ว. กรมวิทย. พ. 2541. 40 (2) : 209-220

ชุดทดสอบยาตกค้างในนมและผลิตภัณฑ์นม

Rapid Test Kit for Detection of Drug Residues in Milk and Milk Products

จุไรรัตน์ รุ่งโรจนารักษ์
กองอาหาร
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

Churairat Rongrodejanarak
Division of Food
Department of Medical Sciences

บทคัดย่อ

เพื่อพัฒนาวิธีตรวจสอบยาปฏิชีวนะและสารต้านจุลชีพตกค้างในนมและผลิตภัณฑ์นม กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยกองอาหาร จึงได้ผลิตและศึกษาชุดทดสอบตรวจวิเคราะห์สารดังกล่าวในเชิงปริมาณ โดยใช้หลักการยับยั้งการเจริญของเชื้อ B.stearothermophilus ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบที่สำคัญคือ น้ำตาลglucose และ bromcresol purple เป็น indicator บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 64 ± 2 °ซ เป็นเวลา 3 ถึง 3 ชั่วโมง15นาที ถ้าไม่มีสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ ชุดทดสอบจะเปลี่ยนสีจากม่วงเป็นเหลือง และตรงกันข้ามถ้ามีสารดังกล่าวในนมและผลิตภัณฑ์นม สีของชุดทดสอบจะคงเป็นสีม่วง ม่วง-เหลือง ม่วงอ่อน หรือม่วงเข้ม ทั้งนี้ขึ้นกับปริมาณของสารตกค้าง และเมื่อประเมินผลชุดทดสอบที่ผลิตขึ้น พบว่าสามารถตรวจสอบปริมาณต่ำสุด (detection limit) ของยาปฏิชีวนะตกค้าง ได้แก่ Penicillin และ Oxytetracycline ในระดับต่ำกว่า Disc assay ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน ทั้งมีความถูกต้อง (accuracy) ความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) คิดเป็นร้อยละ 91.7, 100 และ 90.5 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบชุดทดสอบที่ผลิตขึ้นกับชุดทดสอบของ Delvo ซึ่งผลิตจากต่างประเทศ พบว่าให้ผลเท่าเทียมกัน วิธีตรวจสอบโดยใช้ชุดทดสอบที่ผลิตขึ้นง่ายกว่า แต่เวลาในการอ่านผลนานกว่าชุดทดสอบของ Delvo ชุดทดสอบที่ผลิตขึ้นนี้สะดวกในการใช้ตรวจสอบยาปฏิชีวนะและสารต้านจุลชีพตกค้างในนมและผลิตภัณฑ์นมได้ทั้งในห้องปฏิบัติการ โรงงานผลิตนม และสหกรณ์โคนม ทำให้ประเทศพึ่งตนเองได้ โดยไม่ต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ

ABSTRACT

In order to determine antibiotic and antimicrobial drug residues in dairy products. The simple test kit was developed by Division of Food, Department of Medical Sciences. The test kit examines drug residues semi-quantitively, basically by detecting inhibitory growth of B.stearothermophilus in cultural medium, incorporated certain reagents such as glucose and bromcresol purple at 64 ± 2 °C, 3 hr to 3 hr 15 min. Flavoring acid production in the medium, the test organism grows rapidly during incubation in the absence of antibiotic and the bromcresol purple indicator changes from a purple to a yellow color. In the presence of an antibiotic or an inhibitory substances, however, microbial growth is inhibited so that the color of the indicator remains purple, purple-yellow pale-purple or dark purple. The color change depends on the amount of inhibitory residues in dairy products. The rapid method by this test-kit showed lower detection limit of Penicillin and Oxytetracycline concentration than those of the standard method (Disc assay). The accuracy, sensitivity and specificity of test kit were 91.7, 100 and 90.5 percent respectively. Comparing with validated and commercial Delvotest kit, both gave same results The method of analysis by using the rapid test kit is simple but the detection time is more longer than those of Delvotest kit. The test kit can be easily used in laboratories, milk factories and Raw Milk Cooperative to determine drug residues in dairy products. Therefore it is not necessary to use the test kits from abroads.

