลเนื่องจากการใช้ดีเอ็นเอที่ได้จากการต้มสารละลายเซลล์ ทำให้ไม่สามารถควบคุมปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาแต่ละครั้ง รวมทั้งสิ่งเจือปน (impurities) ที่อาจอยู่ในสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการต้มสารละลายเซลล์ ทำให้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแต่ละครั้งถึงแม้จะใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอต้นแบบของ *Listeria* ชุดเดียวกัน แต่ก็ไม่สามารถทำซ้ำรูปแบบของแถบดีเอ็นเอได้ ดังนั้นต่อมาจึงเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบโดยการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดอุปกรณ์ (DNA extraction kit) รวมทั้งเพิ่มขึ้นขั้นตอนการย่อยเซลล์ด้วยเอนไซม์ lysozyme และการต้มในน้ำเดือด เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอ รวมทั้งควบคุมความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอ จึงพบว่าสามารถทำซ้ำรูปแบบของแถบดีเอ็นเอได้



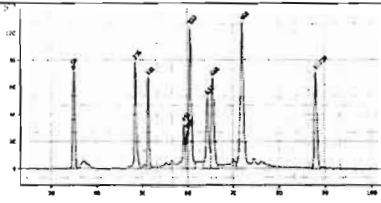

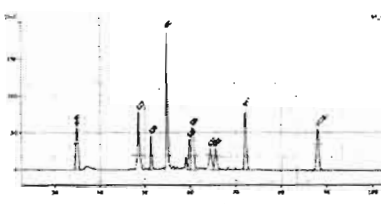

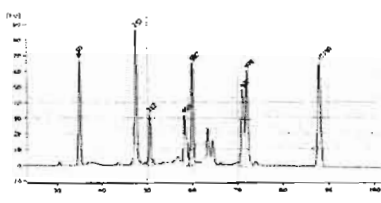

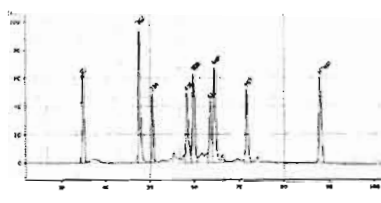

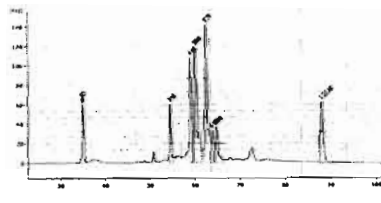

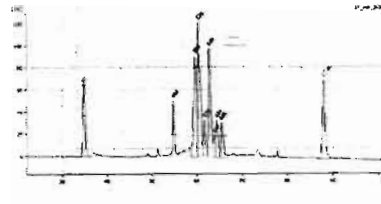

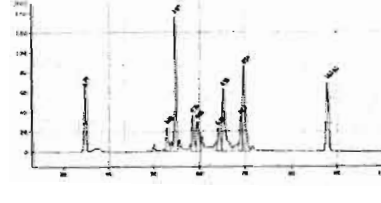

ภาพที่ 6 ภาพ Gel electrophoresis ของ *Listeria* spp. จาก 4 ไพรเมอร์เปรียบเทียบกันสองครั้ง (ตัวอย่างหมายเลข 1, 2 เป็น *L. innocua*; 3, 4 เป็น *L. welshimeri*; 5, 6 เป็น *L. seeligeri*)

3.3 ความชุกของ *Listeria* ชนิดต่างๆ ในระดับสายพันธุ์

ในการจำแนกสายพันธุ์ของ *Listeria* ที่ปนเปื้อนอยู่ในผลิตภัณฑ์และสิ่งแวดล้อมของกระบวนการผลิตด้วยวิธี RAPD พบว่าจากตัวอย่าง *L. innocua* 342 ตัวอย่าง ซึ่งพบในผลิตภัณฑ์สุดท้าย 12 ตัวอย่าง และพบในตัวอย่างสิ่งแวดล้อม 330 ตัวอย่าง จำแนกได้ 3 สายพันธุ์หลัก กำหนดเป็นสายพันธุ์ LI 1, 2 และ 3 โดยพิจารณาจากขนาด (หน่วย base pair; bp) ของชิ้นดีเอ็นเอแต่ละชิ้นที่เป็นผลผลิตของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบสุ่ม ซึ่งเมื่อพิจารณาจากภาพ gel electrophoresis เพียงอย่างเดียวจะไม่สามารถแยกความแตกต่างภายในสายพันธุ์หลักได้ แต่การพิจารณาเส้นกราฟจากกราฟ electropherogram จะทำให้ทราบถึงจำนวนและขนาดของชิ้นดีเอ็นเอของผลผลิตลูกโซ่โพลีเมอเรสได้อย่างถูกต้องและครบถ้วน ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากกราฟ electropherogram ทำให้สายพันธุ์ LI 1 แบ่งเป็นสายพันธุ์ย่อยได้อีก 4 สายพันธุ์ย่อย ได้แก่ LI 1.1, LI 1.2, LI 1.5 และ LI 1.6 และสายพันธุ์ LI 2 แบ่งเป็นสายพันธุ์ย่อยได้อีก 2 สายพันธุ์ย่อย ได้แก่ LI 2.1 และ LI 2.2 ส่วนสายพันธุ์ LI 3 ไม่พบสายพันธุ์ย่อย ซึ่งแต่ละตัวอย่างในสายพันธุ์ย่อยเดียวกันมีผลผลิตลูกโซ่โพลีเมอเรสที่มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอคลาดเคลื่อนกันไม่เกิน 5% ของขนาดชิ้นดีเอ็นเอนั้น ดังแสดงผลในตารางที่ 7 โดยเส้นกราฟที่มีขนาด 50 และ 10,380 bp เป็น lower และ upper marker ตามลำดับ และไม่พิจารณาเส้นกราฟของชิ้นดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นน้อยกว่า 20 นาโนกรัมต่อ ไมโครลิตร การเกิดขึ้นของสายพันธุ์ย่อยในงานวิจัยนี้เป็นไปเพราะความแตกต่างของตัวเชื้อ ไม่ใช่เป็นเพราะปัจจัยแวดล้อมในการวิเคราะห์ เช่น วิธีการวิเคราะห์ อุปกรณ์เครื่องมือ หรือผู้วิเคราะห์ เนื่องจากในแต่ละสายพันธุ์ย่อยมีจำนวน *Listeria* หลายตัวอย่างที่วิเคราะห์ในวันและเวลาที่ต่างกัน แต่ยังได้ผลการจำแนกที่เหมือนกัน รวมทั้งในงานวิจัยนี้มีตัวอย่างควบคุมทั้งแบบ negative และ positive ควบคุมการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบสุ่มอยู่ ดังนั้นผลการวิเคราะห์ของสายพันธุ์ย่อยของแต่ละสายพันธุ์จึงเกิดขึ้นเนื่องจากการความแตกต่างของตัวเชื้อเอง ซึ่ง Fomesbech Vogel และคณะ (2001) รายงานว่าความเครียดจากสิ่งแวดล้อม เช่น ปัจจัยจากกระบวนการผลิต การสลับใช้สารฆ่าเชื้อที่มีฤทธิ์เป็นกรดและด่าง หรือการเปลี่ยนชนิดสารทำความสะอาดและสารฆ่าเชื้อบ่อยๆ เป็นสาเหตุให้เชื้อมีการปรับตัวและเกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับดีเอ็นเอให้ทนต่อสภาวะแวดล้อมเพื่อความอยู่รอด

เมื่อพิจารณาความชุกของ *L. innocua* ทั้ง 3 สายพันธุ์หลักแสดงดังในตารางที่ 7 พบสายพันธุ์ LI 1.1 ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายและดำรงอยู่มากที่สุดในสิ่งแวดล้อมตลอดระยะเวลาการเก็บตัวอย่าง โดยมีร้อยละความชุก 77.1 ของตัวอย่างทั้งหมดที่ปนเปื้อน *L. innocua* รองลงมาคือสายพันธุ์ LI 2.2 (ร้อยละ 11.5), LI 1.2 (ร้อยละ 4.1), LI 1.6 (ร้อยละ 3.5), LI 2.1 (ร้อยละ 1.8), LI 3 (1.8) และ LI 1.5 (ร้อยละ 0.3) ตามลำดับ

ตารางที่ 7 ความชุกและสายพันธุ์ของ *L. innocua* ที่พบในกระบวนการผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็ง (จำนวนตัวอย่างที่พบในผลิตภัณฑ์สุดท้าย)

กราฟ Electropherogram	ภาพ Gel electrophoresis	สายพันธุ์	จำนวนตัวอย่าง	ร้อยละความชุก
		LI 1.1	262 (12 ^a)	77.1
		LI 1.2	14	4.1
		LI 1.5	1	0.3
		LI 1.6	12	3.5
		LI 2.1	6	1.8
		LI 2.2	39	11.5
		LI 3	6	1.8

L. innocua LI 1.1 ปนเปื้อนอยู่บนพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในทุกโซน และพบบนวัสดุพื้นผิวที่หลากหลาย ได้แก่ สเตนเลส พลาสติก และยาง ดังแสดงในตารางที่ 8 ซึ่งแหล่งการปนเปื้อนที่สำคัญคือ ท่อระบายก๊าซของเครื่อง liquid N₂ chiller (ร้อยละ 58.6) ที่อาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนข้ามมาที่สายพานเข้าเครื่อง liquid N₂ chiller (ร้อยละ 2.3) ซึ่งพื้นผิวในโซน 1 โดยที่ท่อระบายก๊าซนี้ยังพบ *L. innocua* หลากหลายสายพันธุ์มากกว่าพื้นผิวอื่นๆที่พบ *L. innocua* เช่นกัน โดยนอกจาก *L. innocua* LI 1.1 แล้วยังพบสายพันธุ์ LI 1.2, LI 1.6 LI 2.1 และ LI 2.2 นอกจากนี้แหล่งการปนเปื้อนอื่นๆ ร่องลงมา เช่น สายพานเครื่องปิดผนึกและเครื่องตรวจจับโลหะ (ร้อยละ 7.5) โต้ะบรรจุ (ร้อยละ 1.1) และมือพนักงานบรรจุ (ร้อยละ 0.6) แสดงให้เห็นว่ามีการปนเปื้อนข้ามระหว่างจุดเหล่านี้ โดยสายพานเครื่องปิดผนึกและเครื่องตรวจจับโลหะเป็นแหล่งสะสมของเชื้อ มือพนักงานบรรจุสัมผัสกับสายพานดังกล่าวหรือสัมผัสกับถุงบรรจุที่สัมผัสกับสายพานอีกที ทำให้มีโอกาสที่เชื้อปนเปื้อนข้ามจากสายพานลงไป ในผลิตภัณฑ์ได้ นอกจากนี้สายพานเครื่องหั่น (ร้อยละ 1.7) ก็เป็นอีกเส้นทางของการปนเปื้อนของเชื้อสู่ผลิตภัณฑ์ ซึ่งถึงแม้ว่ามีการใช้มาตรการในการกำจัดเชื้อไปแล้วก่อนเริ่มการเก็บตัวอย่าง แต่ก็ยังพบการปนเปื้อนของเชื้อที่ตำแหน่งนี้อาจเนื่องจากเครื่องหั่นมีซอกมุมต่างๆที่ยากต่อการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อได้อย่างทั่วถึง จึงเป็นแหล่งซุกซ่อนของเชื้อได้เป็นอย่างดี

ตารางที่ 8 ความชุกของ *L. innocua* สายพันธุ์ต่างๆ บนพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิต แบ่งตามโซนการเก็บตัวอย่าง

