

**ศึกษาการวิเคราะห์ *Escherichia coli* ในอาหารทะเลแช่แข็ง  
ด้วยวิธี MPN technique  
Study of *Escherichia coli* Analysis in Frozen Seafood  
by MPN Technique**

นงลักษณ์ พิสุทธิลาภ  
นิตยา แสงเศวตมณีงาม

Nongluk Pisuttilap  
Nittaya Saengswaimaneegram

กองอาหารส่งออก  
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์  
ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

Division of Food for Export  
Department of Medical Sciences  
Tiwanond Road, Nonthaburi 11000

**บทคัดย่อ** การวิเคราะห์ *Escherichia coli* ในขั้นตอน Confirm test และ Complete test ด้วยวิธี MPN technique ในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแช่แข็ง 12,812 ตัวอย่าง คือ กุ้ง ปลาหมึก ปลาและไข่ปลา หอย อาหารทะเลรวม และปู จำนวน 3,481 2,542 6,430 190 41 และ 128 ตัวอย่างตามลำดับ พบมีการปนเปื้อนในขั้นตอน Confirm test และ Complete test จำนวน 477 ตัวอย่าง (ร้อยละ 3.72) และ 467 ตัวอย่าง (ร้อยละ 3.64) ตามลำดับ จากการทดสอบ IMViC test ในขั้นตอน Complete test พบว่า Simmons citrate ให้ผลบวก ซึ่งแสดงว่าใช่ *Escherichia coli* จำนวน 467 ตัวอย่าง (ร้อยละ 3.64) ทำให้ผลในสองขั้นตอนมีความแตกต่างกัน การเพิ่ม Simmons citrate ในขั้นตอน Confirm test จะทำให้ช่วยลดระยะเวลาและต้นทุน โดยยังคงรักษาคุณภาพของผลงานให้ถูกต้องเชื่อถือได้

**ABSTRACT** Confirmation tests and complete tests in MPN technique proceeding step were studied for detection of *Escherichia coli* contaminated in 12,812 frozen seafood samples. Tested samples were frozen shrimps (3,481), cuttlefishes (2,542), fishes and fish eggs (6,430), shells (190), mixed seafood (41), and crabs (128). Results in confirm test and complete test steps showed 477 (3.72%) and 467 (3.64%) positive samples, respectively. Complete test step by IMViC showed Simmons citrate positive (indicated that *Escherichia coli* were positive) 467 samples (3.64%), which were the main different results between both steps. Additional of Simmons citrate in confirm test step can be enable decrease time consuming and cost, whereas test results validity are acceptable.

**Key words :** confirm test, complete test, *Escherichia coli*, frozen seafood

## บทนำ

ประเทศไทยมีผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแช่แข็งเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญยิ่งที่ทำรายได้ให้แก่ประเทศนับเป็นมูลค่ามหาศาล แต่เนื่องจากมีการแข่งขันในตลาดโลกที่สูงขึ้นดังนั้นจะต้องปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ให้เป็นที่ยอมรับของประเทศคู่ค้า จึงมีการนำระบบ HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) ซึ่งคณะกรรมการอาหารมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ (CAC - Codex Alimentarius Commission) ยอมรับให้ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อให้ผลิตภัณฑ์อาหารมีคุณภาพดีตรงตามมาตรฐานถูกสุขลักษณะและปลอดภัยต่อผู้บริโภค โดยเฉพาะการตรวจสอบความปลอดภัยของจุลินทรีย์ก่อนการส่งออกเป็นสิ่งสำคัญซึ่งกำหนดให้ *Escherichia coli* เป็นแบคทีเรียที่ใช้เป็นดัชนีในการบ่งชี้คุณภาพของผลิตภัณฑ์