Keywords : Drug residues, Milk and Milk products, Test kit.

คำนำ

การเลี้ยงสัตว์ประเภทวัว ควาย ที่ให้น้ำนมจำเป็นต้องใช้ยาเพื่อควบคุมและรักษาโรค เช่น ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) หรือ สารต้านจุลชีพอื่นๆ (antimicrobial drugs) ในการให้ยามีทั้งการฉีดปริมาณมากๆ (infusion) ปริมาณน้อย (injection)และให้ทางปากโดยผสมไปกับอาหารสัตว์(oral)[1] การให้ยาดังกล่าวย่อมก่อให้เกิดปัญหาการตกค้างของยาในเนื้อเยื่อและน้ำนมของสัตว์ ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องมีการควบคุมการตกค้างของยาในเนื้อและนมโดยเฉพาะในนมซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นที่ผู้บริโภคทุกเพศทุกวัยต้องบริโภคเพื่อการเจริญเติบโตหรือเสริมให้มีสุขภาพดี การตกค้างของยาในน้ำนมอาจก่อให้เกิดการดื้อยา การแพ้ยาในผู้บริโภค นอกจากนั้นยังมีผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการผลิตนมเปรี้ยวและเนยแข็ง โดยจะไปยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ใช้ในการหมัก (starter culture) [1,3]

วิธีตรวจสอบยาปฏิชีวนะและยาอื่นๆ ซึ่งตกค้างในนม และ ผลิตภัณฑ์ นมมีทั้งวิธี เคมี และวิธีจุลชีววิทยาซึ่งจำเป็นต้องตรวจสอบในห้องปฏิบัติการ และวิธีซึ่งใช้ชุดทดสอบสามารถตรวจสอบทั้งในห้องปฏิบัติการและในภาคสนาม[1,2] การเลือกใช้วิธีใดขึ้นกับชนิดของยาปฏิชีวนะที่จะตรวจวิเคราะห์ ความรวดเร็ว ความถูกต้อง ความแม่นยำ ความยากง่ายของวิธี ราคา และระดับปริมาณที่ต้องการตรวจตามที่กฎหมายกำหนด[3] อย่างไรก็ตามวิธีตรวจสอบ ทางจุลชีววิทยา เป็นวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพอยู่ในเกณฑ์ดี มีความไว ไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษที่มีราคาแพง สามารถทราบปริมาณของสารที่ออกฤทธิ์หรือมีผลต่อจุลชีพ สำหรับวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการมีทั้งวิธี qualitative และ quantitative โดยในการตรวจสอบยาปฏิชีวนะ ชนิด β-lactams ในนมและผลิตภัณฑ์นม ใช้วิธีมาตรฐาน Disc assay กับเชื้อ B.stearothermophilus ซึ่งวิธีนี้มีการยอมรับและใช้กันอย่างกว้างขวาง นอกจากนั้นยังมีการตรวจสอบยาปฏิชีวนะในกลุ่ม Tetracycline และกลุ่มอื่นๆ โดยใช้วิธีเดียวกันหรือต่างกันขึ้นกับชนิดของสารที่ มีผลต่อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการตรวจสอบและชนิดของผลิตภัณฑ์นม[4,5,6] อย่างไรก็ตามวิธีที่ใช้ตรวจสอบถึงจะเป็นวิธีมาตรฐาน แต่ต้องใช้เวลาไม่น้อยกว่า 4-18 ชั่วโมงจึงจะทราบผล แต่ในอุตสาหกรรมการผลิตนม จำเป็นต้องทราบผลรวดเร็วในการตรวจสอบน้ำนมดิบว่าจะมียาตกค้างหรือไม่ มิฉะนั้นอาจทำให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคและมีผลต่อกรรมวิธีการผลิตดังที่กล่าวมาแล้ว กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยกองอาหาร จึงได้ผลิตชุดทดสอบอย่างง่ายและรวดเร็วเพื่อตรวจสอบสารตกค้าง โดยเฉพาะยาปฏิชีวนะ เพื่อให้สหกรณ์โคนม โรงงานผลิตนม และห้องปฏิบัติการสามารถนำไปตรวจสอบได้ด้วยตนเองไม่จำเป็นต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ เพื่อควบคุมคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นมให้มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค โดยเฉพาะเด็กในวัยเรียนให้เป็นไปตามนโยบายแห่งชาติเรื่องโครงการรณรงค์เพื่อการบริโภคนม