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

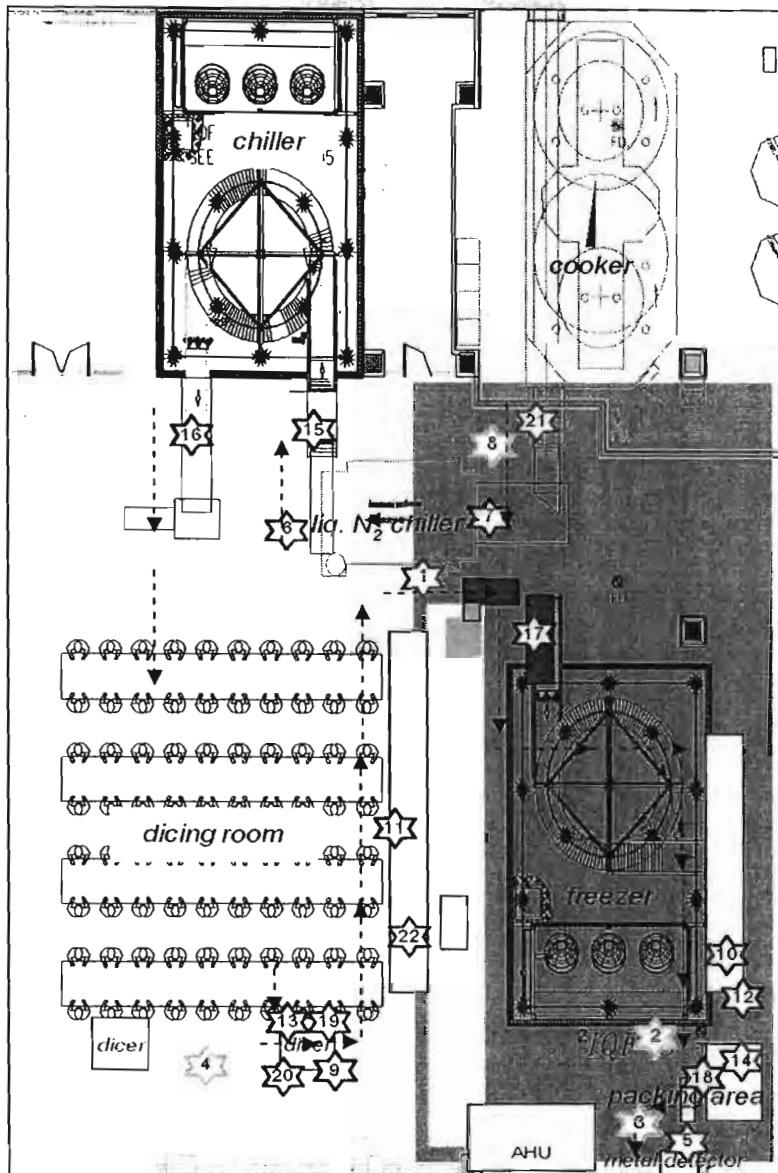
ตารางที่ 8 (ต่อ) ความชุกของ *L. innocua* สายพันธุ์ต่างๆ บนพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิต แบ่งตามโซนการเก็บตัวอย่าง

โซน	จุด swab	สายพันธุ์ของ <i>L. innocua</i>						
		LI 1.1	LI 1.2	LI 1.5	LI 1.6	LI 2.1	LI 2.2	LI 3
1	ถุงมือของพนักงาน QC หลังหัน	1.1						
	สายพานเข้าเครื่องแช่เยือกแข็ง	0.6						
	สายพานออกจากเครื่องแช่เยือกแข็ง	1.1	0.6					
	ถุงมือพนักงานเคลื่อนสินค้าที่สายพานของเครื่องแช่เยือกแข็ง	1.1						
	ถุงมือของพนักงานบรรจุ	0.6	0.6					
2	กรอบทางออกจากเครื่องปรุงรสสุก	0.6						
	ถาดรองใต้สายพานเครื่องปรุงรสสุก		0.6					
	ท่อระบายก๊าซของเครื่อง liquid N ₂ chiller	58.6	0.6		2.9	2.3	9.2	
	ถาดรองเศษใต้สายพาน liquid N ₂ chiller	4.0						
	หน้าจอควบคุมของเครื่องหัน	0.6						
	โครงเครื่องหัน	0.6						1.1
	กล่องควบคุมสายพานหลังหัน	1.1					0.6	
	โต๊ะบรรจุสินค้า	1.1						
	สายพานเครื่องปิดผนึก และเครื่องตรวจจับโลหะ	7.5			1.7			0.6
	สายพานลำเลียงถาด	0.6						

ตารางที่ 8 (ต่อ) ความชุกของ *L. innocua* สายพันธุ์ต่างๆ บนพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิต
แบ่งตามโซนการเก็บตัวอย่าง

โซน	จุด swab	สายพันธุ์ของ <i>L. innocua</i>						
		LI 1.1	LI 1.2	LI 1.5	LI 1.6	LI 2.1	LI 2.2	LI 3
	ถุงมือพนักงานล้างถังน้ำแล้ว	0.6						
	พื้นห้องหัน	9.8	1.1		1.1		2.3	0.6
3	ผนังเครื่องแช่เยือกแข็ง							0.6
	ท่อระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็ง	22.4		0.6				0.6
	พื้นห้องบรรจุ	14.4	0.6			0.6	0.6	

จากภาพที่ 7 และตารางที่ 9 แสดงให้เห็นว่า *L. innocua* LI 1.1 ที่พบในบริเวณการผลิตเนื้อไก่ปรุงรส
สุกแช่เยือกแข็งนี้ อยู่อย่างกระจัดกระจายทั่วบริเวณการผลิตและพบอยู่ในทุกขั้นตอนของกระบวนการผลิต



ภาพที่ 7 แผนผังแสดงการพบ *L. innocua* LI 1.1 ณ จุดต่างๆ ในบริเวณการผลิต โดยเครื่องหมายสีแดงแทน
 พื้นผิวในโซน 1 เครื่องหมายสีฟ้าแทนพื้นผิวในโซน 2 สีเหลืองแทนพื้นผิวในโซน 3 และลูกศรเส้นปะ
 แสดงเส้นทางของผลิตภัณฑ์

ตารางที่ 9 หมายเลขกำกับแหล่งที่พบ *L. innocua* LI 1.1 ในแผนผังแสดงพื้นที่ของบริเวณการผลิต

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

^a เรียงลำดับตามความสูง

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

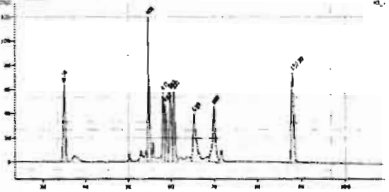

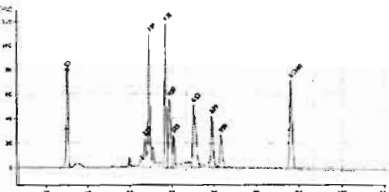

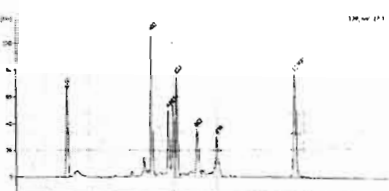





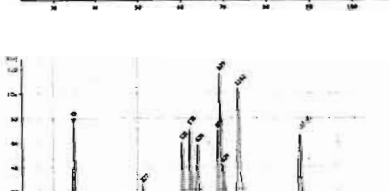

Autio และคณะ (2003) รายงานว่า *L. monocytogenes* ที่อาศัยแบบคงอยู่จะมีความแตกต่างในระดับยีนส์ (genetically distinct) จาก *L. monocytogenes* ที่พบปนเปื้อนอยู่แบบชั่วคราว (sporadic) โดย *L. monocytogenes* ที่อาศัยแบบคงอยู่จะปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมของโรงงานผลิต เพื่อให้สามารถอยู่รอดและเจริญเติบโตต่อไปได้ มีงานวิจัยหลายที่ให้เหตุผลถึงการเป็นเชื้อที่อาศัยแบบคงอยู่ (persistence) ดังนี้ : (1) เชื้อพบได้ทั่วไปมากกว่าสายพันธุ์อื่น หรืออาจเข้ามาปนเปื้อนอยู่ในโรงงานก่อน (Wulff et al., 2006); (2) เชื้อแข่งขันการเจริญเติบโต (outcomplete) ได้ดีกว่าเชื้อสายพันธุ์อื่น (Lopez et al., 2008); (3) เชื้อสร้างสภาวะเพื่อการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวน (colonize) ได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่น เช่น สามารถเกาะติดพื้นผิวได้ดีกว่า; (4) เชื้อทน (resistant) ต่อสารฆ่าเชื้อได้มากกว่า ซึ่งการทนต่อสารฆ่าเชื่อนั้นอาจเกิดจากการเกิดไบโอฟิล์ม (Heir et al., 2004; Pan, Breidt & Kathariou, 2006) ดังเช่นในผลงานวิจัยของ Lundén, Autio และ Korkeala (2002) ซึ่งศึกษาการถ่ายโอนของการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* ระหว่างโรงงานผลิตเนื่องจากเครื่องหัน โดยการจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธี Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) พบว่าสามารถจำแนก *L. monocytogenes* ที่ปนเปื้อนอยู่ในกระบวนการผลิตได้ 4 สายพันธุ์ (type) โดยมี *L. monocytogenes* PFGE type I ปนเปื้อนแบบคงอยู่มากที่สุดในบริเวณการหัน โดยเป็นการปนเปื้อนเนื่องจากการสะสมของเชื้อที่เครื่องหันมากกว่าเป็นการปนเปื้อนเข้ามากับวัตถุดิบ จากนั้นจึงได้ศึกษาการเกาะติดของเชื้อสายพันธุ์ต่างๆบนผิวแผ่นสแตนเลส พบว่า *L. monocytogenes* PFGE type I นี้มีความสามารถในการเกาะติดบนพื้นผิวสแตนเลสได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่น และมีค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ของสาร quaternary ammonium compound ซึ่งเป็นสารฆ่าเชื่อนชนิดหนึ่งสูงกว่าของสายพันธุ์อื่น จึงเป็นผลทำให้สายพันธุ์นี้เหลือรอดจากการล้างทำความสะอาดและฆ่าเชื้อหรืออาจอยู่ในชอกมูมที่ล้างทำความสะอาดได้ยาก จากนั้นจึงเจริญเติบโต และคงอยู่ต่อไป ซึ่งในงานวิจัยของ Fønnesbech Vogel และคณะ (2001) พบการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* สายพันธุ์หนึ่ง (RAPD type) ปนเปื้อนอยู่แบบคงอยู่ในโรงงานผลิตปลาแซลมอน (salmon) รวมวันแห่งหนึ่งนานถึง 8 เดือน ขณะที่ Miettinen และคณะ (1999) พบการปนเปื้อนแบบคงอยู่ของ *L. monocytogenes* (PFGE type) ในโรงงานผลิตไอศกรีมแห่งหนึ่งนานถึง 7 ปี และ Unnerstad และคณะ (1996) พบการปนเปื้อนแบบคงอยู่ของ *L. monocytogenes* (PFGE type) ในโรงงานแห่งหนึ่งนานถึง 7 ปี เช่นกัน

สำหรับการจำแนกสายพันธุ์ของ *L. welshimeri* ที่พบในตัวอย่างผลิตภัณฑ์สุดท้ายและตัวอย่างพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในกระบวนการผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็งปนเปื้อนรวม 46 ตัวอย่าง ซึ่งพบใน

ผลิตภัณฑ์สุดท้าย 1 ตัวอย่าง และพบในตัวอย่างสิ่งแวดล้อม 45 ตัวอย่าง จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบสุ่มด้วย 4 ไพรเมอร์ จำแนก *L. welshimeri* ได้ 3 สายพันธุ์หลัก กำหนดเป็นสายพันธุ์ LW 1, 2 และ 3 ซึ่งสายพันธุ์ LW 1 แบ่งออกเป็นสายพันธุ์ย่อยได้อีก 5 สายพันธุ์ย่อย ได้แก่ LW 1.1, LW 1.5, LW 1.6, LW 1.7 และ LW 1.8 ดังผลแสดงในตารางที่ 4.11 โดยสายพันธุ์ย่อยมีขนาดชิ้นดีเอ็นเอส่วนใหญ่คล้ายกันในแต่ละกลุ่มสายพันธุ์ แต่มีดีเอ็นเอบางชิ้นที่ทำให้เกิดความแตกต่างของแต่ละสายพันธุ์ย่อย ส่วนสายพันธุ์ LW 2 และ LW 3 ไม่พบสายพันธุ์ย่อย ซึ่งแต่ละตัวอย่างในสายพันธุ์เดียวกันมีผลิตภัณฑ์ RAPD ที่มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอคลาดเคลื่อนกันไม่เกิน 5% ของขนาดชิ้นดีเอ็นเอนั้น

