การศึกษาการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Escherichia coli* ที่คัดแยกจากตัวอย่างน้ำในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย

ชนิดา แซ่โค้ว และ วรัญญา เพชรมณี*

ศูนย์บริการตรวจสอบและรับรองมาตรฐาน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90110

อีเมลผู้ประพันธ์บรรณกิจ: warunya.p@psu.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Escherichia coli* (*E. coli*) ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำประเภทต่างๆ ในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย โดยตรวจหาเชื้อ *E. coli* จากตัวอย่างน้ำด้วยวิธี multiple-tube fermentation technique แยกและจัดจำแนกเชื้อด้วยการย้อมสีแกรมและทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี แล้วนำเชื้อที่ได้มาทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ 6 ชนิด ได้แก่ ampicillin, cefuroxime, ertapenem, gentamycin, ciprofloxacin และ tetracycline ด้วยวิธี disk diffusion โดยสามารถพบเชื้อ *E. coli* ได้ 37 ตัวอย่าง จากตัวอย่างน้ำ 13 จังหวัดรวม 702 ตัวอย่าง (ร้อยละ 5.3) เป็นเชื้อจากตัวอย่างน้ำทิ้งมากที่สุดร้อยละ 21.6 รองลงมา คือ น้ำใช้และน้ำดื่ม ร้อยละ 5.0 และ 4.0 ตามลำดับ นำมาแยกและยืนยันเชื้อได้ 37 ไอโซเลท เมื่อทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะพบเชื้อดื้อต่อยาอย่างน้อย 1 ชนิด ร้อยละ 18.9 เป็นเชื้อจากตัวอย่างน้ำดื่ม น้ำใช้ในฟาร์มสุกร น้ำใช้ในโรงฆ่าสัตว์และน้ำทิ้งจากโรงพยาบาล โดยดื้อต่อยา tetracycline มากที่สุดร้อยละ 18.9 รองลงมา คือ ampicillin ร้อยละ 13.5 และ gentamycin ร้อยละ 2.7 ตามลำดับ เป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาชนิดเดียว คือ tetracycline ร้อยละ 5.4 ดื้อต่อยา 2 ชนิดร่วมกัน คือ ampicillin และ tetracycline ร้อยละ 10.8 และดื้อต่อยา 3 ชนิดร่วมกัน คือ ampicillin, gentamycin และ tetracycline ร้อยละ 2.7 ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันได้ว่าน้ำเป็นแหล่งของเชื้อ *E. coli* ดื้อยาปฏิชีวนะ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมด้านพันธุกรรมของเชื้อเพื่อเป็นแนวทางในการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาไม่ให้เกิดการแพร่กระจายไปยังมนุษย์ สัตว์และสิ่งแวดล้อมต่างๆ ต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: *Escherichia coli*; น้ำ; การดื้อยาปฏิชีวนะ

A Study of Antibiotic Resistant in *Escherichia coli* Isolated from Water Samples from Southern Thailand

Chanida Saekow and Warunya Phetmanee*

Center of Measurement and Standard Accreditation, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla 90110, Thailand

***Corresponding author's e-mail: warunya.p@psu.ac.th**

Abstract

This research aimed to study the antibiotic resistance of *Escherichia coli* (*E. coli*) strains isolated from water samples in Southern Thailand. *E. coli* was detected form water samples with the multiple-tube fermentation technique. Isolation and identification of *E. coli* were performed using gram staining and biochemical tests. The *E. coli* cultures were then tested for susceptibility to six antibiotics: ampicillin, cefuroxime, ertapenem, gentamycin, ciprofloxacin and tetracycline using the disk diffusion method. A total of 37 *E. coli* samples were found from 702 water samples collected across 13 Southern provinces (5.3 %). Wastewater exhibited the highest prevalence of *E. coli* at 21.6 %, followed by domestic use water at 5.0 % and drinking water at 4.0 %. Thirty-seven *E. coli* isolates were identified. Antibiotic susceptibility testing revealed that 18.9 % of *E. coli* strains were resistant to at least one antibiotic. These resistant strains were found in drinking water, pig farm water, slaughterhouse water, and hospital wastewater. Tetracycline demonstrated the highest resistance rate at 18.9 %, followed by ampicillin at 13.5 % and gentamicin at 2.7 %. The resistant strains exhibited resistance to one antibiotic (tetracycline, 5.4 %), two antibiotics (ampicillin and tetracycline, 10.8 %) and three antibiotics (ampicillin, gentamicin, and tetracycline, 2.7 %). Therefore, it can be concluded that water is a source of antibiotic-resistant *E. coli*. However, further genetic studies are needed to monitor the spread of antibiotic resistance to humans, animals and the environment.