วัตถุและวิธีการ

สารมาตรฐาน

- Bacillus stearothermophilus ATCC 10149 จาก (Thermospore Suspension PM) จาก Difco Laboratories Detroit Michigan USA
- Penicillinase 10,000,000 Units จาก Difco Laboratories Detroit Michigan USA
- ยาปฏิชีวนะ 13 ชนิด ซึ่งได้รับการทดสอบและทราบความแรง (potency) จาก กองยา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้แก่ Penicillin, Ampicillin, Amoxicillin, Rifampicin Spiramycin, Tetracycline, Oxytetracycline, Chlortetracycline, Bacitracin, Erythromycin, Tyrosin, Kanamycin และ Sulfadimethoxine

ชุดทดสอบ Delvotest kit (Delvotest® P) จาก Gist - Brocades BSD B.V., PO BOX 1,2600 MA DELFT, THE NETHERLANDS

ตัวอย่างควบคุมและทำให้ยาเจือจาง นมรสจืด ขาดมันเนยหรือพร่องมันเนยชนิด ยู เอช ที สำหรับเป็น control negative และทำให้ยาปฏิชีวนะเจือจาง

อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy agar, Trypticase soy broth without dextrose, PM Indicator Agar, Antibiotic Medium 4 และ PBYA

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PBYA (Modified Nutrient agar) สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อให้สร้างสปอร์ มีสูตรดังนี้

Peptone	5.0	กรัม
Beef extract	3.0	กรัม
Yeast extract	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1	ลิตร
pH	6.8	

ต้มเดือดส่วนผสมอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดให้ละลาย ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้ได้ 6.8 แล้วเทลงในขวดแก้วขนาด 750 มิลลิลิตร ประมาณ 150 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ.15 นาที ตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 50°ซ. แล้ววางขวดเอียงในสภาพ slant ให้มีเนื้อที่ผิวหน้าสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อให้มากที่สุด

เครื่องมือและอุปกรณ์

Incubator, Water bath, Centrifuge, Mixer, Plastic tube ขนาด 50 มิลลิลิตร ขวดเหล้า (แก้ว) แม่โขงลักษณะแบนขนาด 750 มิลลิลิตร, Volumetric Pipet ขนาด 0.5, 1, 2, 5 และ 10 มิลลิลิตร, Volumetric flask ขนาด 25, 50 และ 100 มิลลิลิตร, Plastic centrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร, จานแก้วขนาด 20X 100 มิลลิเมตร และ Assay disc paper ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12.7 มิลลิเมตร

การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างนมดิบก่อนนำมาวิเคราะห์ ให้ความร้อนตัวอย่าง ใน Water bath ที่อุณหภูมิ 82°ซ. ± 2°ซ. เป็นเวลา 2 นาที เพื่อทำลายเชื้อซึ่งไม่ทนความร้อนที่ปนเปื้อนในตัวอย่าง นอกจากนั้นยังสามารถทำลายสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งเกิดขึ้นตามธรรมชาติ (natural inhibitor)[1] และไม่ทนความร้อน

