ความชุกของ *Salmonella* spp. ในเครื่องดื่มชานมเย็นและกาแฟเย็น จากร้านจำหน่ายรอบมหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร

Salmonella spp. Contamination in Ice Milk Tea and Ice Coffee from Refreshment Shop Around Kamphaeng Phet Rajabhat University

นิภัชราพร สภาพพร และ ปรัชญา ชะอุ่มผล

Nipatcharaporn Sapapporn[1*] and Pratya Chaumphol[2]

[1,2]**โปรแกรมวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร 62000**

[1,2]**Biology, faculty of Science and Technology, KamphaengPhet Rajabhat University, 62000**

***Corresponding Author Email: nipatchkk@kpru.ac.th**

(Received: Sept16, 2022; Revised: Nov15, 2022; Accepted: Dec14, 2022)

บทคัดย่อ

การตรวจวิเคราะห์เพื่อประเมินความชุกของ *Salmonella* spp. ในตัวอย่างชานมเย็นและกาแฟเย็นจากร้านจำหน่ายบริเวณมหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร ในระหว่างเดือนกันยายนถึงเดือนพฤศจิกายน 2562 จากผลการทดสอบทางชีวเคมีพบเชื้อ *Salmonella* spp. ทั้งหมด 18 ไอโซเลต สุ่มเลือกเชื้อที่คัดแยกได้ 1 ไอโซเลต มาระบุชื่อโดยการวิเคราะห์ลำดับยีน 16S rRNA พบ *Salmonella enterica* คิดเป็น 30% จากตัวอย่างทั้งหมด 60 ตัวอย่าง แบ่งออกเป็นชานมเย็นมีการปนเปื้อนเท่ากับ 18.33% และตัวอย่างกาแฟเย็นมีค่าการปนเปื้อนเท่ากับ 11.67% นำเชื้อ 18 ไอโซเลต มาทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ 3 ชนิด พบเชื้อ *Salmonella* spp. ที่คัดแยกได้ดื้อต่อยาหลายชนิดกระจายอยู่ในเครื่องดื่มชานมเย็นและกาแฟเย็น ซึ่งมีความเสี่ยงต่อผู้บริโภค

คำสำคัญ : *Salmonella enterica* ชานมเย็น กาแฟเย็น

Abstract

Iced milk tea and iced coffee at five refreshment shops around Kamphaeng Phet Rajabhat University were examined for possible *Salmonella* spp. contamination during the period between September and November 2019. It was found that the percentage of the total of 60 samples was 30 percent containing *Salmonella* spp. which were isolated and identified by biochemically tested for 18 isolates. A sampling isolate, identified based on 16S rRNA gene sequencing, was *Salmonella enterica* so this confirmation of all isolates was *Salmonella* spp.. The prevalence of *Salmonella* spp. in iced milk tea and iced coffee was 18.33 percent, and 11.67 percent respectively. All 18 isolates were tested for their antimicrobial susceptibility pattern by disk diffusion technique. These Isolated resistant to many drugs which pose a risk to consumers.

Keywords : *Salmonella enterica*, ice milk tea, ice coffee

บทนำ

เครื่องดื่มพร้อมบริโภคที่จำหน่ายในร้านค้าจัดเป็นอาหารที่ควบคุมคุณภาพในการผลิตได้ยากจึงพบรายงานการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ในเครื่องดื่มประเภทนี้ได้บ่อยครั้ง ในบรรดาโรคที่รู้จักกันดีในอาหาร มีการระบุ *Salmonella* spp. เป็นสาเหตุก่อโรคหลักจากเครื่องดื่มที่เกิดในมนุษย์ เช่น ไข้ไทฟอยด์ โรคอาหารเป็นพิษ โรค Salmonellosis คุณภาพทางจุลชีววิทยาของเครื่องดื่มนมสดปั่นที่ไม่ได้บรรจุภาชนะปิดสนิท ซึ่งจำหน่ายในบริเวณร้านค้าริมถนนและแผงลอยโดยรอบมหาวิทยาลัยฯ หน่วยงานตรวจสอบอาหารประเทศแคนาดา [1] ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของโครงการเฝ้าระวังทางจุลชีววิทยาอาหาร ดำเนินการตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาและความปลอดภัยของกาแฟเย็น ตั้งแต่ 1 เมษายน 2018 ถึง 31 มีนาคม 2019 จำนวนทั้งหมด 59 ตัวอย่าง จากร้านค้าปลีกใน 11 เมือง ทั่วแคนาดา พบ 15 ตัวอย่าง จาก 59 ตัวอย่าง (25.4%) ให้ค่าปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดมากกว่า 100 CFU/g ซึ่งเกินมาตรฐานอาหาร ส่วน *Salmonella* spp. *E. coli* O157 และ *E. coli* ทั่วไป (>100 Most Probable Number (MPN)/mL) ไม่พบในตัวอย่างใด ๆ [1]