Keywords: *Escherichia coli*; Water; Antibiotic resistant

บทนำ

การดื้อยาปฏิชีวนะเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขที่สำคัญในทุกประเทศทั่วโลก โดยส่งผลกระทบต่อมนุษย์ สัตว์และสิ่งแวดล้อม สำหรับประเทศไทยมีผู้ป่วยติดเชื้อดื้อยาปีละมากกว่า 100,000 ราย และเสียชีวิตมากกว่า 30,000 ราย (วิษณุ ธรรมลิขิตกุล, 2565) ปัจจัยสำคัญที่ทำให้แบคทีเรียดื้อยาเกิดจากการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างไม่เหมาะสมในมนุษย์และสัตว์ รวมทั้งการปล่อยน้ำทิ้งที่มีการตกค้างของยาปฏิชีวนะความเข้มข้นสูงออกสู่สิ่งแวดล้อม (Niegowska et al., 2021) ซึ่งจะไปกระตุ้นให้เชื้อแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมปรับตัวดื้อต่อยา ทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาจากคนและสัตว์ผ่านการสัมผัสใกล้ชิดหรืออาจมีการปนเปื้อนของเชื้อผ่านทางอาหาร น้ำและสิ่งแวดล้อม ทั้งนี้พบว่าเชื้อ *E. coli* เป็นแบคทีเรียที่พบการดื้อยาได้บ่อยและเป็นหนึ่งในแบคทีเรียที่กระทรวงสาธารณสุขเฝ้าระวังการดื้อยาเช่นเดียวกับที่องค์การอนามัยโลกได้ระบุว่าเป็นเชื้อดื้อยาหนึ่งที่คุกคามต่อสุขภาพของมนุษย์

E. coli เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง ไม่สร้างสปอร์ ดำรงชีวิตได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) จัดเป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นในอุจจาระของคนและสัตว์เลือดอุ่นโดยไม่ก่อให้เกิดโรค แต่มีบางสายพันธุ์ที่ก่อโรคในคนและสัตว์ในหลายระบบของร่างกาย หากพบ *E. coli* ในแหล่งน้ำจะเป็นการบ่งชี้ถึงการปนเปื้อนของอุจจาระและมีความเป็นไปได้ที่จะมีเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารอื่นๆ ปนเปื้อนในน้ำด้วย ทั้งนี้มีการรายงานการพบ *E. coli* ดื้อยารวมทั้งยีนดื้อยาจากแหล่งน้ำต่างๆ เช่น น้ำดื่ม น้ำผิวดินและน้ำเสีย (Daly et al., 2023; Ferro et al., 2024; Haberecht et al., 2019) จึงอาจกล่าวได้ว่าน้ำเป็นแหล่งของ *E. coli* ดื้อยาปฏิชีวนะ

ปัจจุบันปัญหาของ *E. coli* ดื้อยาที่มีรายงานกันมากในไทยส่วนใหญ่เป็นรายงานการพบเชื้อจากผู้ป่วยในโรงพยาบาล เนื่องจากเกิดปัญหาในระหว่างการรักษาและเมื่อเปรียบเทียบกับรายงาน *E. coli* ดื้อยาในแหล่งน้ำต่างๆ พบว่ายังมีไม่มากนัก ดังนั้น ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษา *E. coli* ดื้อยาปฏิชีวนะจากตัวอย่างน้ำประเภทต่างๆ ในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ส่งมาตรวจคุณภาพน้ำด้านจุลินทรีย์ยังศูนย์บริการตรวจสอบและรับรองมาตรฐาน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับใช้เป็นข้อมูลในการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาในน้ำเพื่อไม่ให้เกิดการแพร่กระจายไปยังมนุษย์ สัตว์และสิ่งแวดล้อมต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

1) เพื่อตรวจหาเชื้อ *Escherichia coli* จากตัวอย่างน้ำประเภทต่างๆ ในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย

2) เพื่อทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะของ *Escherichia coli* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำประเภทต่างๆ ในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย

ระเบียบวิธีวิจัย

เครื่องมือ วัสดุและอุปกรณ์

- ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
- หลอด UV 365 nm พร้อมกล่องมืด
- กล้องจุลทรรศน์
- เวอร์เนียคาลิปเปอร์
- ปิเปตแก้วขนาด 1 mL และ 10 mL
- หลอดทดลองขนาด 20x150 mm และ 16x150 mm พร้อมฝา
- หลอดดักแก๊สขนาด 6x50 mm
- จานเพาะเชื้อแก้วขนาด 90x15 mm
- ห่วงและเข็มถ่ายเชื้อ
- ไม้พันสำลี
- แผ่นสไลด์ขนาด 25.4x76.2 mm
- ปากคีบ
- แผ่นยาปฏิชีวนะ: Ampicillin 10 µg, Cefuroxime 30 µg, Ertapenem 10 µg, Gentamycin 10 µg, Ciprofloxacin 5 µg, Tetracycline 30 µg

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

- Lauryl tryptose broth (LST)
- 0.1 % peptone
- EC-MUG broth
- Eosin Methylene Blue (EMB)
- Trypticase soy agar (TSA)
- Mueller Hinton Broth (MHB)
- Mueller Hinton Agar (MHA)
- IMViC test & reagent
- 0.85 % NaCl
- 0.5 McFarland standard
- ชุดน้ำยาย้อมสีแกรม

เชื้ออ้างอิงมาตรฐาน: *Escherichia coli* ATCC 25922

ตัวอย่างน้ำ: ตัวอย่างน้ำส่งตรวจจากพื้นภาคใต้ของประเทศไทย ภายในเดือนกรกฎาคม 2565 - มกราคม 2566