การเตรียมสารมาตรฐาน

- Stock solutions เตรียมยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดทั้ง 13 ชนิด ให้มีความแรง 1000 ยูนิต/มิลลิลิตร หรือ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้ buffer และ reagent แต่ละชนิดเป็นตัวทำละลาย ทั้งนี้ขึ้นกับยาปฏิชีวนะ[5,6] แล้วเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า -30°ซ. ใช้ภายใน 6 เดือน
- Working standards จาก stock solution ของยาปฏิชีวนะแต่ละชนิด ทำให้เจือจางโดยใช้นมรสจืดขาดมันเนย ชนิด ยู เอช ที มีความแรง ดังนี้
- Penicillin Ampicillin และ Amoxicillin :- 0.002, 0.004, 0.008 และ 0.016 ยูนิต/มิลลิลิตร (IU/ml)
- Rifampicin :- 0.01,0.02,0.04และ 0.08 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
- Tetracycline,Oxytetracycline และ Chlortetracycline:- 0.05, 0.10, 0.20, 0.40 และ 0.80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
- Bacitracin :- 0.07, 0.14, 0.28, 0.56, 1.12 และ 2.24 ยูนิต/มิลลิลิตร
- Erythromycin :- 1.2, 2.4, 4.8 และ 9.6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
- Tyrosin :- 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 และ 2.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
- Kanamycin :- 1.0, 2.0, 4.0 และ 8.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
- Sulfadimethoxine ;- 1.0, 2.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
- Spiramycin ;- 1.6, 3.2, 5.0, 7.5 และ 10.0 ยูนิต/มิลลิลิตร (IU/ml)

การดำเนินการศึกษา แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน

ขั้นตอนที่หนึ่ง เตรียมสปอร์ของเชื้อ B.stearothermophilus var.calidolactis (ATCC 10149) เพื่อใช้ในการผลิตชุดทดสอบ (kit)

วิธีที่ 1 เตรียมสปอร์ ตามวิธีอ้างอิง[4] โดยเพาะเลี้ยงเชื้อ *B.stearothermophilus* var.calidolactis ATCC 10149 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy broth (TSB) ซึ่งไม่มีน้ำตาล dextroseและบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 64 ± 2°ซ[4]

วิธีที่ 2 เตรียมสปอร์ โดย streak เชื้อชนิดเดียวกันกับวิธีที่ 1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อTrypticase soy agar (TSA) บ่มเพาะเชื้อที่ 55°ซ. 24 ชั่วโมงแล้วใช้ loop เขี่ยโคโลนีที่มีขนาดใหญ่สุด streakใน TSA slant บ่มเพาะเชื้อที่ 55°ซ. 24 ชั่วโมงจากนั้นจึงทำเช่นเดียวกันติดต่อกัน 2 ครั้ง รวมทั้งหมด 3 ครั้ง ปิเปต น้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ซึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงใน TSA slant เพื่อล้างเชื้อออกจากผิวหน้าของ slant แล้วผสมเชื้อให้เข้ากัน ปิเปต 1.5 มิลลิลิตรของเชื้อ B.stearothermophilus suspension ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PBYA ในขวดแก้วเหล้าชนิดแบนที่เตรียมไว้ เอียงขวดให้เชื้อกระจายทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ เพาะเลี้ยงเชื้อดังกล่าวเป็น 2 ชุด แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อที่ 55 °ซ 1 ชุด และ 64 °ซ 1 ชุด ตรวจสอบสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จนกระทั่งเชื้อสร้างสปอร์ประมาณร้อยละ 80 ของเชื้อทั้งหมด ปกติประมาณ 4-5 วัน แล้วล้างสปอร์ออกจากผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้น้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อขวด แล้วรวมสปอร์ในน้ำเกลือเข้าด้วยกัน นำไป centrifuge ที่ 5000 รอบ/นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วล้างต่อด้วยน้ำเกลือ ทำเหมือนเดิมติดต่อกัน 3 ครั้ง ครั้งสุดท้ายเมื่อเทส่วนใสทิ้ง เหลือเฉพาะสปอร์ แล้วจึงเก็บเชื้อไว้ในน้ำเกลือโดยให้มีความเข้มข้นของสปอร์ประมาณ 60x106 ต่อมิลลิลิตร แบ่งเก็บในขวดเกลียวปิดสนิทที่อุณหภูมิ 4 °ซ ซึ่งสามารถเก็บไว้ใช้ได้ไม่ต่ำกว่า 6 เดือน เพื่อใช้ในการผลิตชุดทดสอบ