ความชุกของ *L. welshimeri* ทั้ง 3 สายพันธุ์หลักแสดงดังในตารางที่ 10 โดยพบสายพันธุ์ LW1.7 มีความชุกมากที่สุดในสิ่งแวดล้อมของบริเวณการผลิต (ร้อยละ 37.5) รองลงมาคือ สายพันธุ์ LW 1.1 มีความชุกร้อยละ 25.0, LW 2 (ร้อยละ 10.0), LW 3 (ร้อยละ 10.0), LW 1.6 (ร้อยละ 7.5), LW 1.8 (ร้อยละ 7.5) และ LW 1.5 (ร้อยละ 5.0) ตามลำดับ ซึ่งถึงแม้ว่าพบสายพันธุ์ LW1.7 มีความชุกมากที่สุดในสิ่งแวดล้อม แต่อย่างไรก็ตามไม่พบสายพันธุ์ LW 1.7 นี้ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ โดยตลอดระยะเวลาการสุ่มเก็บตัวอย่างพบผลิตภัณฑ์สุดท้ายปนเปื้อน *L. welshimeri* เพียง 1 ตัวอย่าง โดยเป็น *L. welshimeri* สายพันธุ์ LW 1.5 ซึ่งมีความชุกในสิ่งแวดล้อมของบริเวณการผลิตร้อยละ 5.0 แสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อในระดับสายพันธุ์เป็นการวิเคราะห์ถึงแหล่งสำคัญที่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนอย่างแท้จริง เนื่องจากแยกแยะได้ว่าเชื้อที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เป็นหรือไม่ได้เป็นเชื้อเดียวกันกับที่ปนเปื้อน ณ จุดต่างๆ ในสิ่งแวดล้อม

ตารางที่ 10 ความชุกและสายพันธุ์ของ *L. welshimeri* ที่พบในกระบวนการผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็ง
(^a จำนวนตัวอย่างที่พบในผลิตภัณฑ์สุดท้าย)

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



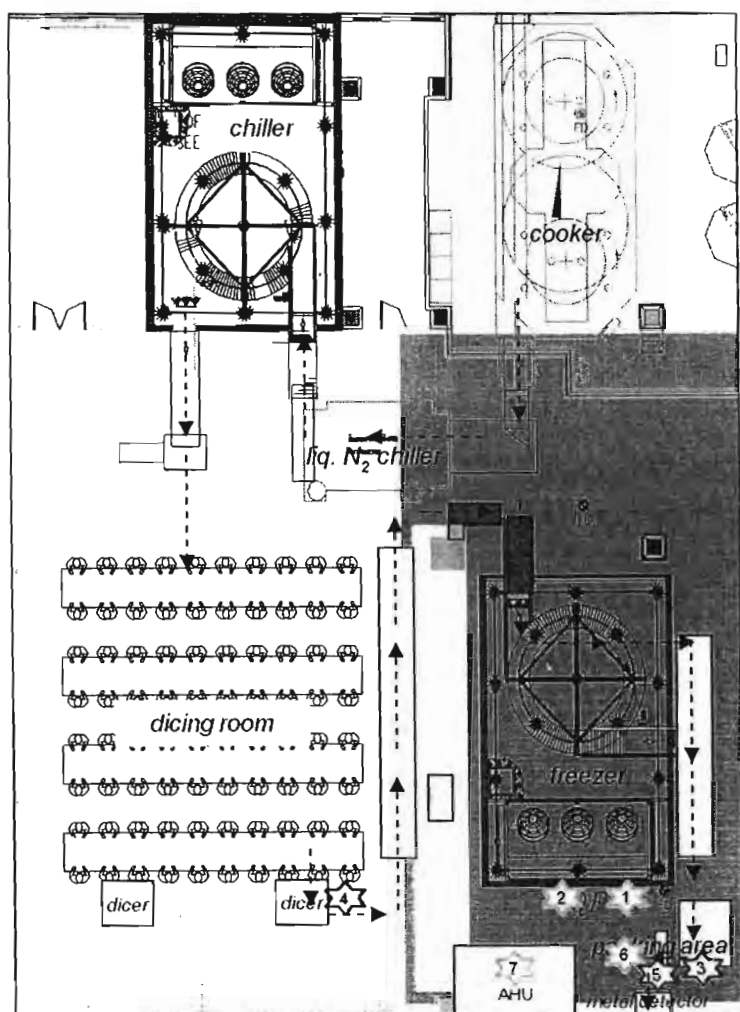
จากตารางที่ 11 พบว่า *L. welshimeri* LW 1.7 ซึ่งมีความชุกมากที่สุด ในบรรดา *L. welshimeri* สายพันธุ์อื่น พบการปนเปื้อนมากที่ผนังและท่อระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็ง โดยคิดความชุกที่ตำแหน่งเหล่านี้ได้ร้อยละ 2.9 รองลงมาพบที่ถุงมือของพนักงาน QC และพนักงานบรรจุ หน้าจอควบคุมเครื่องหั่นสายพานเครื่องปิดผนึกและเครื่องตรวจจับโลหะ และพื้นที่ห้องบรรจุ ซึ่งตำแหน่งเหล่านี้มีความชุกของ LW 1.7 อยู่ที่ร้อยละ 0.6 ส่วน *L. welshimeri* LW 1.1 ซึ่งมีความชุกมารองลงมา (ความชุกร้อยละ 25.0) จาก LW 1.7 พบปนเปื้อนมากอยู่ที่สายพานเครื่องปิดผนึกและเครื่องตรวจจับโลหะ (ร้อยละ 2.3) รองลงมาคือท่อระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็ง (ร้อยละ 1.7) และผนังเครื่องแช่เยือกแข็ง (ร้อยละ 1.1) โดยตำแหน่งพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมที่มีความหลากหลายของสายพันธุ์ของ *L. welshimeri* อยู่มากที่สุด คือผนังและท่อระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็ง

ตารางที่ 11 ความชุกของ *L. welshimeri* สายพันธุ์ต่างๆ บนพื้นผิวของสิ่งแวดล้อม ในบริเวณการผลิต แบ่งตามโซนการเก็บตัวอย่าง

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

ท่อระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็ง	1.7	0.6	2.9	0.6	0.6
พื้นห้องบรรจุ			0.6	1.1	

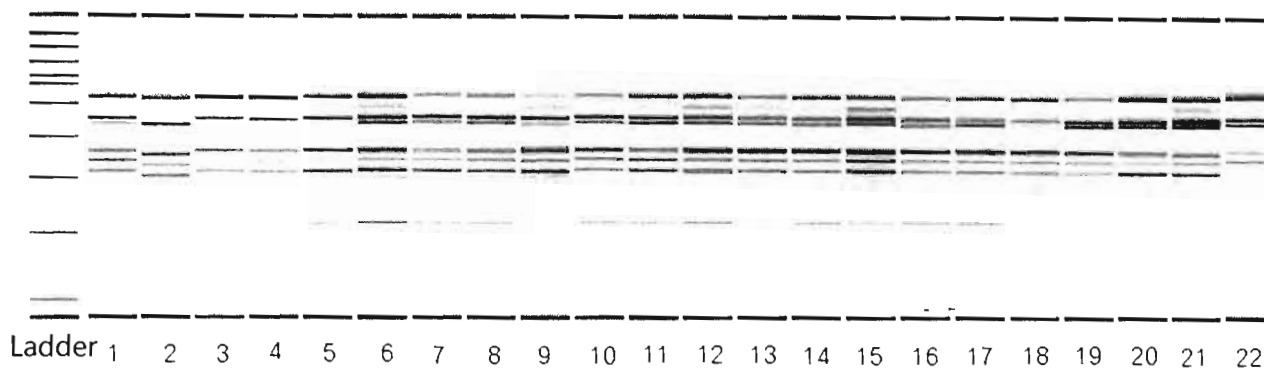
จากภาพที่ 8 แสดงให้เห็นว่าแหล่งสะสมของ LW 1.7 ในสิ่งแวดล้อมอยู่ที่บริเวณช่วงท้ายของกระบวนการผลิต ได้แก่ เครื่องแช่เยือกแข็ง และบริเวณการบรรจุ ยกเว้นที่หน้าจอกควบคุมเครื่องหัน และไม่พบการปนเปื้อนของ LW 1.7 ในบริเวณช่วงต้นของกระบวนการผลิตดังเช่นการพบ *L. innocua* ซึ่งอาจจะเนื่องจากบริเวณช่วงต้นของกระบวนการผลิตมี *L. innocua* เป็นเชื้อท้องถิ่นหลัก (dominant flora) อยู่ ทำให้เกิดภาวะแข่งขันกันในการอยู่อาศัย ซึ่งอาจเป็นภาวะที่ไม่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเชื้อ ทำให้ส่วนใหญ่ไม่พบการอยู่ร่วมกันของ *Listeria* หลายชนิด ณ จุดเดียวกัน (Gilot and Content, 2002)



หมายเลข ^a	จุด swab
1	ท่อระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็ง
2	ผนังเครื่องแช่เยือกแข็ง
3	มือพนักงาน QC หลังบรรจุ
4	หน้าจอกควบคุมเครื่องหัน
5	สายพานเครื่องปิดฝาถั่ว
6	พื้นห้องบรรจุ

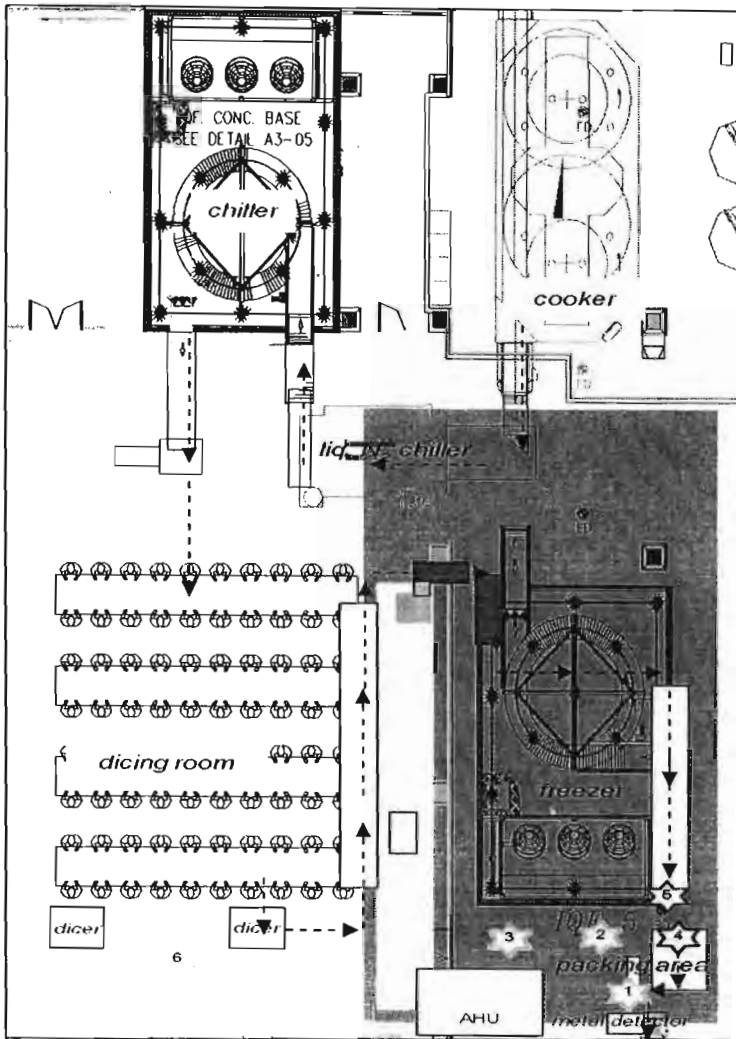
^a เรียงลำดับตามความซุก

ภาพที่ 8 แผนผังแสดงการพบ *L. welshimeri* LW 1.7 ณ จุดต่างๆ ในบริเวณการผลิต โดยเครื่องหมายสีแดง แทนพื้นผิวในโซน 1 เครื่องหมายสีฟ้าแทนพื้นผิวในโซน 2 เครื่องหมายสีเหลืองแทนพื้นผิวในโซน 3 และ ลูกศรเส้นปะแสดงเส้นทางของผลิตภัณฑ์