ผู้ป่วยไข้ไทฟอยด์หรือรายที่ติดเชื้อจาก *Salmonella* spp. ที่รุนแรง การให้ยาต้านเชื้อแบคทีเรียสามารถช่วยลดความรุนแรงของโรคได้ แต่เดิมยาหลักที่ใช้ในการรักษาโรคไข้ไทฟอยด์คือ Chloramphenicol ซึ่งพบว่าได้ผลดี อย่างไรก็ตามการใช้ยาดังกล่าวกระตุ้นให้เชื้อมีอัตราการดื้อต่อยาสูงมากขึ้น และพบอัตราการเกิดโรคซ้ำสูง ยาหลักที่ใช้สำหรับรักษาไข้ไทฟอยด์ในปัจจุบัน คือ ยากลุ่ม Quinolones เช่น Ciprofloxacin หรือยากลุ่มอื่น ๆ ที่อาจใช้แทนได้ เช่น Ampicillin แต่พบว่าเชื้อมีอัตราการดื้อยาเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะเชื้อ *Salmonella* Typhi [2] แสดงให้เห็นรูปแบบที่หลากหลายของการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *S. enterica* serovar Typhimurium ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำแข็งและเครื่องดื่ม ซึ่งพบเชื้อ *Salmonella* spp. ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดสูง การใช้ยาปฏิชีวนะอย่างไม่เหมาะสมในการยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคที่เกี่ยวกับโรคท้องร่วงในอินโดนีเซียอาจเพิ่มการดื้อยาปฏิชีวนะ [3]

ชานมเย็นและกาแฟเย็น เป็นเครื่องดื่มที่สามารถหาซื้อได้ง่ายจากร้านจำหน่ายบริเวณมหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร ซึ่งได้รับความนิยมเป็นอย่างมากในกลุ่มนักศึกษา การปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ในเครื่องดื่มสามารถเกิดขึ้นได้เช่นเดียวกับอาหารพร้อมบริโภคชนิดอื่น ๆ และในกรณีที่เกิดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ก่อโรคอาจเป็นสาเหตุให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคอาหารเป็นพิษได้ ทำให้ผู้วิจัยเล็งเห็นความสำคัญและความปลอดภัยของเครื่องดื่ม จึงทำการตรวจวิเคราะห์เชื้อก่อโรค *Salmonella* spp. จากร้านจำหน่ายเครื่องดื่มรอบมหาวิทยาลัยฯ เพื่อประเมินการปนเปื้อนเชื้อ ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับกรรมวิธีในการผลิตต่าง ๆ และประเมินความเสี่ยงของ *Salmonella* spp. สู่ผู้บริโภค

วิธีการดำเนินการวิจัย

กลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา

ร้านจำหน่ายเครื่องดื่มชานมเย็นและกาแฟเย็น บริเวณรอบมหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร จำนวน 5 ร้าน เริ่มจากสำรวจตำแหน่งที่ตั้งร้านและรายการเครื่องดื่มของแต่ละร้าน เก็บตัวอย่างร้านละ 2 รายการ

จำนวน 6 ครั้ง ตั้งแต่เดือนกันยายน 2562 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2562 รวมทั้งหมด 60 ตัวอย่าง เพื่อทำการวิเคราะห์เชื้อก่อโรค *Salmonella* spp. ในเครื่องดื่มชาและกาแฟ โดยตัวอย่างจะถูกส่งถึงห้องปฏิบัติการทันทีนับจากการเก็บตัวอย่าง

วิธีการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

การตรวจเชื้อ *Salmonella* spp. ดำเนินตามวิธีมาตรฐาน ISO 6579: 2002 [4] ปิเปตตัวอย่าง 25 มิลลิลิตร ลงใน Buffered Peptone Water ปริมาตร 225 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 2 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่บ่มครบตามกำหนด ปิเปตปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอด Rappaport-Vassiliadis Soya broth (RVS) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 41.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อมีการเจริญของ *Salmonella* spp. ที่ให้ผลบวกจะมีการเปลี่ยนสีอาหาร RVS เป็นสีฟ้าซีด ปิเปตปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอด Muller-Kauffmann Tetrathionate-novobiocin broth (MKTTn) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อมีการเจริญของ *Salmonella* spp. ที่ให้ผลบวกจะมีการเปลี่ยนสีอาหารเป็นสีเหลืองซีด จากนั้นใช้ห่วงเขี่ยเชื้อถ่ายเชื้อจากหลอดมาทำการ Cross Streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด คือ Xylose Lysine Deoxycholate agar (XLD) และ Brilliant Green Agar (BGA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่ขึ้นจากอาหารทั้ง 2 ชนิด โดยจากอาหาร XLD จะเลือกลักษณะโคโลนีที่ตรงกลางโคโลนีมีสีดำ ขอบโคโลนีแคบและใส ในส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ BGA จะเลือกลักษณะโคโลนีที่มีสีขาวอมชมพู ให้เลือกมา 1 โคโลนี จากนั้นทำการถ่ายเชื้อลงบนอาหาร Nutrient agar (NA) slant บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่คัดแยกได้เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเชื้อไปย้อมแกรมและทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ TSI agar Indole reaction Voges-Proskauer (VP) reaction และ Urease test เพื่อยืนยันว่าเป็น *Salmonella* spp.

การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

การทดสอบ TSI (Triple Sugar Iron Agar Slant) ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ stab culture ประมาณครึ่งทางอย่าให้ถึงก้นหลอด บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง

การทดสอบ Indole test นำเชื้อที่สงสัยมาเพาะเลี้ยงลงในอาหารลี้ยงเชื้อ Hottinger broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เติม Kovac's reagent จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองดังกล่าว เขย่าเบา ๆ

การทดสอบ Voges-Proskauer reaction test ทดสอบว่าแบคทีเรียสามารถสร้าง acethyl methyl carbinol จาก glucose นำอาหารที่แบ่งไว้จากการทดสอบ methyl red มาทดสอบปฏิกิริยา VP test หยด barritt's reagent A (carbinol 5% α -naphthol) ลงใน MR-VP broth 6 หยด และเขย่าเบาๆ จากนั้นเติม barritt's reagent B (40% KOH) 2 หยด ทันที เขย่าอีกครั้ง จากนั้นทิ้งไว้ 15 นาที และเขย่าทุก ๆ 3-4 นาที สังเกตสีของอาหารที่ผ่านการเติม barritt's reagent A และ B การอ่านปฏิกิริยา ผลบวก : มีสีชมพูเกิดขึ้นบน

ผิวหน้าของอาหาร ผลลบ : ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น (สีเหลืองของอาหาร) ถ้าหากเป็น *Salmonella* spp. จะให้ผลลบ

การทดสอบ Urea test ใช้เข็มเขี่ยเชื้อแตะเชื้อเพื่อถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Urea agar โดยทำการ streak ที่ผิวอาหารใน slant แล้วแทงลงในส่วนของ butt ในลักษณะแนวดิ่ง โดยอาหารที่ใช้ทดสอบจะมียูเรียเป็นส่วนประกอบและมี Phenol red เป็นอินดิเคเตอร์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้าเชื้อสามารถสลายยูเรียได้ อาหารจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู การอ่านปฏิกิริยาอ่านได้ดังนี้ ผลบวก : มีแบคทีเรียที่ไม่ใช่ *Salmonella* spp. อาหารจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีชมพู ผลลบ : มีแบคทีเรียที่เป็น *Salmonella* spp. อาหารไม่เปลี่ยนสี (สีเหลือง)

การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะใช้วิธี Disk diffusion method นำเชื้อ *Salmonella* spp. ที่คัดแยกได้แล้ว เพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง แล้วใช้ไม้พันสำลีจุ่มเชื้อ แล้วป้ายถี่ ๆ ให้ทั่วผิวหน้า Mueller-Hinton agar (MHA) รวมทั้งขอบของอาหาร จากนั้นนำแผ่นยา (Antibiotic disc) ได้แก่ Ciprofloxacin (CIP), Ampicillin (Amp), tetracycline (TE) วางบนผิวหน้าอาหารและกดเบา ๆ โดยใช้คีมที่ปราศจากเชื้อ บ่มเพาะเชื้อเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นอ่านและแปลผลโดยการสังเกตดู inhibition zone ที่เกิดขึ้นและวัดเส้นผ่าศูนย์กลางและนำไปเทียบกับ ตารางมาตรฐาน Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) อ่านผลหลังจากบ่มเชื้อเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

การระบุชื่อจุลินทรีย์โดยใช้ 16s RNA gene

สุ่มเลือกเชื้อที่คัดแยกได้รหัส 2(2)-4XM ถ่ายลงในอาหาร Nutrient broth ผสมกลีเซอรอล เขย่าด้วย vortex ให้เข้ากัน จากนั้นนำส่งให้กับบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้

ผลการวิจัย

นำเชื้อจาก RVS และ MKTTn มา Cross steak ลงบนอาหารทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ XLD และ BGA โดยแสดงวันที่เก็บตัวอย่างและรหัสเชื้อต้องสงสัย (Suspect colonies) แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 รหัสเชื้อต้องสงสัยที่คัดแยกได้จากชานมเย็นและกาแฟเย็นจากร้านจำหน่ายทั้ง 5 ร้าน

ครั้งที่เก็บตัวอย่าง	วันที่เก็บตัวอย่าง	ร้านที่เก็บตัวอย่าง				
		1	2	3	4	5
1	10 ก.ย. 2562	1(1)-1XM 1(1)-1BM 1(1)-1XR 1(1)-1BR	1(2)-1BM 1(2)-1XR 1(2)-1BR 2(2)-1BR	1(3)-1BM 1(3)-1XR 2(3)-1XM 2(3)-1BM 2(3)-1XR 2(3)-1BR	1(4)-1XM 1(4)-1BM 2(4)-1XR 2(4)-1BR	1(5)-1XM 1(5)-1BM 1(5)-1XR 2(5)-1BM 2(5)-1XR 2(5)-1BR
2	24 ก.ย. 2562	1(1)-2XM 1(1)-2BM 1(1)-2XR 1(1)-2BR	1(2)-2BM 1(2)-2BR 2(2)-2BR	-	1(4)-2XR 1(4)-2BR 2(4)-2XM 2(4)-2BM 2(4)-2BR	-
3	1 ต.ค. 2562	-	2(2)-3BM 2(2)-3BR	-	1(4)-3BM	2(5)-3BM
4	9 ต.ค. 2562	1(1)-4XM 1(1)-4BM 1(1)-4XR	2(2)-4XM 2(2)-4BM 2(2)-4XR 2(2)-4BR	2(3)-4XM 2(3)-4BM	-	2(5)-4XM 2(5)-4BM
5	1 พ.ย. 2562	1(1)-5BR	1(2)-5XM 1(2)-5BM	-	-	-
6	8 พ.ย. 2562	2(1)-6XM 2(1)-6BM 2(1)-6BR	1(2)-6BM 2(2)-6BM 2(2)-6XR	-	1(4)-6BM	1(5)-6XM 1(5)-6BM 2(5)-6BM