วิธีการทดลอง

การตรวจหาเชื้อ *Escherichia coli* จากตัวอย่างน้ำด้วยวิธี Multiple-tube Fermentation Technique (American Public Health Association, American Water Works Association & Water Environment Federation, 2017)

Presumptive test

ตัวอย่างน้ำดื่มให้ทดสอบ MPN แบบ 10 mL 10 หลอด สำหรับตัวอย่างน้ำใช้และน้ำทิ้งให้ทดสอบ MPN แบบ 5-5-5 กล่าวคือ เขย่าขวดตัวอย่างขึ้นลง 25 ครั้ง ใช้ปิเปตปราศจากเชื้อดูดตัวอย่างน้ำดื่มใส่ใน Double strength LST 10 หลอด หลอดละ 10 mL เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±0.5 °C เป็นเวลา 24±2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ทำการอ่านผล โดยหลอดที่มีเชื้อเจริญและมีแก๊สในหลอดดักแก๊ส แสดงว่าให้ผลบวก ส่วนหลอดที่ไม่มีการเจริญให้บ่มต่อจนครบ 48±3 ชั่วโมง แล้วอ่านผลใหม่อีกครั้ง นำหลอดที่มีการเจริญเพียงอย่างเดียวและหลอดที่มีการเจริญร่วมกับการสร้างแก๊สไปทดสอบต่อในขั้น confirmed test สำหรับตัวอย่างน้ำใช้และน้ำทิ้งให้ดูดตัวอย่าง 10 mL ใส่ในหลอด Double strength LST 5 หลอด ดูดตัวอย่าง 1 mL ใส่ในหลอด single strength LST 5 หลอด และดูดตัวอย่าง 0.1 mL ใส่ใน single strength LST 5 หลอด (ตัวอย่างที่คาดว่าจะตรวจพบเชื้อได้จำนวนมาก สามารถทำการเจือจางด้วย 0.1 % peptone ในระดับความเจือจางที่เหมาะสม) บ่มและอ่านผลเช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำดื่ม

Confirmed test

ถ่ายเชื้อจากหลอดที่ให้ผลบวกจากขั้น presumptive test ด้วยห่วงถ่ายเชื้อลงในอาหาร EC-MUG broth นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 44.5 ± 0.2 °C เป็นเวลา 24±2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา อ่านผลโดยหลอดที่มีการเจริญ มีแก๊สในหลอดดักแก๊สและเรืองแสงฟลูออเรสเซ็นต์ภายใต้ UV แสดงว่ามีเชื้อ *E. coli* แปลผลจากจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกตามตาราง MPN Index ในหน่วย MPN/100 mL

การแยกและตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อ *Escherichia coli*

streak เชื้อจากอาหาร EC-MUG broth ที่พบ *E. coli* ลงบนอาหาร EMB agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาให้เลือกโคโลนีลักษณะสีเขียวเข้ม มีประกายเงาโลหะ โดยเลือก 1 โคโลนีต่อ 1 ตัวอย่าง มา streak ลงบนอาหาร TSA จนได้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วนำไปตรวจสอบคุณสมบัติการติดสีแกรมและคุณสมบัติทางชีวเคมีดังนี้

ตรวจสอบการติดสีแกรมด้วยการย้อมแกรม (Gram's stain)

เขี่ยโคโลนีของเชื้อมาเกลี่ยผสมกับ 0.85% NaCl บนแผ่นสไลด์ วางทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำไปผ่านเปลวไฟเล็กน้อย หยดสารละลาย crystal violet ให้ท่วมรอยเกลี่ย ทิ้งไว้ 1 นาที เทสีออกแล้วล้างด้วยน้ำสะอาด หยดสารละลาย iodine ให้ท่วม ทิ้งไว้ 1 นาที เทออกแล้วล้างด้วยน้ำสะอาด ล้างสีด้วย decolorizer 5-10 วินาที แล้วล้างด้วยน้ำสะอาด ก่อนย้อมทับด้วยสารละลาย safranin 30 วินาที ล้างด้วยน้ำสะอาด ซับแผ่นสไลด์เบาๆ ด้วยกระดาษชำระให้แห้ง แล้วนำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

ตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (Biochemical test: IMViC test)

- Indole test: เลี้ยงเชื้อใน 1 % Tryptone broth บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หยดด้วย Kovac's reagent 5-6 หยด เขย่าแล้ววางทิ้งไว้ อ่านผลโดย ผลบวก คือ เกิดวงแหวนสีแดง (red ring) ที่ผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลลบ คือ ไม่เกิดวงแหวนสีแดง (เกิดสีเหลืองของ Kovac's reagent)

- Methyl red (MR) test: เลี้ยงเชื้อใน MR–VP broth บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หยดด้วย methyl red reagent 1 - 2 หยด อ่านผลโดย ผลบวก คือ อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีแดง ผลลบ คือ อาหารเลี้ยงเชื้อมีสีเหลือง

- Voges-proskaver (VP) test: เลี้ยงเชื้อใน MR–VP broth บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หยดด้วย 5% **α**-naphthal 6 หยด เขย่าเบาๆ แล้วหยดด้วย 40 % KOH 3 หยด เขย่าให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยา 15 นาที อ่านผลโดย ผลบวก คือ อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีแดง ผลลบ คือ อาหารเลี้ยงเชื้อมีสีเหลือง