ภาพที่ 9 ภาพ Gel electrophoresis ของ *L. seeligeri* 22 ตัวอย่าง ที่พบปนเปื้อนที่พื้นผิวของสิ่งแวดล้อมใน
บริเวณการผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็ง

ในการจำแนก *L. seeligeri* ด้วยวิธี RAPD เพื่อวิเคราะห์การปนเปื้อนในระดับสายพันธุ์ พบว่าจำแนก *L. seeligeri* ที่พบในงานวิจัยนี้ได้เป็นสายพันธุ์เดียวกันทั้งหมด กำหนดเป็น LS 1 โดยพบในผลิตภัณฑ์สุดท้าย 1 ตัวอย่าง และพบที่พื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิต 21 ตัวอย่าง ดังผลการจำแนกแสดงในภาพที่ 4.13 โดยแถบดีเอ็นเอของ *L. seeligeri* ที่พบในผลิตภัณฑ์สุดท้ายอยู่ที่แถวหมายเลข 4 ของภาพ และถึงแม้ว่าพิจารณาจากภาพ gel electrophoresis จะเห็นความแตกต่างของความเข้มของแถบดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่าง แต่ก็ยังเป็นเพียงความแตกต่างของความเข้มข้นของซันดีเอ็นเอเท่านั้น ซึ่งเมื่อพิจารณาจากกราฟ electropherogram พบว่าแต่ละเส้นกราฟที่แสดงขนาดของซันดีเอ็นเอไม่มีความแตกต่างหรือมีความคลาดเคลื่อนกันไม่ถึง 5% ของขนาดซันดีเอ็นเอ นั้น จึงจัดว่าเป็นเชื้อในสายพันธุ์เดียวกัน โดยพบความชุกของ *L. seeligeri* LS 1 มากอยู่ที่พื้นห้องบรรจุ และเครื่องแช่เยือกแข็ง และจากภาพที่ 10 แสดงให้เห็นว่าพบการปนเปื้อนของ *L. seeligeri* LS 1 อยู่บริเวณช่วงท้ายของกระบวนการผลิตเท่านั้น ซึ่งได้แก่ ในขั้นตอนการแช่เยือกแข็งและขั้นตอนการบรรจุ (ยกเว้นตัวอย่างพื้นห้องนั้น)



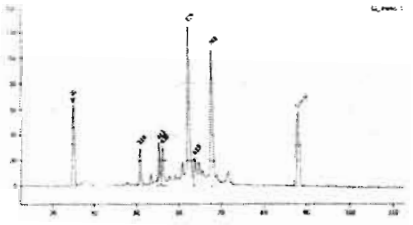

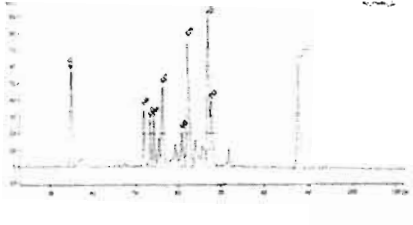

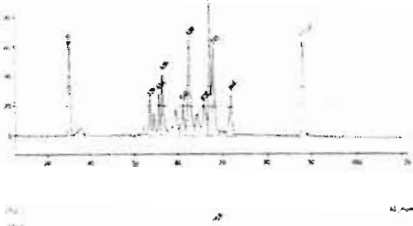

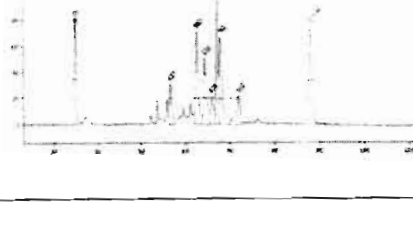

หมายเลข ^a	จุด swab
1	พื้นห้องบรรจุ
2	ท่อระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็ง
3	ผนังเครื่องแช่เยือกแข็ง
4	มือพนักงานบรรจุ
5	อาคารองศยได้สายพาน
6	พื้นห้องหั่น

^a เรียงลำดับตามความชุก

ภาพที่ 10 แผนผังแสดงการพบ *L. seeligeri* LS 1 ณ จุดต่างๆ ในบริเวณการผลิต โดยเครื่องหมายสีแดงแทนพื้นผิวในโซน 1 เครื่องหมายสีฟ้าแทนพื้นผิวในโซน 2 สีเหลืองแทนพื้นผิวในโซน 3 และลูกศรเส้นประแสดงเส้นทางของผลิตภัณฑ์

สำหรับ *L. monocytogenes* ไม่พบการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์ และพบการปนเปื้อนของเชื้อที่พื้นผิวของตัวอย่างสิ่งแวดล้อมในกระบวนการผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็งเพียง 4 ตัวอย่าง จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบสุ่มด้วย 4 ไพรมเมอร์ที่คัดเลือก จำแนกตัวอย่าง *L. monocytogenes* ที่พบได้ 1 สายพันธุ์หลัก ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 สายพันธุ์ย่อย กำหนดเป็นสายพันธุ์ LM 1.1 และ LM 1.2 ดังผลแสดงในตารางที่ 12 โดยพบ LM 1.1 ที่พื้นห้องบรรจุ (2 ตัวอย่าง) และถุงมือของพนักงานควบคุมคุณภาพหลังการบรรจุ และพบ LM 1.2 ที่ตะแกรงรับผลิตภัณฑ์ต่อจากสายพานออกจากเครื่องแช่เยือกแข็ง

ตารางที่ 12 การจำแนก *L. monocytogenes* ที่พบ 4 ตัวอย่างในระดับสายพันธุ์

กราฟ electropherogram	ภาพ gel electrophoresis	สายพันธุ์	จุด swab	วันที่เก็บ ตัวอย่าง (D/M/Y)
		LM 1.2	ตะแกรงต่อจาก สายพานออกจาก ของเครื่องแช่เยือก แข็ง	3/12/2552
		LM 1.1	พื้นห้องบรรจุ	13/1/2553
		LM 1.1	พื้นห้องบรรจุ	14/1/2553
		LM 1.1	ถุงมือพนักงาน ควบคุมคุณภาพ หลังบรรจุ	19/1/2553

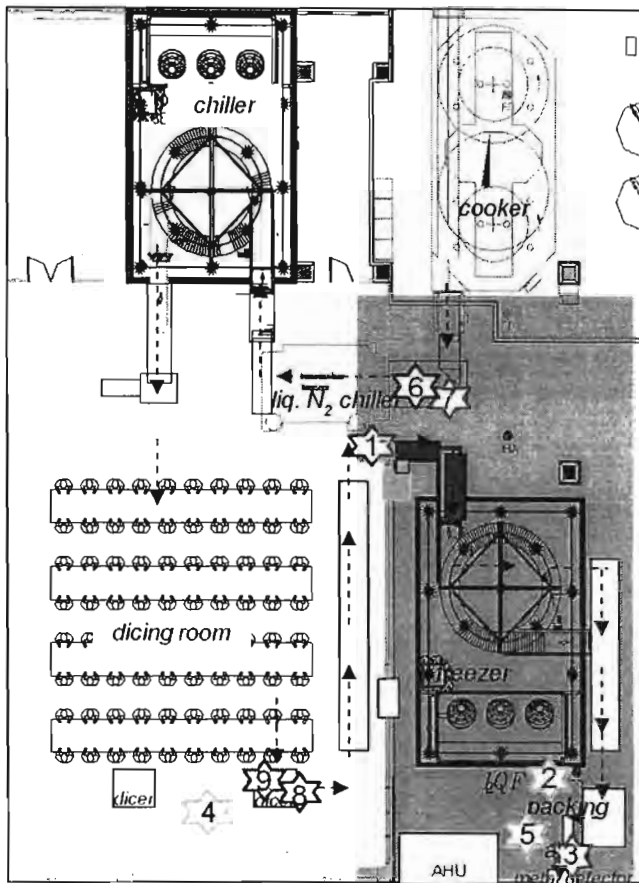
3.4 การประเมินความสอดคล้องของการปนเปื้อนของ *Listeria* ในระดับสายพันธุ์ในผลิตภัณฑ์และสิ่งแวดล้อม

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

จากตารางที่ 13 แสดงพื้นผิวสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิตที่ปนเปื้อน *L. innocua* LI 1.1 ในวันเดียวกันหรือวันที่ใกล้เคียงกับวันที่พบการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ พบว่าในวันที่พบการปนเปื้อนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์สุดท้าย มักพบการปนเปื้อนที่ท่อระบายก๊าซของเครื่อง liquid N₂ chiller ด้วยและที่ตำแหน่งนี้ยังพบจำนวนตัวอย่างที่ปนเปื้อนมากกว่าตัวอย่างจากพื้นผิวสิ่งแวดล้อมอื่น ถึงแม้ว่าท่อระบายก๊าซของเครื่อง liquid N₂ chiller จัดเป็นพื้นผิวสิ่งแวดล้อมในโซน 2 ซึ่งไม่ได้สัมผัสกับผลิตภัณฑ์ แต่ก็ยังเป็นผิวที่อยู่ใกล้กับผลิตภัณฑ์ สามารถก่อให้เกิดการปนเปื้อนข้ามสู่ผลิตภัณฑ์ได้ง่ายและมักเป็นพื้นที่ที่ถูกละเลยในการทำ ความสะอาดและฆ่าเชื้อเนื่องจากเป็นพื้นที่ที่ไม่ได้สัมผัสกับผลิตภัณฑ์โดยตรง พื้นผิวสิ่งแวดล้อมในโซน 1 ส่วนใหญ่จะได้รับความเอาใจใส่ในการทำ ความสะอาดและฆ่าเชื้อจึงมักไม่ใช่แหล่งสะสมของเชื้อที่อาศัยแบบคงอยู่ การพบเชื้อที่พื้นผิวสิ่งแวดล้อมในโซน 1 จะแสดงให้เห็นถึงแหล่งการปนเปื้อนแบบถ่ายโอน (transfer) และเส้นทางการปนเปื้อนของเชื้อสู่ผลิตภัณฑ์ที่พื้นผิวนั้นสัมผัส ดังเช่นการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์ในวันที่ 13/01/53 การปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์อาจเกิดขึ้นเนื่องจากการปนเปื้อนข้ามของเชื้อจากท่อระบายก๊าซของเครื่อง liquid N₂ chiller โดยหยดน้ำควบแน่นที่หยดออกมาจากท่อระบายก๊าซอาจพาเชื้อปนเปื้อนลงบนสายพานของเครื่อง liquid N₂ chiller แล้วจึงปนเปื้อนสู่ผลิตภัณฑ์ หรือการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์ในวันนั้นอาจเกิดจากการสัมผัสโดยตรงกับเชื้อที่พบที่พื้นผิวสายพานของเครื่องนั้น ดังเช่นภาพแหล่งการปนเปื้อนแสดงในภาพที่ 11 แต่เนื่องจากท่อระบายก๊าซของเครื่อง liquid N₂ chiller พบความชุกของเชื้อมากกว่า จึงมีความเป็นไปได้ที่ตำแหน่งนี้จะเป็แหล่งสะสมของ *L. innocua* LI 1.1 และก่อให้เกิดการปนเปื้อนข้ามของเชื้อสู่ผลิตภัณฑ์ ซึ่งนอกจากท่อระบายก๊าซของเครื่อง liquid N₂ chiller สายพานของเครื่อง liquid N₂ chiller และสายพานของเครื่องนั้นแล้ว ในวันที่ใกล้เคียงหรือวันเดียวกันกับที่พบการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ยังพบการปนเปื้อนของ *L. innocua* LI 1.1 ที่สายพานเครื่องปิดผนึก สายพานเครื่องตรวจจับโลหะ หน้าจอควบคุมเครื่องนั้น ถาดรองเศษได้สายพานเครื่อง liquid N₂ chiller พื้นห้องหันท่อระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็ง พื้นห้องบรรจุ และถุงมือพนักงานล้างถังภาชนะใช้แล้ว