***หมายเหตุ** ตัวเลขหน้าสุดตัวเลขหน้าสุด หมายถึงตัวอย่าง; 1 คือ กาแฟเย็น และ 2 คือ ชานมเย็น; ตัวเลขในวงเล็บ หมายถึง ลำดับร้านที่เก็บตัวอย่าง; ตัวเลขหลังยัติภังค์ หมายถึง ครั้งที่เก็บตัวอย่าง; ตัวอักษร X หมายถึง เชื้อจากอาหาร XLD; B หมายถึง เชื้อจากอาหาร BGA; M หมายถึง เชื้อจากอาหาร MKTTn; R หมายถึง เชื้อจากอาหาร RVS

จากตารางที่ 1 พบการปนเปื้อนเชื้อในตัวอย่างชานมเย็นและกาแฟเย็นที่แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Salmonella* spp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยจะพบรหัสเชื้อต้องสงสัยจากชานมเย็น 31 ไอโซเลต จากกาแฟเย็น 33 ไอโซเลต พบการปนเปื้อนในตัวอย่างที่แตกต่างกันไปในแต่ละร้าน คาดว่าจะเป็นเชื้อ *Salmonella* spp. จากนั้นนำไปทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีเพื่อยืนยันต่อไป

เมื่อพบการปนเปื้อนเชื้อในตัวอย่าง (ตารางที่ 1) นำไปทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีทั้งหมด 4 ปฏิกิริยา ได้แก่ การทดสอบ TSI ให้ผลเป็น K/AG+ การย่อยสลายกลูโคส เกิดในสภาพที่ต้องการออกซิเจนเท่านั้น สีเหลืองชี้ถึงผลผลิตกรด สีแดงชี้สภาพที่เป็นด่าง และมีสีดำจากการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ การทดสอบ Indole จะให้ผลลบ คือ ไม่เกิดการเปลี่ยนสีเมื่อหยดสารทดสอบ การทดสอบ Voges-Proskauer reaction test (VP)

ให้ผลลบ คือ ไม่เกิดการเปลี่ยนสีเมื่อหยด 40% KOH และการทดสอบ Urea ให้ผลลบไม่เกิดการเปลี่ยนสีของอาหาร ให้ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแต่ละเชื้อที่คัดแยกได้ แสดงดังตารางที่ 2 – 3

ตารางที่ 2 ผลปฏิกิริยาชีวเคมีของเชื้อต้องสงสัยที่คัดแยกได้ในชานมเย็น

ลำดับ	รหัสเชื้อ	ผลของปฏิกิริยาชีวเคมีในการทดสอบ				*Salmonella* spp.
		TSI Test	Indole Test	VP Test	Urea Test	
1	2(2)-1BR	K/AG-	-	-	+	*Enterobacteriaceae*
2	2(3)-1XM	K/AG+	-	-	+	*Proteus* spp.
3	2(3)-1XR	K/AG+	-	-	+	*Proteus* spp.
4	2(3)-1BM	A/AG-	-	-	+	*Enterobacteriaceae*
5	2(3)-1BR	K/AG+	-	-	+	*Proteus* spp.
6	2(4)-1XR	K/AG+	-	-	-	✓
7	2(4)-1BR	K/AG+	+	-	+	*Enterobacteriaceae*
8	2(5)-1XR	K/AG+	-	-	+	*Proteus* spp.
9	2(5)-1BM	K/AG-	-	-	-	*Shigella* spp.
10	2(5)-1BR	K/AG-	+	-	-	*Enterobacteriaceae*
11	2(2)-2BR	K/AG-	-	-	+	*Enterobacteriaceae*
12	2(4)-2XM	K/AG+	-	-	-	✓
13	2(4)-2BM	A/A-	-	-	+	*Enterobacteriaceae*
14	2(4)-2BR	K/AG-	-	-	-	*Shigella* spp.
15	2(2)-3BM	A/A+	-	-	+	*Enterobacteriaceae*
16	2(2)-3BR	A/A	-	-	+	*Enterobacteriaceae*
17	2(5)-3BM	K/AG+	-	-	-	✓
18	2(2)-4XM	K/AG+	-	-	-	✓
19	2(2)-4XR	K/AG+	-	-	-	✓
20	2(2)-4BM	K/AG+	-	-	-	✓
21	2(2)-4BR	K/AG+	-	-	-	✓
22	2(3)-4XM	K/AG+	-	-	-	✓
23	2(3)-4BM	K/AG+	-	-	-	✓
24	2(5)-4XM	K/AG+	-	-	-	✓
25	2(5)-4BM	A/AG-	-	-	+	*Enterobacteriaceae*
26	2(1)-6XM	K/A	-	-	-	*Enterobacteriaceae*
27	2(1)-6BM	K/A	-	-	-	*Enterobacteriaceae*
28	2(1)-6BR	K/AG+	-	-	-	✓
29	2(2)-6XR	A/A	-	-	-	*Enterobacteriaceae*
30	2(2)-6BM	A/AG-	-	-	-	*Enterobacteriaceae*
31	2(5)-6BM	K/AG-	-	-	-	*Shigella* spp.

จากตารางที่ 2 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อที่คัดแยกได้จากตัวอย่างชานมเย็น พบว่าผลการทดสอบทางชีวเคมีทั้ง 4 ปฏิกิริยาที่ให้ผลยืนยันว่าเป็นเชื้อ *Salmonella* spp. นั้น มีจำนวน 11 ไอโซเลต จากทั้งหมด 31 ไอโซเลต และพบเชื้ออื่น ๆ ในกลุ่ม Enterobacteriaceae เช่น *Escherichia coli*, *Shigella* spp. และ *Proteus* spp.