- Citrate test: streak เชื้อลงบนอาหาร simmon's citrate agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลโดย ผลบวก เชื้อเจริญ อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน ผลลบ คือ ไม่มีการเจริญ อาหารเลี้ยงเชื้อยังคงมีสีเขียวไม่เปลี่ยนแปลง

การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Escherichia coli* ด้วยวิธี disk diffusion (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020)

การเตรียมเชื้อเพื่อใช้ทดสอบ

เลี้ยงเชื้อ *E. coli* บนอาหาร TSA บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเขี่ยโคโลนีของเชื้อลงในอาหาร MHB นำไปบ่มที่ 35 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำไปปรับความขุ่นของเชื้อให้ได้ 0.5 McFarland standard ด้วย 0.85 % NaCl จะได้เชื้อประมาณ 1.5×10^8 CFU/mL

การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

ใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อจุ่มเชื้อทดสอบที่ปรับความขุ่นแล้ว กดปลายสำลีกับข้างหลอด นำไปเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร MHA 3 ระนาบ ให้เชื้อกระจายสม่ำเสมอ รอให้ผิวหน้าอาหารแห้ง จากนั้นใช้ปากคีบที่ฆ่าเชื้อแล้วคีบแผ่นยาปฏิชีวะ 6 ชนิด คือ ampicillin 10 µg, cefuroxime 30 µg, ertapenem 10 µg, gentamycin 10 µg, ciprofloxacin 5 µg และ tetracycline 30 µg วางบนอาหาร MHA ที่เกลี่ยเชื้อแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็น เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (inhibition zone) ด้วยเวอร์เนียคาลิปเปอร์ นำไปแปลผลตามตารางแปลผล Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (CLSI, 2020) และรายงานผลเป็น ดื้อยา (resistance), ไวปานกลาง (intermediate) หรือ ไวต่อยา (sensitive) โดยใช้ *E. coli* ATCC 25922 ซึ่งเป็นเชื้อที่ไวต่อยาเป็นชุดควบคุม

ผลการวิจัย

การตรวจหาเชื้อ *Escherichia coli* จากตัวอย่างน้ำ

ตรวจหาเชื้อ *E. coli* จากตัวอย่างน้ำประเภทต่างๆ ในพื้นที่ภาคใต้ 13 จังหวัด จำนวน 702 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างประเภทน้ำดื่มมากที่สุด รองลงมา คือ น้ำใช้และน้ำทิ้งตามลำดับ สามารถตรวจพบเชื้อ *E.coli* ได้ทั้งหมด 37 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 5.3 โดยพบเชื้อ *E. coli* จากตัวอย่างน้ำทิ้งมากที่สุด คือ 8 ตัวอย่างจากทั้งหมด 37 ตัวอย่าง (ร้อยละ 21.6) รองลงมา คือ น้ำใช้ 11 ตัวอย่างจาก 219 ตัวอย่าง (ร้อยละ 5.0) และพบในตัวอย่างน้ำดื่มน้อยที่สุด 18 ตัวอย่างจากทั้งหมด 446 ตัวอย่าง (ร้อยละ 4.0) ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยสามารถพบ *E.coli* ได้ในปริมาณ 1.1 ถึง >16,000 MPN/100 mL ปริมาณเชื้อต่ำสุดพบได้จากตัวอย่างน้ำดื่มและปริมาณเชื้อสูงสุดพบได้จากตัวอย่างน้ำทิ้ง

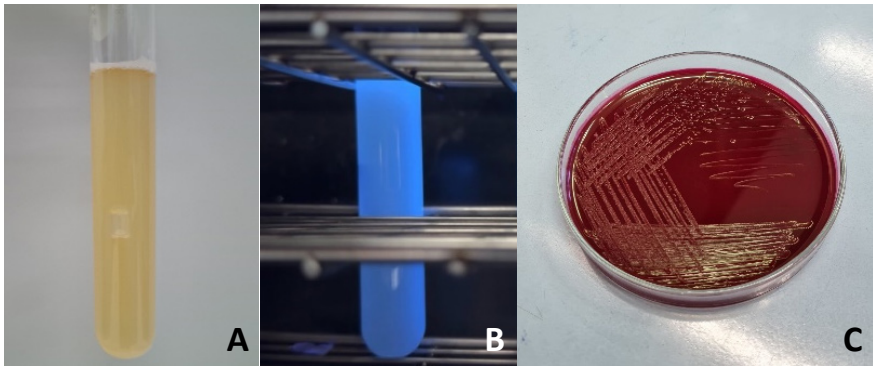
ตารางที่ 1 จำนวนตัวอย่างน้ำประเภทต่างๆ ในการตรวจหาเชื้อ *Escherichia coli*

จังหวัด	น้ำดื่ม	น้ำใช้	น้ำทิ้ง	รวม
นครศรีธรรมราช	67(1)	40	0	107(1)
สงขลา	253(11)	56(7)	8(1)	317(19)
ภูเก็ต	0	0	7(2)	7(2)
สตูล	7	6(1)	0	13(1)
นราธิวาส	26(1)	7(1)	20(4)	53(6)
พัทลุง	80(4)	81	2(1)	163(5)
ยะลา	3	0	0	3
สุราษฎร์ธานี	0	1	0	1
กระบี่	0	1	0	1
พังงา	1	3	0	4
ตรัง	2	13(1)	0	15(1)
ปัตตานี	2	1(1)	0	3(1)
ชุมพร	5(1)	10	0	15(1)
รวม	**446(18)**	**219(11)**	**37(8)**	**702(37)**