ตารางที่ 13 การพบ *L. innocua* LI 1.1 ที่พื้นผิวของสิ่งแวดล้อมต่างๆ ในวันที่ผลิตผลิตภัณฑ์ที่พบการปนเปื้อนหรือวันที่เกิดขึ้น

		วัน/เดือน/ปี ที่ผลิตผลิตภัณฑ์ที่พบการปนเปื้อน (จำนวนตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่พบข้อ)						
		15/11/52	20/11/52	21/11/52	14/12/52	04/01/53	13/01/53	16/01/53
แหล่งที่พบการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม	ห้องระบายก๊าซของเครื่อง liquid N ₂ chiller (1)	ห้องระบายก๊าซของเครื่อง liquid N ₂ chiller (4)	ห้องระบายก๊าซของเครื่อง liquid N ₂ chiller (1)	ห้องระบายก๊าซของเครื่อง liquid N ₂ chiller (1)	ห้องระบายก๊าซของเครื่อง liquid N ₂ chiller (6)	ห้องระบายก๊าซของเครื่อง liquid N ₂ chiller (5)	ห้องระบายก๊าซของเครื่อง liquid N ₂ chiller (4)	ห้องระบายก๊าซของเครื่อง liquid N ₂ chiller (4)
	(จำนวนตัวอย่าง)	พื้นที่ห้องหัน (1)	พื้นที่ห้องหัน (2)	พื้นที่ห้องหัน (1)	ฝาปิด (1)	สายพานเครื่องตรวจจับโลหะ (1)	สายพานเครื่องตรวจจับโลหะ (1)	เครื่องแช่เยือกแข็ง (4)
					สายพานเครื่องตรวจจับโลหะ (1)	สายพานเครื่องตรวจจับโลหะ (1)	สายพานเครื่องตรวจจับโลหะ (1)	สายพานเครื่องตรวจจับโลหะ (1)
					พื้นที่ห้องบรรจุ (1)	พื้นที่ห้องบรรจุ (1)	พื้นที่ห้องหัน (1)	พื้นที่ห้องบรรจุ (1)
					ถุงมือพนักงานทำความสะอาด (1)	ถุงมือพนักงานทำความสะอาด (1)	พื้นห้องบรรจุ (1)	พื้นห้องบรรจุ (1)
					ถาดใช้แล้ว (1)	ถาดใช้แล้ว (1)	ถาดรองเศษได้สายพานเครื่อง liquid N ₂ chiller (1)	ถาดรองเศษได้สายพานเครื่อง liquid N ₂ chiller (1)



หมายเลข ^a	จุด swab
1	ท่อระบายก๊าซของ liquid N ₂ chiller
2	ท่อระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็ง
3	สายพานเครื่องตรวจจับ โลหะ
4	พื้นห้องหั่น
5	พื้นห้องบรรจุ
6	สายพานเข้าเครื่อง liquid N ₂ chiller
7	ถาดรองเศษได้สายพานออกจาก liquid N ₂ chiller
8	สายพานเครื่องหั่น
9	หน้าจอกควบคุมเครื่องหั่น

^a เรียงลำดับตามรูป

ภาพที่ 11 แผนผังแสดงแหล่งการปนเปื้อนของ *L. innocua* LI 1.1 จากพื้นผิวสิ่งแวดล้อมผู้ผลิตภัณฑ์ โดย เครื่องหมายสีแดงแทนพื้นผิวใน โซน 1 เครื่องหมายสีฟ้าแทนพื้นผิวใน โซน 2 เครื่องหมายสีเหลืองแทนพื้นผิว ใน โซน 3 และลูกศรเส้นประแสดงเส้นทางของผลิตภัณฑ์

ตารางที่ 14 การพบ *L. innocua* ที่ท่อระบายก๊าซฝั่งผลิตภัณฑ์เข้าและออกของเครื่อง liquid N₂ chiller

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

N - ไม่พบเชื้อ

ท่อระบายก๊าซของเครื่อง liquid N₂ chiller ที่พบว่าเป็นแหล่งการปนเปื้อนของ *L. innocua* LI 1.1 นั้น เป็นท่อระบายก๊าซฝั่งผลิตภัณฑ์เข้าของเครื่อง liquid N₂ chiller จากตารางที่ 14 เปรียบเทียบการพบ *L. innocua* ที่ท่อระบายก๊าซฝั่งผลิตภัณฑ์เข้าและออก พบว่าการปนเปื้อนอยู่ที่ท่อระบายก๊าซฝั่งผลิตภัณฑ์เข้าเท่านั้น โดยท่อระบายก๊าซฝั่งผลิตภัณฑ์เข้าเครื่อง liquid N₂ chiller มีหน้าที่ดูดลมก๊าซ N₂ ที่ใช้ทำให้เนื้อไก่ที่เพิ่งออกจากเครื่องปรุงสุกที่มีอุณหภูมิ 80°C เย็นลงเหลือ 60°C ลม N₂ ที่ระบายออกในท่อระบายฝั่งผลิตภัณฑ์เข้าจึงพาความร้อนจากเนื้อไก่ออกไปด้วย ทำให้ภายในท่อระบายก๊าซฝั่งผลิตภัณฑ์เข้ามีอุณหภูมิอยู่ในช่วงที่ *Listeria* สามารถอยู่รอดและเจริญเติบโตได้ โดยท่อระบายก๊าซฝั่งผลิตภัณฑ์เข้าและออกมีอุณหภูมิอยู่ที่ 6°C และ -91°C ตามลำดับ ซึ่งถึงแม้ว่าอุณหภูมิภายในท่อระบายก๊าซฝั่งขาเข้าจะมีอุณหภูมิเพียง 6°C แต่ *Listeria* นั้นสามารถเพิ่มจำนวนและเจริญเติบโตได้ในอุณหภูมิต่ำถึง -0.4°C (ICMSF, 1996) รวมทั้งการสะสมของเศษเนื้อไก่ที่ถูกพาเข้าไปในท่อ โดยแรงลมของก๊าซ N₂ ทำให้ *Listeria* สามารถใช้เศษเนื้อไก่ที่สะสมอยู่ในท่อเป็นอาหารในการเจริญเติบโต และเนื่องจากลักษณะของท่อระบายก๊าซที่สูงและไม่สามารถถอดแยกส่วนเพื่อทำความสะอาดและฆ่าเชื้อได้ และความเร่งรีบในการผลิต ทำให้การทำความสะอาดและฆ่าเชื้อที่จุดนี้มีความถี่ไม่เพียงพอและไม่สามารถทำได้ อย่างมีประสิทธิภาพในช่วงพักระหว่างวันหรือหลังสิ้นสุดการผลิต จึงเป็นผลให้ท่อระบายก๊าซฝั่งผลิตภัณฑ์เข้าของเครื่อง liquid N₂ chiller เป็นแหล่งสะสมของ *Listeria* ได้เป็นอย่างดี

สำหรับ *L. welshimeri* จากการจำแนกในระดับสายพันธุ์ของ *L. welshimeri* ด้วยวิธี RAPD พบว่า *L. welshimeri* ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เป็นสายพันธุ์ LW 1.5 ซึ่งพบสอดคล้องกับตัวอย่างสิ่งแวดล้อมของบริเวณการผลิต 1 ตัวอย่าง คือท่อระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็ง แต่อย่างไรก็ตามพบการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ที่ผลิตในวันที่ 14 พฤศจิกายน 2552 แต่พบการปนเปื้อนของ LW 1.5 ที่ท่อระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็งในวันที่ 18

ธันวาคม 2552 รวมทั้งท่อระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็งจัดเป็นพื้นผิวในโซน 3 แสดงให้เห็นว่ายังไม่พบเส้นทางการปนเปื้อนที่แท้จริงของ *L. welshimeri* ผู้ผลิตภัณฑ์ อาจเนื่องจาก *L. welshimeri* มีความซุกต่ำ จึงมีโอกาสน้อยที่สู่มเก็บตัวอย่างแล้วพบเชื้อนี้

กรณีการประเมินความสอดคล้องของ *L. seeligeri* LS 1 พบว่าวันที่พบการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์ไม่พบการปนเปื้อนของ *L. seeligeri* LS 1 ในสิ่งแวดล้อม แต่อย่างไรก็ตามก่อนพบการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ 4 วันพบการปนเปื้อนที่พื้นผิวโซน 1 ซึ่งคือที่ถุงมือของพนักงานบรรจุ และอีก 2 วันหลังจากพบการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ พบการปนเปื้อนที่พื้นห้องบรรจุและท่อระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็ง แสดงให้เห็นว่ามีการปนเปื้อนของ *L. seeligeri* LS 1 จากพื้นผิวในโซนมาสู่พื้นผิวในโซน 1 แล้วจึงปนเปื้อนสู่ผลิตภัณฑ์

3.5 การจัดการความเสี่ยง

จากการประเมินแหล่งสะสมของ *Listeria* ในสิ่งแวดล้อมของกระบวนการผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็งที่จะก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์ พบท่อระบายก๊าซของเครื่อง liquid N₂ chiller เป็นแหล่งสะสมสำคัญของ *L. innocua* และ *L. welshimeri* ทั้งสายพันธุ์หลักที่มีการปนเปื้อนอยู่ในผลิตภัณฑ์ และสายพันธุ์ย่อยอื่นๆ ดังนั้นจึงได้มีการจัดการกับท่อระบายก๊าซของเครื่อง liquid N₂ chiller เพื่อลดปัญหาการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์และในสิ่งแวดล้อมอื่นๆ ที่เกิดการปนเปื้อนเนื่องจากการปนเปื้อนข้ามของเชื้อจากท่อระบายก๊าซ โดยถึงแม้ว่าท่อระบายก๊าซนั้นมีความสูงแต่ก็แก้ไขให้สามารถถอดแยกออกเป็นท่อน เพื่อให้สามารถล้างทำความสะอาดและฆ่าเชื้อภายในท่อได้อย่างทั่วถึง แล้วจึงฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำร้อนและน้ำร้อน 70°C และทำฝาครอบปิดปากท่อระบายก๊าซขณะที่หยุดพักหรือไม่มีการผลิต เพื่อป้องกันหยดน้ำควบแน่นที่จะพาเชื้อภายในท่อติดมากับหยดน้ำ แล้วหยดออกมาปนเปื้อนสิ่งแวดล้อมอื่นๆ ภายในบริเวณการผลิต หรือหยดลงบนพื้น ซึ่งพนักงานที่เดินผ่านอาจย่ำน้ำแล้วพาเชื้อกระจายไปยังจุดอื่น

สายพานของเครื่องปิดผนึกและสายพานของเครื่องตรวจจับ โลหะเป็นแหล่งสะสมของ *Listeria* ที่สำคัญอีกแหล่งหนึ่งที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนข้ามภายในบริเวณการบรรจุ ซึ่งสายพานของเครื่องปิดผนึกและสายพานของเครื่องตรวจจับ โลหะก่อให้เกิดการปนเปื้อนข้ามไปถึงถุงมือพนักงานบรรจุและถุงมือพนักงานควบคุมคุณภาพหลังการบรรจุได้ เนื่องจากการเคลื่อนที่ไปมาของพนักงานในบริเวณบรรจุ ทำให้ *Listeria* ปนเปื้อนข้ามจากสายพานของเครื่องปิดผนึกและสายพานของเครื่องตรวจจับ โลหะมาที่โต๊ะบรรจุหรือปนเปื้อนสู่ในผลิตภัณฑ์ได้ สายพานของเครื่องตรวจจับ โลหะมักเปียกชื้นจากหยดน้ำควบแน่นที่เกาะอยู่ที่ผิวด้านนอกของบรรจุภัณฑ์อยู่เสมอ ดังนั้นจึงมีการรักษาพื้นผิวของสายพานนี้ให้อยู่ในสภาพที่แห้ง และใช้สารฆ่าเชื้อเช็ดทำความสะอาดที่สายพาน เนื่องจากไม่สามารถล้างทำความสะอาดและฆ่าเชื้อเครื่องปิดผนึกและเครื่องตรวจจับ โลหะได้เหมือนเครื่องจักรอื่นๆ เช่น เครื่องหั่น ที่มีการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อในช่วงหยุดพักการผลิต ระหว่างวันหรือหลังเสร็จสิ้นการผลิต เพราะจะกระทบต่อประสิทธิภาพการทำงานของเครื่อง แต่อย่างไรก็ตามมี