ตารางที่ 3 ผลปฏิกิริยาชีวเคมีของเชื้อต้องสงสัยที่คัดแยกได้ในกาแฟเย็น

ลำดับ	รหัสเชื้อ	ผลของปฏิกิริยาชีวเคมีในการทดสอบ				*Salmonella* spp.
		TSI Test	Indole Test	VP Test	Urea Test	
1	1(1)-1XM	K/AG+	-	-	-	✓
2	1(1)-1XR	K/A+	+	-	-	*Enterobacteriaceae*
3	1(1)-1BM	K/AG+	-	-	+	*Enterobacteriaceae*
4	1(1)-1BR	K/AG+	-	-	+	*Proteus* spp.
5	1(2)-1XR	A/A+	+	-	+	*Enterobacteriaceae*
6	1(2)-1BM	A/AG-	+	-	-	*Escherichia coli*
7	1(2)-1BR	K/AG-	+	-	-	*Enterobacteriaceae*
8	1(3)-1XR	K/AG+	-	-	-	✓
9	1(3)-1BM	K/A-	+	-	+	*Enterobacteriaceae*
10	1(4)-1XM	K/AG+	-	-	+	*Proteus* spp.
11	1(4)-1BM	K/AG+	-	-	-	✓
12	1(5)-1XM	A/AG-	+	-	+	*Enterobacteriaceae*
13	1(5)-1XR	K/AG+	-	-	+	*Proteus* spp.
14	1(5)-1BM	K/A-	+	-	+	*Enterobacteriaceae*
15	1(1)-2XM	K/AG+	-	-	-	✓
16	1(1)-2XR	K/AG-	+	-	+	*Enterobacteriaceae*
17	1(1)-2BM	K/A-	-	-	+	*Enterobacteriaceae*
18	1(1)-2BR	K/A-	+	-	+	*Enterobacteriaceae*
19	1(2)-2BM	K/A-	+	-	+	*Enterobacteriaceae*
20	1(2)-2BR	A/AG-	+	-	+	*Enterobacteriaceae*
21	1(4)-2XR	A/A-	-	-	+	*Enterobacteriaceae*
22	1(4)-2BR	K/AG-	-	-	-	*Shigella* spp.
23	1(4)-3BM	K/AG-	+	-	+	*Enterobacteriaceae*
24	1(1)-4XM	K/A+	+	-	+	*Enterobacteriaceae*
25	1(1)-4XR	K/AG+	-	-	+	*Proteus* spp.
26	1(1)-4BM	K/AG-	+	-	-	*Escherichia coli*
27	1(1)-5BR	K/AG+	-	-	-	✓
28	1(2)-5XM	K/AG+	-	-	-	✓
29	1(2)-5BM	K/AG+	-	-	-	✓
30	1(2)-6BM	A/AG-	-	-	+	*Enterobacteriaceae*
31	1(4)-6BM	K/A	-	-	-	*Enterobacteriaceae*
32	1(5)-6XM	K/A	-	-	-	*Enterobacteriaceae*
33	1(5)-6BM	K/A	-	-	-	*Enterobacteriaceae*

จากตารางที่ 3 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อที่คัดแยกได้จากตัวอย่างกาแฟเย็น พบผลการทดสอบทางชีวเคมีทั้ง 4 ปฏิกิริยาที่ให้ผลยืนยันว่าเป็นเชื้อ *Salmonella* spp. จำนวน 7 ไอโซเลต จากทั้งหมด 33 ไอโซเลต และพบเชื้ออื่น ๆ ร่วมด้วย

ผลการทดสอบทางชีวเคมีจากตัวอย่างชานมเย็นและกาแฟเย็น พบ *Salmonella* spp. จำนวน 18 ไอโซเลต จากเชื้อที่คัดแยกได้ทั้งหมด 64 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 28 ของเชื้อทั้งหมดที่คัดแยกได้ จากนั้นทำการสุ่มเลือกเชื้อรหัส 2(2)-4XM เพียง 1 ไอโซเลต ส่งไประบุชื่อที่บริษัท Macrogen พบว่าเป็น *Salmonella enterica* มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA เท่ากับ 99% ยืนยันว่าพบ *Salmonella* spp. ในเครื่องดื่มกาแฟเย็นและชานมเย็นจริง

นำเชื้อทั้ง 18 ไอโซเลตไปทดสอบยาปฏิชีวนะ ด้วยวิธีการ Disk diffusion techniques ซึ่งข้อมูลความไวหรือการดื้อต่อยา แสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อก่อโรค *Salmonella* spp. ที่คัดแยกได้จากชานมเย็นและกาแฟเย็น