*Escherichia coli* เป็นแบคทีเรียในสกุล *Enterobacteriaceae* ดิตีลแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่งตรง ดำรงชีวิตแบบ Facultative anaerobe และเป็นเชื้อประจำถิ่น (Normal flora) ที่อยู่บริเวณลำไส้คนและเป็นสัตว์เลือดอุ่น ส่วนใหญ่จะไม่ทำให้เกิดโรค แต่มีบางสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคลำไส้อักเสบท้องเสีย ปวดท้องอย่างรุนแรง อาเจียนและถ่ายอุจจาระเป็นเลือดทำให้เสียชีวิตได้ เช่น *Escherichia coli* O157:H7 ซึ่งพบการระบาดในประเทศที่พัฒนา เช่น สหรัฐอเมริกา แคนาดา และญี่ปุ่น เป็นต้น ดังนั้นการตรวจสอบเชื้อนี้ในอาหารเป็นดัชนีสุขาภิบาล (Sanitary index) ที่แสดงว่าอาจมีการปนเปื้อนจากอุจจาระทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารนั้นมีโอกาสที่จะมีเชื้อโรคทางเดินอาหารปะปนอยู่ด้วย ย้อมแสดงถึงสุขลักษณะการผลิตอาหารที่ไม่ได้คุณภาพมาตรฐานสากล เนื่องจากการประเมินคุณภาพความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อการส่งออกต้องวิเคราะห์

หาปริมาณปนเปื้อนของ *Escherichia coli* ตามข้อกำหนดของประเทศผู้นำเข้าทุกตัวอย่าง เพื่อออกหนังสือรับรองคุณภาพคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาผลการตรวจสอบปริมาณปนเปื้อนของ *Escherichia coli* ในขั้นตอนวิจัยยืนยัน (Confirm test) และขั้นสมบูรณ์ (Complete test) เพื่อนำเสนอวิธีการปรับเปลี่ยนขั้นตอนการตรวจสอบเพื่อลดระยะเวลาให้สั้นลง โดยที่ผลการตรวจสอบยังสมบูรณ์และถูกต้องเชื่อถือได้ โดยเฉพาะในกรณีที่ต้องการผลเร่งด่วนเป็นการสนับสนุนการส่งออกโดยตรง

## วัสดุและวิธีการ

### ตัวอย่างอาหาร

ตัวอย่างอาหารทะเลแช่แข็งจำนวน 12,812 ตัวอย่าง จากโรงงานผลิตอาหารที่ส่งตรวจวิเคราะห์เพื่อขอหนังสือรับรองคุณภาพ (Health Certificate) ประกอบด้วย กุ้ง ปลาหมึก ปลาและไขปลา หอย อาหารทะเลรวมและปู จำนวน 3,481 2,542 6,430 190 41 และ 128 ตัวอย่างตามลำดับ

### วัสดุอุปกรณ์

Incubator (35°C), Water bath (45.5 ± 0.2°C), Test tube, Durham tube, PH meter, Petri dish, Pipette, Loop, Needle

### อาหารเลี้ยงเชื้อ

Lauryl sulfate tryptose broth (LST), EC broth, 1% Tryptone broth (TB), Eosin methylene blue agar (EMB), Simmons citrate agar, Methyl red - Vogesproskauer medium (MR- VP)

### Reagents

IMVIC Test Reagents

### เชื้ออ้างอิง

*Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13078

**วิธีการ**

ศึกษาเปรียบเทียบการตรวจสอบ *Escherichia coli* ในอาหารทะเลแช่แข็งใช้วิธีการตามที่ระบุใน BAM 1998 / APHA 1992 และ ISO 12074, 1994 โดยที่ APHA 3<sup>rd</sup> edition, Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 1992 และ BAM 8<sup>th</sup> edition Food and Drug Administration, 1998 มีวิธีการวิเคราะห์

ที่เหมือนกันคือ APHA แยกเป็น 3 ขั้นตอนในการวิเคราะห์ ส่วน BAM จะรวมขั้น Complete test มาอยู่ในขั้น Confirm test และ ISO 12074, Meat and meat products - Enumeration of presumptive *Escherichia coli* - Most probable number technique, 1994 โดยวิธี MPN technique มี 3 ขั้นตอน (ตารางที่ 1)

**ตารางที่ 1 ขั้นตอนการวิเคราะห์ของ *Escherichia coli* โดยวิธี MPN technique**

ขั้นตอนในการวิเคราะห์	ISO 12074, 1994	BAM 1998 / APHA 1992
1. Presumptive test	✓	✓
1.1 Lauryl sulfate tryptose broth (LST)		
2. Confirm test	✓	✓
2.1 EC broth		
2.2 1% Tryptone broth (TB)		
3. Complete test	-	✓
3.1 Eosin methylene blue agar (EMB)		
3.2 1% Tryptone broth (TB)		
3.3 Methyl red broth (MR)		
3.4 Voges - Proskauer broth (VP)		
3.5 Simmons citrate agar		