การถอดแยกชิ้นส่วนของเครื่องตรวจจับโลหะ แล้วจึงทำความสะอาดและฆ่าเชื้อสายพานและส่วนประกอบต่างๆเครื่องตรวจจับโลหะในวันที่ไม่มีการผลิต

ท่อระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็งเป็นแหล่งสะสมของ *Listeria* ที่สำคัญอีกแหล่งหนึ่งที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนข้ามภายในบริเวณการบรรจุ ซึ่งมีการจัดการ โดยใช้ถุงตาข่ายดักเศษเนื้อไก่ที่ออกมาจากท่อระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็ง เพื่อไม่ให้เศษเนื้อกระจายและเกาะอยู่บนพื้น ได้เปลี่ยนชนิดของสารฆ่าเชื้อในท่อระบายน้ำจากเดิมเป็นสารฆ่าเชื้อในกลุ่ม peracetic acid เข้มข้น 3.0% เปลี่ยนเป็นสารฆ่าเชื้อในกลุ่ม quaternary ammonium compound เข้มข้น 1.5% (2,400 ppm) รวมทั้งใช้น้ำร้อนฉีดพื้นบริเวณพื้นรอบเครื่องแช่เยือกแข็งด้วย

หลังการใช้มาตรการต่างๆในการจัดการแหล่งสะสมของ *Listeria* แล้วจึงสุ่มเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์และพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิตอีกครั้ง พบการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์ 2 ตัวอย่างในระยะเวลา 1 เดือน โดยคิดเป็นความชุกได้ร้อยละ 0.2 โดยลดลงจากเดิม 1.6% โดยสายพันธุ์ของ *Listeria* ที่พบในผลิตภัณฑ์หลังการจัดการพบว่าเป็น *L. innocua* LI 1.6 ซึ่งพบสายพันธุ์ LI 1.6 นี้สอดคล้องกับที่ท่อระบายก๊าซของเครื่อง liquid N₂ chiller ดังแสดงในตารางที่ 15 และกลับพบ *L. welshimeri* ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมของการผลิตมากกว่า *L. innocua* โดยพบว่า LW 1.7 ยังคงเป็นสายพันธุ์หลักของ *L. welshimeri* ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ซึ่งพบที่พื้นผิวของสิ่งแวดล้อมทั้ง 3 โซน ได้แก่ โซน 1 พบที่ถุงมือของพนักงานควบคุมคุณภาพหลังการบรรจุ โซน 2 พบที่หน้าจอกควบคุมเครื่องหัน และ โซน 3 พบที่ท่อระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็ง และบันไดเครื่องแช่เยือกแข็ง ตารางที่ 15 ความชุกของ *Listeria* สายพันธุ์ต่างๆที่พบในสิ่งแวดล้อมของการผลิตหลังการจัดการความเสี่ยง

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

หลังจากการประเมินความเสี่ยงของแหล่งสะสม *Listeria* ในสิ่งแวดล้อมของบริเวณการผลิตที่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์ และได้ปฏิบัติใช้มาตรการจัดการความเสี่ยงแล้ว ถึงแม้ว่ามีความชุกของ *Listeria* ในกระบวนการผลิตลดลง แต่ยังคงพบการปนเปื้อนของ *Listeria* หลงเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์และสิ่งแวดล้อมของบริเวณการผลิต ดังเช่นในงานวิจัยของ Beresford และคณะ (2001) และ Gudbjornsdottir และคณะ (2004) ที่พบว่ายังพบการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* อยู่หลังการปฏิบัติใช้มาตรการจัดการเพื่อกำจัดการปนเปื้อนของเชื้อ ซึ่งถึงแม้ว่ายังไม่สามารถกำจัดการปนเปื้อนของ *Listeria* ให้หมดไปได้ แต่อย่างไรก็ตามต้องมีการควบคุมเชื้อให้มีการปนเปื้อนอยู่น้อยที่สุด โดยการทำความสะอาดและฆ่าเชื้ออย่างถูกวิธีและมีความถี่ที่เหมาะสม เนื่องจากการพบ *Listeria* ที่อาศัยแบบคงอยู่ (persistence) ในงานวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่าจำเป็นต้องมีการทำความสะอาดและฆ่าเชื้ออย่างทั่วถึงตามซอกมุมของพื้นผิวต่างๆของสิ่งแวดล้อมมากขึ้น นอกจากนี้ในงานวิจัยจึงเสนอมาตรการจัดการเพื่อใช้ควบคุมและลดการปนเปื้อนของ *Listeria* ต่อไป โดยให้มีการทบทวนวิธีการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อที่ใช้อยู่เพื่อให้มั่นใจถึงประสิทธิภาพของการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อ โดยลำดับขั้นตอนของการฆ่าเชื้อจากเดิมหลังการทำความสะอาดแล้วจะฉีดพ่นด้วย peracetic acid แล้วตามด้วยการฉีดพ่นไอน้ำร้อน ซึ่งการใช้กรดก่อนจะทำให้มีชั้นฟิล์มของเหลวค้างอยู่บนพื้นผิวทำให้การใช้ไอน้ำร้อนมีประสิทธิภาพไม่เพียงพอในการฆ่าเชื้อที่หลงเหลืออยู่บนพื้นผิว (Koutsoumanis and Sofos, 2004) จึงเสนอให้เปลี่ยนลำดับการฆ่าเชื้อเป็นการใช้ไอน้ำร้อนก่อนแล้วจึงฉีดพ่นด้วย peracetic acid นอกจากนี้ควรมีการขจัดคราบหรือวัสดุอินทรีย์ (organic matter) ที่หลงเหลืออยู่หลังจากการผลิต เช่น เศษเนื้อไก่ที่อาจติดอยู่ที่สายพานหรือตามซอกมุมของเครื่องจักร ให้หมดไปก่อนการล้างทำความสะอาดและฆ่าเชื้อ เนื่องจากสารอินทรีย์เหล่านี้จะลดประสิทธิภาพการทำงานของสารฆ่าเชื้อ โดยเฉพาะสารฆ่าเชื้อในกลุ่ม quaternary ammonium compound และคลอรีน ซึ่งเป็นสารที่ฆ่าเชื้อในสิ่งแวดล้อมของกระบวนการผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็งนี้ รวมทั้งสารอินทรีย์จะทำให้ความเข้มข้นจริงของสารฆ่าเชื้อที่อยู่บนพื้นผิวไม่เป็นไปตามที่กำหนด ซึ่งอาจทำให้เกิดการปรับตัวของ *Listeria* ในการต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อ (Aase et al., 2000) นอกจากนี้ในการกำจัด *Listeria* ที่สะสมอยู่ในท่อระบายน้ำนั้น อาจใช้การควบคุมทางชีวภาพ โดย Zhao และคณะ (2006) พบว่าเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* C-1-92 และ *Enterococcus durans* 152 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *L. monocytogenes* ได้ทั้งในหลอดทดลองและในรูปไบโอฟิล์มที่อุณหภูมิ 4 ถึง 37°C และเมื่อนำมาใช้จริงในท่อระบายน้ำของโรงงานผลิตเนื้อไก่สด พบว่าการใช้แบคทีเรียสองชนิดนี้ร่วมกันสามารถลดจำนวนของ *Listeria* spp. ในท่อระบายน้ำได้ตั้งแต่ที่อุณหภูมิ 3 ถึง 26°C

4. สรุปผลงานวิจัย

1. ไพรเมอร์ที่สามารถจำแนก *L. innocua* ได้ดีที่สุดคือ ไพรเมอร์ OMP-01 (5' GTTGGTGGCT 3') ไพรเมอร์ที่สามารถจำแนก *L. welshimeri* ได้ดีที่สุดคือ ไพรเมอร์ HLWL 74 (5' ACGTATCTGC 3') และ HLWL 85 (5' ACAACTGCTC 3') ส่วนไพรเมอร์ที่สามารถจำแนก *L. seeligeri* ได้ดีคือ ไพรเมอร์ OMP-01, HLWL 74, HLWL 85 และ UFS (5' TTATGTAAAACGAC GGCCAGT 3') และในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์แบบสุ่มนั้น ความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบมีผลต่อรูปแบบของแถบดีเอ็นเอของผลผลิตของปฏิกิริยา
2. วิธี RAPD เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการจำแนกสายพันธุ์ของ *Listeria* โดยมีความสามารถในการจำแนกที่เทียบเท่ากับวิธีที่ใช้ในทางการค้า (วิธี ribotyping) รวมทั้งมีความสามารถในการทำซ้ำได้
3. ผลิตภัณฑ์สุดท้ายมีการปนเปื้อน *L. innocua* 12 ตัวอย่าง *L. welshimeri* 1 ตัวอย่างและ *L. seeligeri* 1 โดยความชุกในการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายเท่ากับร้อยละ 1.6 แต่ไม่พบการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ระหว่างขั้นตอนการผลิต
4. รอบการผลิตช่วงกลางวันและกลางคืนไม่มีผลต่อการพบ *Listeria* spp. ในสิ่งแวดล้อม แต่เวลาของการผลิตในรอบการผลิตแต่ละช่วงมีผลต่อการพบ *Listeria* spp. ที่พื้นผิวของโซน 3 ส่วนโซน 1 และ 2 มีการพบ *Listeria* spp. อย่างสม่ำเสมอตลอดระยะเวลาการผลิต
5. ในการหาแหล่งของการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. ในสิ่งแวดล้อมของบริเวณการผลิต มีการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. มากในพื้นที่ผิวของทั้งโซน 3, 2 และ 1 ตามลำดับ โดยเป็น *L. innocua* มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 82.3 ของตัวอย่างที่พบ *Listeria* spp. รองลงมาเป็น *L. welshimeri* ร้อยละ 11.2, *L. seeligeri* ร้อยละ 5.5 และ *L. monocytogenes* ร้อยละ 1.0
6. ในการจำแนกสายพันธุ์ของ *Listeria* ที่ปนเปื้อนอยู่ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายและสิ่งแวดล้อมของกระบวนการผลิตด้วยวิธี RAPD สามารถจำแนกตัวอย่าง *L. innocua* ได้ 3 สายพันธุ์หลัก กำหนดเป็นสายพันธุ์ LI 1, 2 และ 3 โดยสายพันธุ์ LI 1 แบ่งออกเป็นสายพันธุ์ย่อยได้อีก 4 สายพันธุ์ย่อย ส่วนสายพันธุ์ LI 2 แบ่งออกเป็นสายพันธุ์ย่อยได้อีก 2 สายพันธุ์ย่อย สำหรับสายพันธุ์ LI 3 ไม่มีสายพันธุ์ย่อย โดย *L. innocua* ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นสายพันธุ์ LI 1.1 และดำรงอยู่มากที่สุดในสิ่งแวดล้อมตลอดระยะเวลาการเก็บตัวอย่าง โดยการดำรงอยู่ของ *L. innocua* สายพันธุ์ LI 1.1 ในกระบวนการผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็งนี้เป็นการอาศัยแบบคงอยู่

สำหรับ *L. welshimeri* จำแนกได้ 3 สายพันธุ์หลัก กำหนดเป็นสายพันธุ์ LW 1, 2 และ 3 โดยสายพันธุ์ LW 1 แบ่งออกเป็นสายพันธุ์ย่อยได้อีก 5 สายพันธุ์ย่อย ส่วนสายพันธุ์ LW 2 และ LW 3 ไม่พบสายพันธุ์ย่อย โดย *L. welshimeri* ที่พบในตัวอย่างผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นสายพันธุ์ LW 1.5

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

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

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

8. การจัดการความเสี่ยงหลังการประเมินความเสี่ยงโดยหาแหล่งและเส้นทางการปนเปื้อนของ *Listeria* โดยการใช้วิธีทางอนุชีววิทยาทำให้ความชุกของ *Listeria* ที่พบในผลิตภัณฑ์ลดลงจากร้อยละ 1.6 เหลือร้อยละ 0.2