รหัสเชื้อที่คัดแยกได้	**ยาปฏิชีวนะ**					
	Zone diameter (mm)			**แปรผล**		
	AP 10 µg	CIP 5 µg	TE 30 µg	AP 10 µg	CIP 5 µg	TE 30 µg
2(4)-1XR	18	29	20	S	I	S
1(3)-1XR	15	25	20	I	I	S
1(1)-1XM	12	30	20	R	I	S
1(4)-1BM	15	25	17	I	I	S
1(1)-2XM	0	30	12	R	I	I
2(4)-2XM	18	24	22	S	I	S
2(5)-3BM	18	28	22	S	I	S
2(2)-4XM	22	36	22	S	S	S
2(2)-4XR	22	26	21	S	I	S
2(2)-4BR	22	36	22	S	S	S
2(3)-4XM	22	36	23	S	S	S
2(3)-4BM	0	29	11	R	I	R
2(5)-4XM	23	34	23	S	S	S
1(1)-5BR	0	0	0	R	R	R
1(2)-5XM	18	32	22	S	S	S
1(2)-5BM	17	27	21	S	I	S
2(1)-6BR	21	41	0.8	S	S	R
2(2)-6BM	17	34	19	S	S	S
ค่าเฉลี่ย	15.47	28.71	17.58	-	-	-
ค่าความแปรปรวน	63.51	77.35	53.92	-	-	-

***หมายเหตุ** AP = Ampicillin, CIP = Ciprofloxacin, TE = Tetracycline,
S = Sensitive, R = Resistance, I = Intermediate

จากตารางที่ 4 พบว่าเชื้อ *Salmonella* spp. แสดงรูปแบบการดื้อต่อยาที่ใช้ทดสอบมีรูปแบบที่แตกต่างกัน ได้แก่ การดื้อต่อยาตัวเดียว ดื้อต่อยา 2 ตัว ดื้อต่อยาทั้ง 3 ตัว ไวต่อยาชนิดเดียว ไวต่อยา 2 ตัว ไวต่อยาทั้ง 3 ตัว ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 รูปแบบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อก่อโรค *Salmonella* spp. ที่คัดแยกได้จากชานมเย็นและกาแฟเย็น จากร้านจำหน่ายบริเวณมหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร (n=18)

รูปแบบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ	จำนวน (ร้อยละ)
การดื้อต่อยาตัวเดียว	2 (11.11)
ดื้อต่อยา 2 ตัว	1 (5.56)
ดื้อต่อยาทั้ง 3 ตัว	1 (5.56)
ไวต่อยาตัวเดียว	3 (16.67)
ไวต่อยา 2 ตัว	5 (27.77)
ไวต่อยาทั้ง 3 ตัว	6 (33.33)

จากตารางที่ 5 พบว่า *Salmonella* spp. มีความไวต่อยาทั้ง 3 ชนิดสูงที่สุด คิดเป็น 33.33 % รองลงมา คือ ไวต่อยา 2 ชนิด คิดเป็น 27.77 % ในขณะที่เชื้อ *Salmonella* spp. มีการดื้อต่อยาทั้ง 3 ตัว พบในตัวอย่างกาแฟเย็น มีค่าเท่ากับ 5.56 % ซึ่งจัดว่าแบคทีเรียกลุ่มที่มีการดื้อยาหลายชนิด หรือ Multidrug resistant bacteria [5]

ความชุกของเชื้อก่อโรค *Salmonella* spp. ในตัวอย่างชานมเย็นและกาแฟเย็น จากร้านจำหน่ายรอบมหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร ทั้งหมด 5 ร้าน แสดงข้อมูลดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ความชุกของเชื้อก่อโรค *Salmonella* spp. จากชานมเย็นและกาแฟเย็น

ร้านที่	ความชุกของเชื้อ *Salmonella* spp. (%)	
	ชานมเย็น	กาแฟเย็น
1	1 (1.67%)	3 (5.00%)
2	4 (6.67%)	2 (3.33%)
3	2 (3.33%)	1 (1.67%)
4	2 (3.33%)	1 (1.67%)
5	2 (3.33%)	0 (0%)
รวม	11 (18.33%)	7 (11.67%)
รวมทั้งหมด	18 (30.00%)	

จากผลการทดลองมีการปนเปื้อนในแต่ละตัวอย่างที่แตกต่างกันไปในแต่ละร้าน โดยจะพบการปนเปื้อนจากชานมเย็นมากกว่ากาแฟเย็น พบความชุกของ *Salmonella* spp. เท่ากับ 30 % ของตัวอย่าง

ทั้งหมด 60 ตัวอย่าง ซึ่งความชุกของเชื้อ *Salmonella* spp. ในตัวอย่างชานมเย็นและกาแฟเย็นเท่ากับ 18.33 % และ 11.67 % ตามลำดับ โดยที่ตัวอย่างชานมเย็นร้านที่ 3 ร้านที่ 4 และร้านที่ 5 พบ พบความชุกของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่เท่ากัน คือ 3.33% ส่วน ร้านที่ 1 พบการความชุกของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่ 1.67% และในตัวอย่างกาแฟเย็น ร้านที่ 1 พบการความชุกของเชื้อ *Salmonella* spp. สูงที่สุด คือ 5.00% ส่วนร้านที่ 2 ความชุกของเชื้อ *Salmonella* spp. เท่ากับ 3.33% ร้านที่ 3 และร้านที่ 4 ความชุกของเชื้อที่เท่ากัน คือ 1.67% โดยที่ร้านที่ 5 ไม่พบการปนเปื้อนในกาแฟเย็น ซึ่งมีความชุก 0%