ขั้นตอนที่สอง เตรียมชุดทดสอบ

- ทดสอบปริมาณของสปอร์ที่เหมาะสมที่สุดเพื่อใช้เตรียมชุดทดสอบ โดยปิเปตสปอร์ (60 x 106 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ซึ่งเตรียมในขั้นตอนที่หนึ่ง วิธีที่ 2 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิลิตร ลงในแต่ละ 100 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ PM indicator agar ซึ่งหลอมละลายแล้วและอุณหภูมิประมาณ 50 °ซ ผสมให้เข้ากัน ปิเปตลงในหลอดพลาสติก ซึ่งฆ่าเชื้อแล้วหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร แล้วปิดฝาหลอด ปล่อยให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว จะได้ชุดทดสอบ ซึ่งมีความเข้มข้นของเชื้อร้อยละ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 ของอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วปิเปตนมขาดมันเนยรสจืดชนิด ยู เอช ที 0.1 มิลลิลิตร (100 ไมโครลิตร) ลงในแต่ละชุดทดสอบ ซึ่งมีความเข้มข้นของเชื้อดังกล่าวข้างต้น ทดสอบแต่ละความเข้มข้น 2 ซ้ำ (2 ชุด) นำชุดทดสอบวางบนแผ่นโฟม ซึ่งเจาะเป็นช่องแล้วนำไปลอยใน Water bath ตั้งแต่เปิดเครื่อง หรือที่อุณภูมิ 55 °ซ และจับเวลาเมื่อ อุณหภูมิ 64 °ซ ± 2 °ซ จนกระทั่งชุดทดสอบควบคุม (control negative) เปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลืองหมดทั้งหลอด จึงอ่านผล
- เปรียบเทียบชุดทดสอบ ซึ่งมีความเข้มข้นของสปอร์ของเชื้อซึ่งให้ปฏิกิริยาเร็วที่สุด โดยปิเปตนม ซึ่งใช้เป็นตัวอย่างควบคุม 0.1 มิลลิลิตร ลงในชุดทดสอบ 2 ชุด แต่ละชุดทำ 2 ซ้ำ (duplicate) แล้วแยกบ่มเพาะเชื้อใน Water bath ที่ 55 °ซ และอีกชุดที่ 64 °ซ

ขั้นตอนที่สาม ทดสอบประสิทธิภาพของชุดทดสอบ

- ใช้ชุดทดสอบหาปริมาณต่ำสุด (detection limit) ของยาปฏิชีวนะแต่ละชนิด รวม 13 ชนิด โดยปิเปต 0.1 มิลลิลิตร ของยาปฏิชีวนะ Penicillin working standard 0.002, 0.004, 0.008 และ 0.016 ยูนิต/มิลลิลิตร ลงในแต่ละชุดทดสอบ ที่ผลิตขึ้นเองและของ Delvo นำไปบ่มเพาะเชื้อที่ 64 °ซ ± 2 °ซ โดยแต่ละชุดทดสอบมีชุดทดสอบควบคุม (control negative) ของนมขาดมันเนย รสจืด 0.1 มิลลิลิตร ซึ่งไม่มียาปฏิชีวนะ อ่านผลเมื่อชุดทดสอบ ควบคุม เปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองทั้งหลอด จาก

นั้นจึงใช้ชุดทดสอบที่ผลิตขึ้น หาปริมาณต่ำสุดของยาปฏิชีวนะชนิดอื่นอีก 12 ชนิด โดยดำเนินการทดสอบเช่นเดียวกับ Penicillin แต่ชุดทดสอบของ Delvo ตรวจสอบยาปฏิชีวนะ รวมทั้งหมด 6 ชนิด