9. การหาเส้นทางการปนเปื้อนของ *Listeria* จากสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิตสู่ผลิตภัณฑ์เป็นเรื่องยาก ดังนั้นเมื่อตรวจพบ *Listeria* ที่พื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในโซนใดก็ตามต้องเร่งกำจัดและหาแนวทางป้องกันไม่ให้มีการปนเปื้อนของเชื้อที่พื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในโซนนั้นอีก

ข้อเสนอแนะ

1. การแบ่งโซนของพื้นผิวสิ่งแวดล้อมการผลิต แบ่งตามระดับความเสี่ยงของการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคไปสู่ผลิตภัณฑ์ ดังนั้นโรงงานผลิตอาหารแต่ละประเภทจำเป็นต้องมีการประเมินและจัดโซนของพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมของแต่ละโรงงานเอง เนื่องจากพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมของโรงงานผลิตอาหารแต่ละประเภทอาจมีระดับความเสี่ยงที่แตกต่างกัน

2. การวิเคราะห์ *Listeria* ในระดับสายพันธุ์โดยวิธี RAPD จำเป็นต้องมีการ standardize วิธีปฏิบัติการ และมีตัวอย่างควบคุมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสทุกครั้ง เพื่อความถูกต้องและความสม่ำเสมอของผลการวิเคราะห์

3. การวิเคราะห์การปนเปื้อนของ *Listeria* ในระดับสายพันธุ์โดยวิธีทางอนุชีววิทยา สามารถใช้เป็นแนวทางการติดตามหาแหล่งที่มาและเส้นทางการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคอื่นๆ ในโรงงานได้

5. เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

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

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

สมาคมผู้ผลิตไก่เพื่อส่งออกไทย. Thai chicken meat export. [ออนไลน์]. 2552. แหล่งที่มา: <http://www.thaipoultry.org> [2552, สิงหาคม 10]

ภาษาอังกฤษ

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

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

Autio, T., and others. 1999. Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. Appl. Environ. Microbiol. 65: 150-155.

Beresford, M. R., Andrew, P. W., and Shama, G. 2001. *Listeria monocytogenes* attaches to many materials found in food processing environment. J. Appl. Bacteriol. 90: 1000-1005.

Byun, S.K., Jung, S.C., and Yoo, H.S. 2001. Random amplification of polymorphic DNA typing of *Listeria monocytogenes* isolated from meat. Int. J. Food Microbiol. 69: 227-235.

Chambel, L., and others. 2007. Occurrence and persistence of *Listeria* spp. in the environment of ewe and cow's milk cheese dairies in Portugal unveiled by an integrated analysis of identification, typing and spatial-temporal mapping along production cycle. Int. J. Food Microbiol. 116: 52-63.

- Farber, J. M., and Addison, C. J. 1994. RAPD typing for distinguishing species and strains in the genus *Listeria*. J. Appl. Bacteriol. 77: 242-250.
- Fonnesbech Vogel, B., Jørgensen, L. V., Ojieniyi, B., Huss, H. H., and Gram, L. 2001. Diversity of *Listeria monocytogenes* isolates from cold-smoked salmon produced in different smokehouses as assessed by random amplified polymorphic DNA analyses. Int. J. Food Microbiol. 65: 83-92.
- Gilot, P., and Content, J. 2002. Specific identification of *Listeria welshimeri* and *Listeria monocytogenes* by PCR assays targeting a gene encoding a fibronectin-binding protein. J. Clin. Microbiol. 40: 698-703.
- Gudbjornsdottir, B., and others. 2004. The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in Nordic countries. Food Microbiol. 21: 217-225.
- Heir, E., and others. 2004. Molecular epidemiology and disinfectant susceptibility of *Listeria monocytogenes* from meat processing plants and human infections. Int. J. Food Microbiol. 96: 85-96.
- ICMSF. Micro-organisms in foods 5: Characteristics of microbial pathogens. New York: Blakie Academic and Professional, 1996.
- Koutsoumanis, K. P., and Sofos, J. N. 2004. Comparative acid stress response of *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 and *S. typhimurium* after habituation at different pH conditions. Lett. Appl. Microbiol. 38: 321-326.
- Lekroengsin, S., Keeratipibul, S., and Trakoonlerswilai, K. 2007. Contamination profile of *Listeria* spp. in three types of ready-to-eat chicken meat products. J. Food Prot. 70: 85-89.
- Lopez, V., and others. 2008. Molecular tracking of *Listeria monocytogenes* in an Iberian pig abattoir and processing plant. Meat Sci. 78: 130-134.
- Lundén, J. M., Autio, T. J., and Korkeala, H. J. 2002. Transfer of persistent *Listeria monocytogenes* contamination between food-processing plants associated with a dicing machine. J. Food Prot. 65: 1129-1133.
- MacGowan, A. P., O'Donoghue, K., Nicholls, S., Mclauchlin, J., Bennett, P. M., and Reeves, D.S. 1993. Typing of *Listeria* spp. by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. J. Med. Microbiol. 38: 322-327.
- Miettinen, M. K., Björkroth, K., and Korkeala, H. J. 1999. Characterization of *Listeria monocytogenes* from an ice cream plant by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. Int. J. Food Microbiol. 46: 187-192.

- Pan, Y., Breidt, F., Jr., and Kathariou, S. 2006. Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. Appl. Environ. Microbiol. 72: 7711-7717.
- Unnerstad, H., Bannerman, E., Bille, J., Danielsson-Tham, M. L., Waak, E., and Tham, W. 1996. Prolonged contamination of a dairy with *Listeria monocytogenes*. Neth. Milk Dairy J. 50: 493-499.
- Wulff, G., Gram, L., Ahrens, P., and Vogel, B. F. 2006. One group of genetically similar *Listeria monocytogenes* strains frequently dominates and persists in several fish slaughter- and smokehouses. Appl. Environ. Microbiol. 72: 4313-4322.
- Yucel, N., Citak S., and Gundogan N. 2004. The incidence of *Listeria monocytogenes* in raw meat. Indian Vet. J. 81: 1192-1194.
- Zhao, T., and others. 2006. Control of *Listeria* spp. by competitive-exclusion bacteria in floor drains of a poultry processing plant. Appl. Environ. Microbiol. 72: 3314-3320.

ภาคผนวก

วิธีวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์

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

Flask ขนาด 250 ml

Sterile pipette ขนาด 1 และ 10 ml

Petri dish

ก้าน swab

หลอดทดลอง

Glass slide

Loop

เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

Stomacher

Incubator 30-32 °C

Incubator 35-37 °C

กึ่งอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

Half Fraser broth

Fraser broth

Oxford agar

Ottaviani Agosti agar

TSAYE (Tryptone soya agar + 0.6% Yeast extract)

TSYE (Tryptone soya + 0.6% Yeast extract) broth

Hydrogen peroxide

Gram stain reagent

วิธีทดลอง

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

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

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

10. การยืนยันผล

10.1 Catalase test

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

10.2 Gram staining

ทำการย้อมสี gram stain เชื้อที่ได้จากข้อ 9

10.3 การอ่านผล

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

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

อุปกรณ์

Flask ขนาด 250 ml

Petri dish

หลอดทดลอง

Loop

เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

Stomacher

Incubator 25 °C

Incubator 35-37 °C

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

TSYE (Tryptone soya + 0.6% Yeast extract) broth

Sheep blood agar

Carbohydrate utilization broth (rhamnose และ xylose)

เชื้อจุลินทรีย์มาตรฐาน

Staphylococcus aureus

Rhodococcus equi

วิธีทดลอง

1. Haemolysis test

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

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

2. Carbohydrate utilization

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

ถ้าผลเป็น positive อาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ถ้าผลเป็น negative อาหารเลี้ยงเชื้อจะ ยังคงมีสีแดงเหมือนเดิม

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

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

ถ้าผลเป็น positive การเกิด haemolysis ของเชื้อที่ทดสอบจะขยายเพิ่มขึ้นใกล้ *S. aureus* และ *R. equi* โดยสำหรับ *R. equi* จะมีรูปร่างคล้ายหัวลูกศร ถ้าผลเป็น negative การเกิด haemolysis จะไม่ ขยายเพิ่มขึ้นใกล้ *S. aureus* หรือไม่เกิดเลย และการเกิด haemolysis จะขยายเพิ่มขึ้นใกล้ *R. equi* แต่ ไม่เป็นรูปหัวลูกศร หรือไม่เกิดเลย

4. การอ่านผล

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

^a variable reaction

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อหัวหน้าโครงการ (ภาษาไทย) นางสาวสุวิมล กิระติพิบูล ตำแหน่งทางวิชาการ รองศาสตราจารย์ ดร.

(ภาษาอังกฤษ) Miss Suwimon Keeratipibul

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

คณะ/สถาบัน คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 02-2185515, 081-333-1794

โทรสาร 02-254-4314

E-mail: Suwimon.K@chula.ac.th

ที่อยู่ปัจจุบัน 259/8 ถ.จักรพรรดิพงษ์ แขวงคลองมอหานะ เขตป้อมปราบฯ กรุงเทพฯ 10100

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วท.บ.	เคมีเทคนิค (เทคโนโลยีทางอาหาร)	พ.ศ. 2519
Hiroshima University, Japan	Master of Engineering	Fermentation Technology	พ.ศ. 2524
Hiroshima University, Japan	Doctor of Engineering	Fermentation Technology	พ.ศ. 2527

ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่พิมพ์)

- 1) Smitinont, T., Tanskul, C., Tanasupawat, S., Keeratipibul, S., Navarini, L., Bosco, M. and Cescutti, P., 1999. "Exopolysaccharide-Producing Lactic Acid Bacteria Strains from Traditional Thai Fermented Foods: Isolation, Identification and Exopolysaccharide Characterization", *International Journal of Food Microbiology*. 51:105-111.
- 2) ประนอม พรชัยประสิทธิ์ สุวิมล กิระติพิบูล และกิตติพงษ์ ห่วงรักษ์ 2543 "การผลิตเนคต้าฟักทองโดยใช้ เพคตินเนส" *วารสารเกษตรพระจอมเกล้า* 18(2): 10-19.
- 3) Prakitchaiwattana, C., Keeratipibul, S. and Sanguandeeikul, R., 2002. "Rapid Method for Estimation of Total Number of Catalase Producing Bacteria in Fresh Black Tiger Prawns", *Food Australia*. 54(12): 580-582.

- 4) Thonsanit, J., Tanasupawat, S., Keeratipibul, S. and Jatikavanich, S., 2002. "Characterization and Identification of *Tetragenococcus halophilus* and *Tetragenococcus muriaticus* Strains from Fish Sauce (Nam-pla)", Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria. 13(1): 46-52.
- 5) Keeratipibul, S., Tutanathorn, H. 2002 "A Case Study on HACCP Implementation in Thailand" submitted to FAO of the United Nations
- 6) Seearunruangchai, A., Tanasupawat, S., Keeratipibul, S., Thawai, C., Itoh, T. and Yamada, Y., 2004. "Identification of Acetic Acid Bacteria Isolated from Fruits Collected in Thailand", J. Gen. Appl. Microbiol. 50:47-53(Short Communication)
- 7) Suwannathep, S., Arpanutud, P. and Kiratipiboon, S. 2006 "A Study of Human Resource Development for Middle and Higher Level Employees in the Food Industry to Enhance Productivity and Competitiveness in Thailand", ICBM 44-49, Sri Lanka
- 8) Lekroengsin, S., Keeratipibul, S. and Trakoonlerswilai, K., 2007. "Contamination Profile of *Listeria* spp. in Three Types of RTE Chicken Meat Products" Journal of Food Protection. 70(1): 85-89.
- 9) พรรณวดี วิถีสำราญธรรม กิตติพงษ์ ห่วงรัญญ์ และสุวิมล กิรติพิบูล 2550 "สมบัติการใช้งานและการปรับปรุงคุณค่าทางโภชนาการของโปรตีนสกัดจากเมล็ดฝ้ายไร้ต่อมพิษ" วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 25(1): 22-32.
- 10) ดวงพร สามัตถิยะ กิตติพงษ์ ห่วงรัญญ์ และสุวิมล กิรติพิบูล 2550 "คุณภาพเต้าหู้แข็งเมื่อใช้น้ำมะนาวเป็นตัวตกตะกอน" วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 25(1): 33-46.
- 11) พรรณวดี วิถีสำราญธรรม กิตติพงษ์ ห่วงรัญญ์ และสุวิมล กิรติพิบูล 2550 "ภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากกากเมล็ดฝ้ายต่อมพิษ" วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 25(2): 1-11.
- 12) โสภิตา สามัตถิยะ กิตติพงษ์ ห่วงรัญญ์ และสุวิมล กิรติพิบูล 2550 "คุณภาพเต้าหู้แข็งเมื่อใช้น้ำส้มเขียวหวานเป็นตัวตกตะกอน" วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 26(2): 48-57.
- 13) Suwimon Keeratipibul and Sumalin Lekroengsin, 2008. "Risk Assessment of *Listeria* spp. Contamination in the Production Line of Ready-To-Eat (RTE) Chicken Meat Products" Journal of Food Protection , 71(5) :946-952.
- 14) Suwimon Keeratipibul, Naphatrapi Luangsakul and Thiti Lertsatchayarn 2008. "The effect of Thai glutinous rice cultivars, grain length and cultivating locations on the quality of rice cracker(arare)" LWT-Food Science and Technology, 41(10):1934-1943.