สรุปผลการวิจัยและวิจารณ์

การปนเปื้อนเชื้อต้องสงสัยในตัวอย่างชานมเย็นและกาแฟเย็นมีหลายปัจจัย ได้แก่ วัตถุดิบในการประกอบเครื่องดื่ม เช่น น้ำ เป็นแหล่งสำคัญต่อการปนเปื้อน กล่าวคือ อาจไม่สะอาดพอในการนำมาเป็นส่วนประกอบในการทำกาแฟ การปนเปื้อนจากน้ำถูกระบุว่าเป็นแหล่งที่เป็นไปได้ของการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. รวมถึงการแพร่ระบาดของโรค [6, 7] สุขลักษณะส่วนบุคคลของผู้ประกอบเครื่องดื่มไม่ดี เช่น มีบาดแผลที่มือ มีการไอ จาม ขณะทำการประกอบเครื่องดื่ม หรือไม่ได้ล้างมือให้สะอาดหลังจากเข้าห้องน้ำ มีโอกาสที่เชื้อจะปนเปื้อนลงไปยังเครื่องดื่มได้ การปนเปื้อนจากอุปกรณ์ เช่น แก้ว ช้อน ที่ผู้ประกอบการล้างไม่สะอาด หรืออาจมีการใช้ซ้ำ สถานที่จุดจำหน่ายเครื่องดื่มอยู่ใกล้ถนนหรือถังขยะ เป็นการเพิ่มความเสี่ยงจากการปนเปื้อนเชื้อหลายชนิด นำไปสู่การระบาดและติดเชื้อแบคทีเรียสู่ผู้บริโภคได้ การปนเปื้อนจากการใช้น้ำแข็งเป็นส่วนประกอบ [3] หรือปนเปื้อนในระหว่างการผลิตและการขนส่งโดยผู้จัดจำหน่ายน้ำแข็ง การมีอยู่ของแมลงวันที่จุดจำหน่ายเครื่องดื่มเป็นสาเหตุของการปนเปื้อนของแบคทีเรีย [8] สถานที่ตั้งของผู้ขายข้างถนนที่มีผู้คนหนาแน่นและมีการจราจรหนาแน่น ทำให้เกิดการกระจายตัวของอนุภาคสิ่งปนเปื้อนในอากาศ พื้นที่ทิ้งขยะและน้ำเสียเพิ่มโอกาสให้พบสัตว์พาหะนำโรค เช่น หนูแมลงสาบ และแมลงวัน ทำให้เกิดความเสี่ยงกับผู้บริโภคได้ ดังนั้นอาหารและเครื่องดื่มจึงจะต้องได้รับการป้องกันจากฝุ่นและสัตว์พาหะที่อาจเป็นสื่อกลางในการก่อให้เกิดโรคที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ [9]

ชานมเย็นและกาแฟเย็นมีความเสี่ยงต่อผู้บริโภค มีโอกาสก่อให้เกิดโรค Salmonellosis ในผู้สูงอายุ ทารก เด็ก สตรีมีครรภ์ และผู้มีภาวะคุ้มกันบกพร่อง ดังนั้นควรมีมาตรการในการควบคุมการผลิตให้ถูกตามหลักสุขอนามัย และควรกำหนดวิธีการแก้ไขให้ดีขึ้น เช่น อบรมผู้ขายและแจ้งผู้บริโภคถึงอันตรายที่อาจเกิดขึ้น นอกจากนี้ยังพบเชื้อ *Salmonella* spp. ที่ดื้อต่อยาหลายชนิดกระจายอยู่ในเครื่องดื่มชานมเย็นและกาแฟเย็นเช่นเดียวกับเชื้อก่อโรค *E. coli* ที่สามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม และพบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะได้หลายชนิด [10] นอกจากนี้มีข้อมูลยืนยันว่าแบคทีเรียที่ปนเปื้อนมากับอุจจาระนี้ (Fecal coliform) มีความสามารถในการส่งผ่านยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาไปสู่แบคทีเรียกลุ่มอื่น โดยผ่านทางพลาสมิด [11] ดังนั้นหากเกิดการส่งผ่านยีนดังกล่าวไปสู่เชื้อก่อโรคโดยเฉพาะเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารมีโอกาสเกิดขึ้นได้มาก เนื่องจากมีแหล่งที่มาเดียวกัน [12] พบว่าเกิดการส่งผ่านยีนดื้อยา Ampicillin จาก *E. coli* ซึ่งเป็นตัวแทนของเชื้อแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมไปสู่ *Salmonella* spp. ซึ่งเป็นตัวแทนของเชื้อก่อโรคที่นำมาเพาะเลี้ยงร่วมกัน เชื้อ

Salmonella spp. ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะมีความสำคัญต่อสุขภาพของผู้บริโภค การดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อก่อโรคส่งผลกระทบต่อทางเลือกในการใช้ยารักษาที่น้อยลง เสียค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้นและอาจเป็นอันตรายต่อผู้ป่วยได้ ในผู้ป่วยไข้ไทฟอยด์หรือรายที่ติดเชื้อจาก *Salmonella* spp. ที่รุนแรง การให้ยาต้านเชื้อแบคทีเรียสามารถช่วยลดความรุนแรงของโรคได้ แต่เดิมยาหลักที่ใช้ในการรักษาโรคไข้ไทฟอยด์คือ Chloramphenicol พบว่าได้ผลดี อย่างไรก็ตาม พบการใช้ยาดังกล่าวกระตุ้นให้เชื้อมีอัตราการดื้อต่อยาสูงมากขึ้น และพบอัตราการเกิดโรคซ้ำสูง ยาหลักที่ใช้สำหรับรักษาไข้ไทฟอยด์ในปัจจุบันคือยากลุ่ม Quinolones เช่น Ciprofloxacin หรือยากลุ่มอื่น ๆ ที่อาจใช้แทนได้ เช่น Ampicillin แต่พบว่าเชื้อมีอัตราการดื้อยาเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะเชื้อ *Salmonella* Typhi [2]