● ประเมินผลชุดทดสอบเพื่อหาความถูกต้อง (accuracy) ความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ของการตรวจสอบ[7,8] ทั้งนี้ใช้ชุดทดสอบตรวจวิเคราะห์สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในนมดิบรวม 108 ตัวอย่าง โดยปิเปต ตัวอย่างนม ซึ่ง ให้ความร้อนที่ 82 ± 2 °ซ, 2 นาที ลงในแต่ละชุดทดสอบ 0.1 มิลลิลิตร รวมทั้งชุดทดสอบควบคุมแต่ใช้นมรสจืด ขาดมันเนยชนิด ยู เอชที 0.1 มิลลิลิตร นำไปบ่มเพาะเชื้อใน Water bath ที่ 64 ± 2 °ซ อ่านผลเมื่อ ชุดทดสอบควบคุม เปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองทั้งหลอด สำหรับวิธีมาตรฐานใช้วิธี Disc assay[6] โดยใช้ 0.008 และ 0.016 ยูนิต/มิลลิลิตร ของ Penicillin เป็น control positive

● ใช้ชุดทดสอบและวิธีมาตรฐาน Disc assay ตรวจวิเคราะห์สารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในนมพาสเจอร์ไรส์ ซึ่งส่งวิเคราะห์จากเอกชน เพื่อขอขึ้นทะเบียนตำรับอาหารจำนวน 41 ตัวอย่าง วิเคราะห์เช่นเดียวกับนมดิบ ในกรณีที่พบสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ตรวจวิเคราะห์ต่อไป เพื่อยืนยันว่าเป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่ม β-lactams หรือไม่ โดยปิเปต 0.1 มิลลิลิตร ของเพนนิซิลินเนส (Penicillinase) ลงไปในตัวอย่างนมที่ให้ผลบวกประมาณ 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วปิเปตลงในชุดทดสอบ 0.1 มิลลิลิตร นำไปบ่มเพาะเชื้อใน Water bath ที่ 64 ± 2 °ซ อ่านผลเมื่อชุดทดสอบควบคุมเปลี่ยนสีจากม่วงเป็นเหลืองทั้งหลอด

● ใช้ชุดทดสอบที่ผลิตขึ้นและ ชุดทดสอบของ Delvo และวิธี Disc assay ตรวจสอบสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในนมดิบ 25 ตัวอย่าง ทั้งที่ ให้ความร้อน 82 ± 2 °ซ, 2 นาทีและไม่ให้ความร้อน ยกเว้นชุดทดสอบ Delvo ตรวจสอบเฉพาะนมที่ไม่ให้ความร้อน วิเคราะห์เช่นเดียวกับนมพาสเจอร์ไรส์

● ประเมินผลการใช้ชุดทดสอบจากแบบสอบถามซึ่งส่งให้โรงงานผลิตนมขนาดใหญ่ จำนวน 6 แห่ง เพื่อให้ทดลองใช้ชุดทดสอบกับนมดิบและผลิตภัณฑ์ที่ผลิตขึ้น

● ทดสอบอายุการใช้งาน ของชุดทดสอบ โดยเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 4 °ซ และนำมาทดสอบเช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้วทุกอาทิตย์ เป็นเวลา 4 เดือน

ผล

การเพาะเลี้ยงเชื้อ *B.stearothermophilus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ซึ่งไม่มีน้ำตาล dextrose ตามวิธีที่ 1 แล้วสังเกตปริมาณสปอร์ที่เชื้อสร้างขึ้นภายใต้กล้องจุลทัศน์ พบว่าเชื้อสร้างสปอร์ทั้งที่ 55 °ซ และ 64 °ซ เพียงร้อยละ 10 เท่านั้น นอกจากนั้นเป็นเซลของเชื้อ สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B.stearothermophilus* บนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในขวดเหล้าชนิดแบน ตามวิธีที่ 2 พบว่าเชื้อสร้างสปอร์ประมาณ ร้อยละ 80 และร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิบ่มเพาะเชื้อ 55 °ซ และ 64 °ซ ตามลำดับ โดยใช้เวลา 4-5 วัน ดังรูปที่ 1