- 15) Suwimon Keeratipibul and Sumalin Lekroengsin, 2009 "Risk Analysis of *Listeria* spp. Contamination in Two Types of Ready-to-Eat Chicken Meat Products" Journal of Food Protection , 72(1):67-74.
- 16) Suwimon Keeratipibul, Punnida Techaruwichit and Yuphakun Chaturongkasumrit, 2009. "Contamination Sources of Coliforms in Two Different Types of Frozen Ready-to-Eat Shrimps" Food Control, 20(3):289-293.
- 17) Pompun Theinsathid, Achara Chandrachai and Suwimon Keeratipibul, 2009. "Managing Bioplastics Business Innovation in Start Up Phase" Journal of Technology Management&Innovation, 4(1):82-93.
- 18) Arpanutud, P., Keeratipibul, S., Charoensupaya, A. and Taylor, E. 2009. "Factors Influencing Food Safety Management System Adoption in Thai Food Manufacturing Companies: Model Development & Testing", British Food Journal, 111(4):364-375.
- 19) Naphatrapi Luangsakul, Suwimon Keeratipibul, Sasitorn Jindamorakot and Somboon Tanasupawat, 2009 "Lactic Acid Bacteria and Yeasts Isolated from the Starter Doughs for Chinese Steamed Buns in Thailand" LWT - Food Science and Technology, 42(8): 1404-1412.
- 20) Suwimon Keeratipibul, Thanyaporn Oupaichit and Punnida Techaruwichit, 2009. "Contamination profiles of *Escherichia coli* and enterococci in steamed chicken meat products produced in a chicken plant in Thailand", Journal of Food Protection (article in press: September, 2009).

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อผู้ร่วมโครงการ (ภาษาไทย) น.สพ. รุจเวทย์ ทหารเกล้า ตำแหน่งทางวิชาการ

(ภาษาอังกฤษ) Mr. Rutjawate Tahamklaew

ภาควิชา

คณะ/สถาบัน ศูนย์วิจัยและพัฒนา เครื่องเบทาโกร

โทรศัพท์ 02-5647932 โทรสาร 02-5647941

E-mail: Rutjawate@betagro.com

ที่อยู่ปัจจุบัน 136 หมู่ 9 ต. คลองหนึ่ง อ. คลองหลวง จ. ปทุมธานี 12120 โทรศัพท์ 02-5647932

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปริญญาตรี	สัตวศาสตร์	พ.ศ. 2525
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปริญญาตรี	สัตวแพทยศาสตร์	พ.ศ. 2527
สถาบันบัณฑิตบริหารธุรกิจศศินทร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปริญญาโท	EMBA	พ.ศ. 2540

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อผู้ร่วมโครงการ (ภาษาไทย) นายมงคล เวสารัชเวศย์ (นามไพศาลสุข) ตำแหน่งทางวิชาการ-.....

(ภาษาอังกฤษ) Mr. Mongkol Vesaratchavest (Nampaisansuk)

ภาควิชา.....-.....

คณะ/สถาบัน ศูนย์วิจัยและพัฒนาเครื่องเบทาโกร

โทรศัพท์ 02-564-7932 โทรสาร 02-564-7941 E-mail Mongkolv@betagro.com

ที่อยู่ปัจจุบัน 136 หมู่ 9 ต. คลองหนึ่ง อ. คลองหลวง จ. ปทุมธานี 12120 โทรศัพท์ 02-564-7932

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ
University of North Texas, USA	Ph.D	Molecular Biology	2545
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	B.Sc.	Biochemistry	2536

ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่

1. Zhang, D., Pirtle, I.L., Park, S.J., **Nampaisansuk, M.**, Neogi, P., Wanjie, S.W., Pirtle, R.M., Chapman, K.D. 2009. Identification and expression of a new delta-12 fatty acid desaturase (FAD2-4) gene in upland cotton and its functional expression in yeast and Arabidopsis thaliana plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 47 (6), pp. 462-471.
2. Promdonkoy, P., Tang, K., Somlake, W., Harnpicharnchai, P., Kobayashi, R.S., Ruanglek, V., Upathanprecha, T., **Vesaratchavest, M.**, Eurwilaichitr, L., Tanapongpipat, S. 2009. Expression and characterization of Aspergillus thermostable phytases in Pichia pastoris. *FEMS Microbiology Letters* 290 (1), pp. 18-24.
3. Tumapa, S., Holden, M.T., **Vesaratchavest, M.**, Wuthiekanun, V., Limmathurotsakul, D., Chierakul, W., Feil, E.J., Currie, B.J., Day, N.P., Nierman, W.C., Peacock, S.J. 2008. Burkholderia pseudomallei genome plasticity associated with genomic island variation. *BMC Genomics* 9, art. no. 190.
4. Chantratita, N., Wuthiekanun, V., Limmathurotsakul, D., **Vesaratchavest, M.**, Thanwisai, A., Amornchai, P., Tumapa, S., Feil, E.J., Day, N.P., Peacock, S.J. 2008. Genetic diversity and

microevolution of *Burkholderia pseudomallei* in the environment. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2 (2), art. no. e182.

5. Chantratita, N., Wuthiekanun, V., Boonbumrung, K., Tiyawisutsri, R., **Vesaratchavest, M.**, Limmathurotsakul, D., Chierakul, W., Wongratanacheewin, S., pukritiyakamee, S., White, N.J., Day, N.P., Peacock, S.J. 2007. Biological relevance of colony morphology and phenotypic switching by *Burkholderia pseudomallei*. *Journal of Bacteriology* 189 (3), pp. 807-817.
6. **Vesaratchavest, M.**, Tumapa, S., Day, N.P.J., Wuthiekanun, V., Chierakul, W., Holden, M.T.G., White, N.J., (...), Peacock, S.J. 2006. Nonrandom distribution of *Burkholderia pseudomallei* clones in relation to geographical location and virulence. *Journal of Clinical Microbiology* 44 (7), pp. 2553-2557.
7. Chantratita, N., **Vesaratchavest, M.**, Wuthiekanun, V., Tiyawisutsri, R., Ulziitogtokh, T., Akcay, E., Day, N.P.J., Peacock, S.J. 2006. Short report: Pulsed-field gel electrophoresis as a discriminatory typing technique for the biothreat agent *Burkholderia mallei*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 74 (3), pp. 345-347.
8. Maharjan, B., Chantratita, N., **Vesaratchavest, M.**, Cheng, A., Wuthiekanun, V., Chierakul, W., Chaowagul, W., Day, N.P., Peacock, S.J. 2005. Recurrent melioidosis in patients in Northeast Thailand is frequently due to reinfection rather than relapse. *Journal of Clinical Microbiology* 43 (12), pp. 6032-6034.
9. Holden, M.T.G., Titball, R.W., Peacock, S.J., Cerdeño-Tárraga, A.M., Atkins, T., Crossman, L.C., Pitt, T., **Vesaratchavest, M.**, (...), Parkhill, J. 2004. Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (39), pp.14240-14245.
10. Wang, X., McMahon, M.A., Shelton, S.N., **Nampaisansuk, M.**, Ballard, J.L., Goodman, J.M. 2004. Multiple Targeting Modules on Peroxisomal Proteins Are Not Redundant: Discrete Functions of Targeting Signals within Pmp47 and Pex8p. *Molecular Biology of the Cell* 15 (4), pp.1702-1710.
11. Pirtle, I.L., Kongcharoensuntorn, W., **Nampaisansuk, M.**, Knesek, J.E., Chapman, K.D., Pirtle, R.M. 2001. Molecular cloning and functional expression of the gene for a cotton Δ -12 fatty acid desaturase (FAD2). *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression* 1522 (2), pp. 122-129.

12. Yoder, D.W., **Nampaisansuk, M.**, Pirtle, I.L., Chapman, K.D., Pirtle, R.M. 1999. Molecular cloning and nucleotide sequence of a gene encoding a cotton palmitoyl- acyl carrier protein thioesterase. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression* 1446 (3), pp. 403-413.
13. Pirtle, R.M., Yoder, D.W., Huynh, T.T., **Nampaisansuk, M.**, Pirtle, I.L., 1999. Characterization of a palmitoyl- acyl carrier protein thioesterase (FatB1) in cotton. *Plant and Cell Physiology* 40 (2), pp. 155-163.

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อผู้ร่วมโครงการ (ภาษาไทย) นางสาวดารณี ศรีสิทธินาม ตำแหน่งทางวิชาการ-.....

(ภาษาอังกฤษ) Miss Daranee Srisitthinam

ภาควิชา-.....

คณะ/สถาบัน ศูนย์วิจัยและพัฒนา เครื่องเบทาโกร

โทรศัพท์ 02-5647932

โทรสาร 02-5647941

E-mail: Daranees@betagro.com

ที่อยู่ปัจจุบัน 136 หมู่ 9 ต. คลองหนึ่ง อ. คลองหลวง จ. ปทุมธานี 12120 โทรศัพท์ 02-5647932

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ)	เทคโนโลยีชีวภาพ	พ.ศ. 2548
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)	เทคโนโลยีชีวภาพ	พ.ศ. 2552

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อผู้ร่วมโครงการ (ภาษาไทย) นางสาวพรณิดา เตชะหรรุวิชิต ตำแหน่งทางวิชาการ-.....

(ภาษาอังกฤษ) Miss Punnida Techaruwichit - -

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 02-2224350

E-mail: tpunnida@hotmail.com

ที่อยู่ปัจจุบัน 2/2 ถนนเจริญกรุง แขวงวังบูรพา เขตพระนคร กรุงเทพฯ 10200 โทรศัพท์ 02-2224350

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วท.บ. (เกียรตินิยมอันดับ 2)	เทคโนโลยีทางอาหาร	พ.ศ. 2549
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วท.ม.	เทคโนโลยีทางอาหาร	พ.ศ. 2553

ผลงานทางวิชาการที่ตีพิมพ์เผยแพร่

1. Keeratipibul, S., Meethong, S., **Techaruwichit, P.**, and Thephuttee, N. 2010. Prevalence of *Escherichia coli* and Enterococci in a Thai Frozen Cooked Chicken Plant, and Modeling of the Cleaning and Sanitizing Procedure. Food Control. 21, 1104–1112.
2. Keeratipibul, S., Oupaichit, T., and **Techaruwichit, P.** 2009. Contamination profiles of *Escherichia coli* and enterococci in steamed chicken meat products. Journal of Food Protection. 72(9), 1821-1829.
3. Suwimon Keeratipibul, **Punnida Techaruwichit** and Yuphakun Chaturongkasumrit. 2009. Contamination Sources of Coliforms in Two Different Types of Frozen Ready-to-Eat Shrimps. Food Control. 20(3), 289-293.