✓ = ใช้ในขั้นตอนวิเคราะห์      - = ไม่ใช้

**ผล**

ผลการศึกษาในตัวอย่างอาหารทะเลแช่แข็งจำนวน 12,812 ตัวอย่าง ประกอบด้วย กุ้ง ปลาหมึก ปลาและไข่ปลา หอย อาหารทะเลรวมและปู จำนวน 3,481 2,542 6,430 190 41 และ 128 ตัวอย่าง ตามลำดับ (ตารางที่ 2) และเปรียบเทียบจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกและผลลบจากการวิเคราะห์ *Escherichia coli* โดยใช้ ISO 12074, 1994, BAM 1998/APHA 1992 และ ISO 12074, 1994 บวก Simmons citrate agar (ตารางที่ 3)

1. เปรียบเทียบคุณสมบัติของการวิเคราะห์โดยใช้ ISO 12074, 1994, BAM 1998/APHA 1992 และ ISO 12074, 1994 บวก Simmons citrate agar

1.1 ความไวของการทดสอบ (Sensitivity) หมายถึงความสามารถของวิธีวิเคราะห์ในการตรวจตัวอย่างที่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่ได้อย่างถูกต้อง คือร้อยละของตัวอย่างที่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่และให้ผลบวก  $[(a/a+c) \times 100]$  (สำนักงานกิจ ต. 2527, โล่ห์สุนทร พ. 2531)

1.2 ความจำเพาะของการทดสอบ (Specificity)

หมายถึงความสามารถของวิธีวิเคราะห์ในการตรวจตัวอย่างที่ไม่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่ได้อย่างถูกต้อง คือ ร้อยละของตัวอย่างที่ไม่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่และให้ผลลบ [(d / b+d)X100] (ขำนาการกิจ ต. 2527, โฉ้ห้สุนทร พ. 2531)

1.3 ความแม่นยำของการทดสอบ (Accuracy)

หมายถึงความสามารถของวิธีวิเคราะห์ในการตรวจตัวอย่างที่มี และไม่มีเชื้อได้อย่างถูกต้อง คือร้อยละ ที่แสดงถึงประสิทธิภาพของการทดสอบ [(a+d / a+b+c+d)X100] (ขำนาการกิจ ต. 2527, โฉ้ห้สุนทร พ. 2531) (ตารางที่ 4)

**ตารางที่ 2 ผลการปนเปื้อนของ *Escherichia coli* ในอาหารทะเลแช่แข็งในขั้นตอน confirm test และ complete test**

Product	No. of Sample	ISO 12074,1994		BAM 1998 / APHA 1992						
		Confirm test		Complete test						
		Positive	Negative	Positive	Negative	IMViC test (positive)				
						Indole	MR	VP	Citrate	
<b>Shrimps</b>										
Raw shrimp	2,641	74	2,567	72	2	74	74	74	72	
Cooked shrimp	571	10	561	10	N	10	10	10	10	
Precooked shrimp	268	16	252	15	1	16	16	16	15	
Cooked value added shrimp	1	1	N	1	N	1	1	1	1	
Total	3,481	101	3,380	98	3	101	101	101	98	
Percent of total	100%	2.90%	97.10%	2.81%	0.09%	100%	100%	100%	2.81%	
<b>Cuttlefish, Squid, Octopus</b>										
Raw	1,812	28	1,784	27	1	28	28	28	27	
Cooked	332	2	330	2	N	2	2	2	2	
Precooked	225	3	252	3	N	3	3	3	3	
Ready to eat	143	1	142	1	N	1	1	1	1	
Total	2,542	34	2,508	33	1	34	34	34	33	
Percent of total	100%	1.34%	98.66%	1.30%	0.04%	100%	100%	100%	1.30%	
<b>Fishes, Fish eggs</b>										
Raw whole fish	1,857	110	1,747	108	2	110	110	110	108	
Raw processed fish	4,179	207	3,972	204	3	207	207	207	204	
Cooked fish	68	1	67	1	N	1	1	1	1	
Precooked fish	261	6	255	6	N	6	6	6	6	
Ready to eat	29	1	28	1	N	1	1	1	1	
Raw value added fish	9	2	7	2	N	2	2	2	2	
Cooked value added fish, fish egg	27	1	26	1	N	1	1	1	1	
Total	6,430	328	6,102	323	5	328	328	328	323	
Percent of total	100%	5.10%	94.90%	5.02%	0.08%	100%	100%	100%	5.02%	
<b>Shells</b>										
Raw shell	19	6	13	5	1	6	6	6	5	
Cooked shell	171	14	167	4	N	4	4	4	4	
Total	190	10	180	9	1	10	10	10	9	
Percent of total	100%	5.26%	94.74%	4.74%	0.52%	100%	100%	100%	4.74%	