เชื้อ *Salmonella* spp. ที่คัดแยกได้จากชานมเย็นและกาแฟเย็นจำนวน 18 ไอโซเลต พบว่ามีความไวต่อยา Tetracycline (TE) 30 μg มากที่สุด ดื้อต่อยา Ciprofloxacin (CIP) 5 μg ในระดับปานกลาง และเชื้อดื้อต่อยา Ampicillin (AP) 10 μg การดื้อต่อแอมพิซิลลินเกิดจากมีพลาสมิดสร้างเอนไซม์เบตา-แลคแตมเมส (β-lactamase) มาทำลายวงของเบตา-แลคแตม (β-lactam ring) ในโครงสร้างของยา [13] ในประเทศกรีซเชื้อ *Salmonella* spp. แสดงการดื้อต่อยา Ampicillin การดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *Salmonella enterica* จากผู้ป่วยกระเพาะและลำไส้อักเสบ พบเชื้อมีความดื้อต่อยา Ampicillin [14]

จากผลการทดลองในตัวอย่างชานมเย็นมีความชุก *Salmonella* spp. มากกว่ากาแฟเย็น อาจเนื่องมาจากการปนเปื้อนจากวัตถุดิบ ดังนั้นการปนเปื้อน *Salmonella* spp. จึงอาจเกิดจากการประกอบเครื่องดื่มที่อุณหภูมิต่ำกว่า 40 องศาเซลเซียส อาจเพิ่มโอกาสการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. ได้ [15]

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์วิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์ประยุกต์ ในการสนับสนุนการทำปฏิบัติการและคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร ส่งเสริมการตีพิมพ์เผยแพร่ผลการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

[1] Food Microbiology Targeted Surveys. (2020). Bacterial Pathogens in Cold Brewed Coffee - April 1, 2018 to March 31, 2019. Canadian Food Inspection Agency.

[2] ภัทรชัย กีรติสิน. (2549). ตำราวิทยาแบคทีเรียการแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล.

[3] Waturangi, D.E., Wiratama, E., & Theresia, A.S. (2019) Prevalence and molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from ice and beverages in Jakarta, Indonesia. *BMC Research Notes*, *12*(1), 45.

[4] ISO 6579 - 1:2017. Microbiology of the food chain - horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella - Part 1: detection of *Salmonella* spp. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2017.

[5] Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R. B., & Carmeli, Y. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrugresistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions foracquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection, 18*(3), 268–281.

[6] Greene, S. K., Daly, E. R., Talbot, E. A., Demma, L. J., Holzbauer, S., Patel, N. J.,. H ill T.A. , Walderhaug M.O., Hoekstra R. M., Lynch M.F., & Painter J.A. (2008). Recurrent multistate outbreak of *Salmonella* Newport associated with tomatoes from contaminated fields, 2005. *Epidemiology and Infection*, *136*(2), 157–165.

[7] Sivapalasingam, S., Barrett, E., Kimura, A., Van Duyne, S., De Witt, W., Ying, M., Frisch A., Phan, Q., Gould, E., Shillam, P., Reddy V., Cooper, T., Hoekstra M., Higgins, C., Sanders, J.P., Tauxe R.V., & Slutsker L. (2003). A multistate outbreak of *Salmonella enterica* Serotype Newport infection linked to mango consumption: Impact of water-dip disinfestation technology. *Clinical Infectious Diseases*, *37*(12), 1585–1590.

[8] Kateryn, R. (2003). Persistence and Significance of *E. coli* in House Flies (Musca domestica) and Stable Flies (Stomoxys calcitrans). Master's Thesis, University of Lethbridge, Lethbridge, AB, Canada.

[9] Alimi, B.A. (2016). Risk factors in street food practices in developing countries. *Food Science and Human Wellness*, *5*(3), 141–148.

[10] Sayah, R.S., Kaneene, J.B., Johnson, Y., & Miller, R.A. (2005). Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic and wild animal fecal samples, human septage, and surface water. *Applied and Environmental Microbiology, 71*(3), 1394-1404.

[11] Winokur, P. L., Vonstein, D. L, Hoffman, L. J., Uhlenhopp, E. K., & Doern, G. V. (2001). Evidence for transfer of CMY-2 AmpC-lactamase plasmids between *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and humans. *Antimicrob Agents Chemother, 45*(10), 2716–2722.

[12] Melissa, O. (2004). Transfer of Antibiotic resistant Genes between *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurum. *Cantaurus, 12*, 13-14.

[13] Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C.L. (1992). Microbiology: An Introduction. California: The Benjamin/Cummings.

[14] Oloso, N.O., Adeyemo, I.A., Heerden, H.V., Fasanmi, O.G., & Fasina, F.O. (2019). Antimicrobial Drug Administration and Antimicrobial from the Broiler Production Value Chain in Nigeria. *Antibiotics 2019, 8*(2), 75.

[15] Cardinale, E., Perrier Gros-Claude, J.D., Rivoal, K., Ros,e V., Tall, F., . Mead G.C, & Salvat, G. (2005). Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* ssp. *Enterica* serovars Hadar, Brancaster and Enteritidis from humans and broiler chickens in Senegal using pulsed-field gel electro-phoresis and antibiotic susceptibility. *Journal of Applied Microbiology, 99*(4), 968-977.