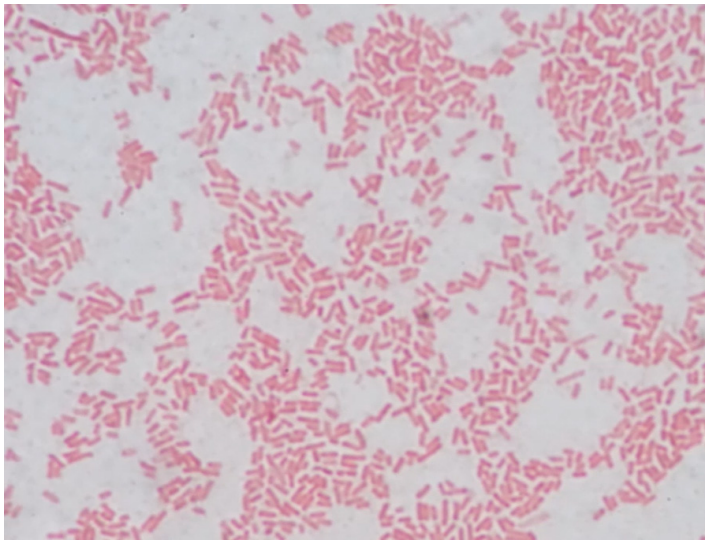
หมายเหตุ ภายใน ( ) คือ จำนวนตัวอย่างที่พบเชื้อ *E. coli*

การแยกและตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อ *Escherichia coli*

เมื่อนำหลอดอาหาร EC-MUG broth ที่ให้ผลบวก (ภาพที่ 1A และ 1B) ทั้ง 37 ตัวอย่างมา streak ลงบน EMB พบโคโลนีลักษณะสีเขียวเข้ม มีประกายเงาโลหะ (ภาพที่ 1C) ซึ่งเป็นลักษณะโคโลนีของ เชื้อ *E. coli* เลือกโคโลนีดังกล่าวมาเลี้ยงบนอาหาร TSA จนได้เชื้อบริสุทธิ์ 37 ไอโซเลท และนำมาย้อมสีแกรมพบว่าทุกไอโซเลทเป็นเชื้อแกรมลบ รูปแท่ง เรียงตัวกระจัดกระจายเป็นเซลล์เดี่ยว ดังแสดงในภาพที่ 2 เมื่อนำมาทดสอบ IMViC ให้ผลการทดสอบเป็น + + - - ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ *E. coli* ดังนั้นจึงยืนยันเชื้อได้ว่าเป็น *E. coli* ทั้งหมด



ภาพที่ 1 ลักษณะการเจริญของเชื้อ *E. coli* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ EC-MUG broth และ EMB
A: อาหาร EC-MUG broth ขุ่น มีแก๊สในหลอดดักแก๊ส
B: อาหาร EC-MUG broth เรืองแสงฟลูออเรสเซ็นต์ ภายใต้แสง UV 365 nm
C: โคโลนีลักษณะสีเขียวเข้ม มีประกายเงาโลหะบนอาหาร EMB



ภาพที่ 2 ลักษณะ *E. coli* จากการย้อมสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000 เท่า

การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Escherichia coli*

จากการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *E. coli* พบว่าเชื้อส่วนใหญ่ไวต่อยาปฏิชีวนะทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบซึ่งมีจำนวน 27 ไอโซเลท พบเชื้อไวปานกลางต่อยา ampicillin และ ciprofloxacin 3 ไอโซเลทและ 1 ไอโซเลทตามลำดับ และพบเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 1 ชนิดจำนวน 7 ไอโซเลท ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Escherichia coli* (แสดงเฉพาะเชื้อที่ให้ผลไวปานกลางและดื้อต่อยา)

No.	Code	ประเภทตัวอย่าง	จังหวัด	AMP	CXM	ETP	CN	CIP	TE
1	*E.coli* 014	น้ำใช้	สงขลา	**R**	S	S	S	S	**R**
2	*E.coli* 016	น้ำทิ้ง	นราธิวาส	**R**	S	S	S	S	**R**
3	*E.coli* 021	น้ำใช้	พัทลุง	**R**	S	S	**R**	**I**	**R**
4	*E.coli* 022	น้ำดื่ม	สงขลา	S	S	S	S	S	**R**
5	*E.coli* 025	น้ำดื่ม	สงขลา	**R**	S	S	S	S	**R**
6	*E.coli* 027	น้ำดื่ม	สงขลา	**I**	S	S	S	S	S
7	*E.coli* 029	น้ำดื่ม	สงขลา	**I**	S	S	S	S	S
8	*E.coli* 031	น้ำทิ้ง	พัทลุง	**I**	S	S	S	S	S
9	*E.coli* 032	น้ำดื่ม	สงขลา	S	S	S	S	S	**R**
10	*E.coli* 033	น้ำใช้	ตรัง	**R**	S	S	S	S	**R**
11	*E.coli* ATCC 25922	ชุดควบคุม	-	S	S	S	S	S	S
การแปลผลความไวต่อยาปฏิชีวนะจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส (mm)			ไวต่อยา (S)	≥17	≥18	≥22	≥15	≥26	≥15
			ไวปานกลาง (I)	14 - 16	15 - 17	19 - 21	13 - 14	22 - 25	12 - 14
			ดื้อต่อยา (R)	≤13	≤14	≤18	≤12	≤21	≤11