**ตารางที่ 2 ผลการปนเปื้อนของ *Escherichia coli* ในอาหารทะเลแช่แข็งในขั้นตอน confirm test และ complete test (ต่อ)**

Product	No. of Sample	ISO 12074,1994		BAM 1998 / APHA 1992					
		Confirm test		Complete test					
		Positive	Negative	Positive	Negative	IMViC test (positive)			
						Indole	MR	VP	Citrate
<b>Mixed seafood</b>									
Cooked mix seafood	41	1	40	1	N	1	1	1	1
Percent of total	100%	2.44%	97.56%	2.44%	-	100%	100%	100%	2.44%
<b>Crabs</b>									
Raw crab	69	2	67	2	N	2	2	2	2
Cooked crab	59	1	58	1	N	1	1	1	1
Total	128	3	125	3	N	3	3	3	3
Percent of total	100%	2.34%	97.66%	2.34%	-	100%	100%	100%	2.34%
<b>Total</b>	12,812	477	12,335	467	10	477	477	477	467
<b>Percent of total</b>	100%	3.72%	96.28%	3.64%	0.08%	100%	100%	100%	3.64%

N = nil

BAM 1998 = AOAC International . FDA Bacteriological Analytical Manual 8<sup>th</sup> edition, Revision A

APHA 1992 = Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 3<sup>rd</sup> edition, American Public Health Association, Washington DC

ISO 12074 , 1994 = Meat and meat products - Enumeration of presumptive *Escherichia coli* - Most probable number technique.

**ตารางที่ 3 เปรียบเทียบจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกและผลลบจากการวิเคราะห์ *Escherichia coli* โดยใช้ ISO 12074, 1994, BAM 1998/APHA 1992 และ ISO 12074,1994 บวก Simmons citrate agar**

		ISO 12074,1994		ISO 12074,1994 บวก Simmons citrate agar	
		(a)	(b)	(a)	(b)
ISO 12074,1994	ผลบวก	467	10	467	-
	ผลลบ	-	12,335	-	12,345
		(c)	(d)	(c)	(d)
BAM 1998/APHA 1992		BAM 1998/APHA 1992		BAM 1998/APHA 1992	
		(a+c)	(b+d)	(a+c)	(b+d)
BAM 1998/APHA 1992	ผลบวก	467	-	467	-
	ผลลบ	-	12,345	-	12,345
		(a+c)	(b+d)	(a+c)	(b+d)

a = True Position

b = False Position

c = False Negative

d = True Negative

a+c = Total True Position

b+d = Total True Negative

a+b+c+d = Total Samples

**ตารางที่ 4 คุณสมบัติของการวิเคราะห์ *Escherichia coli* โดยใช้ ISO 12074, 1994, BAM 1998/ APHA 1992 และ ISO 12074,1994 บวก Simmons citrate agar**

คุณสมบัติของการวิเคราะห์	ISO 12074,1994	BAM 1998 / APHA 1992	ISO12074,1994 บวก Simmons citrate agar
ความไวของการวิเคราะห์ (Sensitivity) [(a /a+c)X100]	100%	100%	100%
ความจำเพาะของการวิเคราะห์ (Specificity) [(d /b+d)X100]	99.92%	100%	100%
ความแม่นยำของการวิเคราะห์ (Accuracy) [(a+d /a+b+c+d)X100]	99.92%	100%	100%

### วิจารณ์

จากตัวอย่างอาหารทะเลแช่แข็งที่ตรวจวิเคราะห์ เพื่อขอหนังสือรับรองคุณภาพไปประเทศต่างๆ จำนวน 12,812 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2) ประกอบด้วย กุ้ง ปลาหมึก ปลาและไข่ปลา หอย อาหารทะเลรวมและปู จากการศึกษาระดับ Confirm test (ISO 12074,1994) ให้ผลบวก 477 ตัวอย่าง (ร้อยละ 3.72) และชั้น Complete test (BAM 1998 / APHA 1992) ให้ผลบวก 467 ตัวอย่าง (ร้อยละ 3.64) ของ

อาหารทะเลแช่แข็งทั้งหมด ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างที่น้อยมากโดย MR - VP test (Methyl red - Vogesproskauer) ให้ผลบวก 477 ตัวอย่าง (ร้อยละ 100) ไม่มีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างอาจจะไม่ต้องนำมาทดสอบแต่ Simmons citrate ให้ผลบวก 467 ตัวอย่าง (ร้อยละ 3.64) มีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง คณะผู้ทำการวิจัยขอแนะนำควรใช้ ISO 12074,1994 บวก Simmons citrate (ตารางที่ 5)

**ตารางที่ 5 จากผลการศึกษาเปรียบเทียบโดยใช้ ISO 12074, 1994 และ BAM 1998 / APHA 1992 และ ISO 12074, 1994 บวก Simmons citrate agar**

ข้อมูลการศึกษา	ISO 12074, 1994	BAM 1998 / APHA1992	ISO 12074,1994 บวก Simmons citrate agar
เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์	5 วัน	8-10 วัน	5-7 วัน
ต้นทุนอาหารเลี้ยงเชื้อ/1 ตัวอย่าง	12.19 บาท	36.35 บาท	34.12 บาท

### สรุป

จากผลการศึกษาระดับการวิเคราะห์ *Escherichia coli* ชั้น Complete test ยังมีความสำคัญอยู่แต่จะใช้เวลานาน 8-10 วัน สำหรับทางเลือกโดยเพิ่ม Simmons citrate มาทดสอบในชั้น Confirm

test จะใช้เวลาเพียง 5-7 วัน ซึ่งจะช่วยประหยัดเวลาค่าใช้จ่ายต่างๆ และแรงงาน โดยยังคงรักษาความถูกต้องของผลการวิเคราะห์ทำให้การส่งออกเป็นไปได้อย่างรวดเร็วมีประสิทธิภาพทันต่อความต้องการของประเทศคู่ค้า เพื่อช่วยเศรษฐกิจของประเทศโดยรวม

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณเพ็ญศรี รอดมา ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านสุขลักษณะการผลิต ที่ได้สนับสนุนให้คำปรึกษา แนะนำ และแก้ไขให้งานลุล่วงไปด้วยดี

## เอกสารอ้างอิง

ชำนาญการกิจ ต. สถิติประยุกต์ทางการแพทย์ ภาควิชาเวชศาสตร์ป้องกันสังคม คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2527: 136 -143

โล่ห์สุนทร พ. การทดสอบเพื่อตรวจคัดโรคและวินิจฉัยโรควิทยาการระบาดประยุกต์ ภาควิชาเวชศาสตร์ป้องกันและสังคม คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2531 : 17 - 25

สุดเขียรกุล อ.ความก้าวหน้าในการตรวจสอบหาเชื้อ *E.coli* 0157 : H7 คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 1997 : 1-2, 9

AOAC International. FDA Bacteriological Analytical Manual 8<sup>th</sup> edition, Revision A, 1998: 4.01 - 4.06

Carl Vanerzant and Don F. splittstoesser. APHA Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 3<sup>rd</sup> edition, American Public Health Association, Washington DC, 1992 : 327 - 337, 340 - 341

International Standard ISO/DIS 12074, Meat and meat products - Enumeration of presumptive *Escherichia coli* - Most probable number technique, 1994