หมายเหตุ AMP = ampicillin, CXM = cefuroxime, ETP = ertapenem, CN = gentamycin, CIP = ciprofloxacin, TE = tetracycline

โดยเชื้อดื้อยาทั้ง 7 ไอโซเลทเป็นเชื้อจากตัวอย่างน้ำดื่ม 3 ตัวอย่าง น้ำใช้ในฟาร์มสุกร 2 ตัวอย่าง น้ำใช้ในโรงฆ่าสัตว์ 1 ตัวอย่าง และน้ำทิ้งจากโรงพยาบาล 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 18.9 จากจำนวน *E. coli* ที่ตรวจพบทั้งหมด โดยดื้อต่อยา tetracycline มากที่สุด 7 ไอโซเลท (ร้อยละ 18.9) รองลงมา คือ ampicillin 5 ไอโซเลท (ร้อยละ 13.5) และ gentamycin 1 ไอโซเลท (ร้อยละ 2.7) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้มีรูปแบบความไวต่อยาปฏิชีวนะ 5 รูปแบบ ได้แก่

1. ไวต่อยาทุกชนิด 27 ไอโซเลท (ร้อยละ 72.9)
2. ไวต่อยาปานกลาง 1 ชนิด คือ ampicillin หรือ ciprofloxacin 4 ไอโซเลท (ร้อยละ 10.8)
3. ดื้อต่อยา 1 ชนิด คือ tetracycline 2 ไอโซเลท (ร้อยละ 5.4)
4. ดื้อต่อยา 2 ชนิด ร่วมกัน คือ ampicillin และ tetracycline 4 ไอโซเลท (ร้อยละ 10.8)
5. ดื้อต่อยา 3 ชนิดร่วมกันคือ ampicillin, gentamycin และ tetracycline 1 ไอโซเลท (ร้อยละ 2.7)

สรุปผลการวิจัย

ตรวจหาเชื้อ *E. coli* จากตัวอย่างน้ำประเภทต่างๆ ในพื้นที่ภาคใต้ 13 จังหวัด พบเชื้อ *E. coli* 37 ตัวอย่าง จาก 702 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 5.3 เมื่อพิจารณาประเภทตัวอย่างพบว่าสามารถพบเชื้อจากตัวอย่างน้ำทิ้งได้มากที่สุดจากจำนวนตัวอย่างน้ำทิ้งที่ส่งตรวจทั้งหมด คิดเป็นร้อยละ 21.6 รองลงมา คือ น้ำใช้และน้ำดื่ม ร้อยละ 5.0 และร้อยละ 4.0 ตามลำดับ นำมาแยกเชื้อจนได้เชื้อบริสุทธิ์ 37 ไอโซเลท เมื่อตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อพบว่าสอดคล้องกับลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ *E. coli* ทุกไอโซเลท นำเชื้อที่แยกได้มาทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ 6 ชนิด พบเชื้อดื้อยาอย่างน้อย 1 ชนิดจำนวน 7 ไอโซเลท เป็นเชื้อจากตัวอย่างน้ำดื่ม น้ำใช้ในฟาร์มสุกร น้ำใช้ในโรงฆ่าสัตว์ และน้ำทิ้งจากโรงพยาบาล คิดเป็นร้อยละ 18.9 โดยดื้อต่อยา tetracycline มากที่สุด 7 ไอโซเลท (ร้อย

ละ 18.9) รองลงมา คือ ampicillin 5 ไอโซเลท (ร้อยละ 13.5) และ gentamycin 1 ไอโซเลท (ร้อยละ 2.7) ตามลำดับ โดยเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาชนิดเดียว คือ tetracycline 2 ไอโซเลท (ร้อยละ 5.4) ดื้อต่อยา 2 ชนิด ร่วมกัน คือ ampicillin และ tetracycline 4 ไอโซเลท (ร้อยละ 10.8) และดื้อต่อยา 3 ชนิดร่วมกันคือ ampicillin, gentamycin และ tetracycline 1 ไอโซเลท (ร้อยละ 2.7)

อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการตรวจหาเชื้อ *E. coli* ในตัวอย่างน้ำประเภทต่างๆ ในพื้นที่ภาคใต้ 13 จังหวัด ส่วนใหญ่สามารถตรวจพบเชื้อได้เกือบทุกจังหวัดยกเว้นจังหวัดยะลา สุราษฎร์ธานี กระบี่และพังงา เนื่องจากจำนวนตัวอย่างที่ส่งตรวจมีน้อยจึงมีโอกาสที่จะตรวจไม่พบเชื้อ ทั้งนี้สามารถตรวจพบเชื้อ *E. coli* ได้ 37 ตัวอย่าง มีค่า MPN ในช่วง 1.1 ถึง >16,000 MPN/100 mL เป็นตัวอย่างน้ำดื่มและน้ำใช้รวม 29 ตัวอย่าง ซึ่งถือว่าไม่ผ่านเกณฑ์คุณภาพน้ำดื่ม (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข, 2524) และน้ำใช้ในฟาร์ม (ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2558) ที่ต้องตรวจไม่พบ *E. coli* และมีน้ำทิ้ง 4 ตัวอย่างจาก 8 ตัวอย่าง ที่ไม่ผ่านเกณฑ์คุณภาพน้ำทิ้ง (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข, 2561) ซึ่งกำหนดปริมาณ *E. coli* ที่ตรวจพบได้ต้องน้อยกว่า 1,000 MPN/100 mL เมื่อเปรียบเทียบในตัวอย่างน้ำแต่ละประเภทพบว่าสามารถพบเชื้อ *E. coli* จากตัวอย่างน้ำทิ้งได้ในอัตราส่วนสูงที่สุดเนื่องจากเป็นน้ำที่ผ่านการใช้งานในกิจกรรมต่างๆ ของโรงงานอุตสาหกรรมหรือโรงพยาบาลจึงมีการสะสมของสารอินทรีย์ทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์สูง และพบ *E. coli* ในอัตราส่วนต่ำที่สุดได้จากน้ำดื่มเนื่องจากกระบวนการผลิตน้ำดื่มมีขั้นตอนการกำจัดเชื้อร่วมกันหลายวิธี เช่น การกรอง การใช้คลอรีน การใช้โอโซน การใช้แสงยูวี (UV) เป็นต้น

แยกเชื้อจากตัวอย่างที่พบ *E. coli* จนได้เชื้อบริสุทธิ์ 37 ไอโซเลท ตรวจยืนยันเชื้อด้วยการทดสอบสมบัติทางชีวเคมี ก่อนนำมาทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ 6 ชนิด พบเชื้อดื้อต่อยาอย่างน้อย 1 ชนิด 7 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 18.9 ซึ่งเป็นเชื้อจากตัวอย่างน้ำดื่ม น้ำใช้ในฟาร์มสุกร น้ำใช้ในโรงฆ่าสัตว์และน้ำทิ้งจากโรงพยาบาล พบการดื้อต่อยา tetracycline มากที่สุด รองลงมา คือ ampicillin และ gentamycin ตามลำดับ โดยเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาชนิดเดียว ร้อยละ 5.4 และดื้อต่อยามากกว่า 1 ชนิดร่วมกัน ร้อยละ 13.5 โดยมีการดื้อต่อยาร่วมกันสูงสุด 3 ชนิด สอดคล้องกับงานวิจัยหลายฉบับซึ่งแยก *E. coli* จากแหล่งน้ำดื่มมาทดสอบการดื้อยา พบว่าเชื้อดื้อต่อยา tetracycline ampicillin และ gentamycin สูงกว่ายาปฏิชีวนะชนิดอื่นและเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาหลายขนาน (Chen et al., 2017; Larson et al., 2019; Mahmoud et al., 2020) เช่นเดียวกับ วิไล เจียมไชยศรีและคณะ (2564) ที่ทำการศึกษาเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะจากแหล่งกำเนิดน้ำเสียประเภทโรงพยาบาลและฟาร์มสุกรพบยีน *E. coli* ดื้อยา ampicillin มากที่สุดรองลงมา คือ tetracycline ทั้งนี้พบว่ายา tetracycline ampicillin และ gentamycin เป็นยาปฏิชีวนะที่มีการใช้งานมาอย่างช้านานทำให้พบเชื้อดื้อยาได้มาก โดยเฉพาะยา tetracycline ซึ่งมีขอบเขตการออกฤทธิ์กว้างจึงมีการใช้อย่างแพร่หลาย ส่งผลให้เกิดการดื้อยามากขึ้น โดยมีกลไกการดื้อยาที่พบบ่อยคือการสร้าง efflux pump เพื่อขับยาออกจากเซลล์และสร้าง ribosomal protection protein เพื่อป้องกันยาจับกับ ribosome ของเชื้อ ยาจึงไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ (ปาจรีย์ ศรีอุทธา, 2565) การดื้อยา Ampicillin ซึ่งเป็นยา กลุ่ม beta-lactams เกิดจากการสร้างเอนไซม์ beta-lactamases โดยเฉพาะเอนไซม์ extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) มาทำลายพันธะที่เชื่อมเป็น beta-lactam ring ของยาจึงทำให้ยาถูกทำลายและเกิดการดื้อยา ซึ่งการสร้างเอนไซม์ ESBL สามารถพบได้บ่อยในแบคทีเรียแกรมลบวงศ์ Enterobacteriaceae (Harris et al., 2015)

ผลจากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้ถึงการดื้อยาของเชื้อ *E. coli* จากตัวอย่างน้ำต่างๆ ในเขตภาคใต้ของประเทศไทยและเป็นหลักฐานสนับสนุนว่าน้ำเป็นแหล่งของ *E. coli* ดื้อยาปฏิชีวนะ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมด้านพันธุกรรมของเชื้อที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา เพื่อเป็นแนวทางในการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาในน้ำไม่ให้เกิดการแพร่กระจายไปยังมนุษย์ สัตว์และสิ่งแวดล้อมหรือการถ่ายทอดยีนดื้อยาไปยังเชื้ออื่นๆ ในสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะแหล่งน้ำต่างๆ ต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนักศึกษาสหกิจศึกษา คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลาสำหรับการเป็นผู้ช่วยวิจัยและขอขอบคุณศูนย์บริการตรวจสอบและรับรองมาตรฐาน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือและวัสดุ อุปกรณ์ต่างๆ ทำให้งานสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตร: แนวปฏิบัติในการใช้มาตรฐานสินค้าเกษตร การปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีสำหรับฟาร์มสุกร ตามพระราชบัญญัติมาตรฐานสินค้าเกษตร พ.ศ. 2551. (2558, 19 พฤศจิกายน). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 132 ตอนพิเศษ 302 ง. หน้า 8.

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง น้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท พ.ศ.2524. (2524, 24 กันยายน). ราชกิจจานุเบกษา 98 ร.จ. 52 ตอนที่ 157. หน้า 52-55.

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง กำหนดปริมาณไข่หนอนพยาธิและแบคทีเรียอีโคไล (*Escherichia coli*) และวิธีการเก็บตัวอย่างและการตรวจหาไข่หนอนพยาธิและแบคทีเรียอีโคไล (*Escherichia coli*) ในน้ำทิ้งและกากตะกอนที่ผ่านระบบกำจัดสิ่งปฏิกูลแล้ว พ.ศ. 2561. (2562, 4 มกราคม). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 136 ตอนพิเศษ 3ง. หน้า 31-32.

ปาจรีย์ ศรีอุทธา. (2565, 28 มิถุนายน). *ยากลุ่ม Tetracyclines ตัวใหม่ (Novel Tetracyclines).* https://ccpe.pharmacycouncil.org/index.php?option=article_detail&subpage=article_detail&id=1229

วิษณุ ธรรมลิขิตกุล. (2565). บทนำ. ใน ธีรศักดิ์ ชักนำ (บรรณาธิการ), *แนวทางการเฝ้าระวังและสอบสวนเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพ* (หน้า 2-12). กองระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข.

วิไล เจียมไชยศรี, ชาติ เจียมไชยศรี และพิษณุ ตุลยกุล. (2564, ตุลาคม). *โครงการการศึกษาการปนเปื้อนและการควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะจากแหล่งกำเนิดน้ำเสียประเภทโรงพยาบาลและฟาร์มสุกร*. https://kb.hsri.or.th/dspace/handle/11228/5431

American Public Health Association, American Water Works Association & Water Environment Federation. (2017). *Standard methods for the examination of water and wastewater* (23rd ed.). The Association.

Chen, Z., Yu, D., He, S., Ye, H., Zhang, L., Wen, Y., Zhang, W., Shu, L. & Chen, S. (2017). Prevalence of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in drinking water sources in Hangzhou city. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 1133.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2020). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.* The Institute.

Daly, M., Powell, J., O'Connell, N. H., Murphy, L., & Dunne, C. P. (2023). Antimicrobial resistance is prevalent in *E. coli* and other Enterobacterales isolated from public and private drinking water supplies in the Republic of Ireland. *Microorganisms*, *11*(5), 1224.

Ferro, P., Morales, E., Ticona, E., Ferró-Gonzales, P., Oblitas, A., & Ferró-Gonzáles, A. L. (2024). Water quality and phenotypic antimicrobial resistance in isolated of *E. coli* from water for human consumption in Bagua, under One Health approach. *Heliyon*, *10*(1), 1-9.

Haberecht, H. B., Nealon, N. J., Gilliland, J. R., Holder, A. V., Runyan, C., Oppel, R. C., Ibrahim. H. M., Mueller, L., Schrupp, F., Vilchez, S., Antony, L., Scaria, J., & Ryan, E. P. (2019). Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* from Environmental Waters in Northern Colorado. *Journal of Environmental and Public Health*, 2029, 3862949.

Harris, P. N., Tambyah, P. A., & Paterson, D. L. (2015). Beta-lactam and beta-lactamase inhibitor combinations in the treatment of extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae: Time for a reappraisal in the era of few antibiotic options? *The Lancet Infectious Diseases*, *15*(4), 475-485.

Larson, A., Hartinger, S. M., Riveros, M., Salmon-Mulanovich, G., Hattendorf, J., Verastegui, H., Huaylinos, M. L., & Mäusezahl, D. (2019). Antibiotic-resistant *Escherichia coli* in drinking water samples from rural Andean Households in Cajamarca, Peru. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 100*(6), 1363-1368.

Mahmoud, N. E., Altayb, H. N., & Gurashi, R. M. (2020). Detection of carbapenem-resistant genes in *Escherichia coli* isolated from drinking water in Khartoum, Sudan. *Journal of Environmental and Public Health, 2020*, 2571293.

Niegowska, M., Sanseverino, I., Navarro, A., & Lettieri, T. (2021). Knowledge gaps in the assessment of antimicrobial resistance in surface waters. *FEMS Microbiology Ecology, 97*(11), fiab140.