การทดสอบความเข้มข้นของสปอร์ที่เหมาะสมเพื่อใช้เตรียมชุดทดสอบตั้งแต่ร้อยละ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PM indicator agar พบว่าบ่มเพาะเชื้อที่ 64 °ซ ชุดทดสอบเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลืองภายในเวลา 3, 3, 3.5 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ แต่เนื่องจากเก็บสปอร์ไว้นาน ปริมาณของสปอร์ที่มีชีวิตอาจลดน้อยลงจึงใช้ความเข้มข้นของสปอร์ ร้อยละ 1 แทนที่จะใช้ร้อยละ 0.5 ในการเตรียมชุดทดสอบ

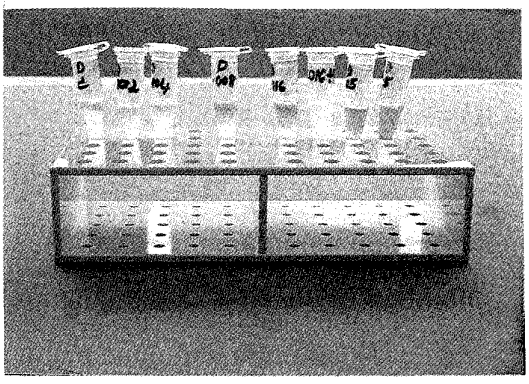
จากการเปรียบเทียบอุณหภูมิในการบ่มเพาะเชื้อใน Water bath ที่ 55 °ซ และ 64 °ซ พบว่าชุดทดสอบ จะให้ปฏิกิริยาเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นเหลือง

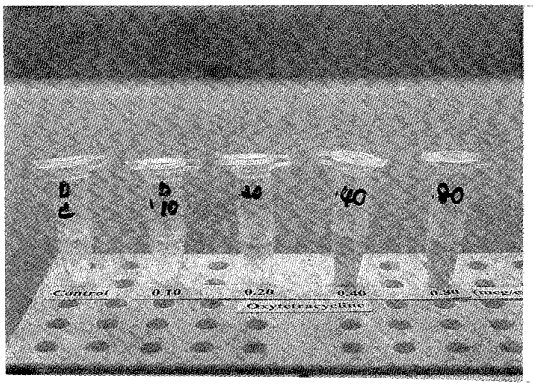
มากกว่า 4 และ 3-3 ชั่วโมง 15 นาที ตามลำดับ

การหาปริมาณต่ำสุดของยาปฏิชีวนะ ซึ่งชุดทดสอบที่ผลิตขึ้นสามารถตรวจสอบได้ พบว่าชุดทดสอบจะมีความไวกับยาปฏิชีวนะในกลุ่ม β-lactams สูงสุด เช่น Penicillin Ampicillin และ Amoxicillin โดยตรวจหาปริมาณต่ำสุดของยาดังกล่าวได้ 0.004 ยูนิต/มิลลิลิตร เทียบเท่ากับชุดทดสอบของ Delvo สำหรับยาปฏิชีวนะอื่นๆ ได้แก่ Tetracycline Oxytetracycline Chlortetracycline Erythromycin Tyrosin Rifampicin Kanamycin Sulfadimethoxine Spiramycin และ Bacitracin ชุดทดสอบสามารถตรวจหาปริมาณต่ำสุดของยาดังกล่าวได้ 0.10, 0.10, 0.05, 0.60, 0.0625, 0.01, 2, 6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 7.5 และ 0.56 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณต่ำสุดซึ่งชุดทดสอบที่ผลิตขึ้นตรวจสอบได้ พบว่าเทียบเท่ากับชุดทดสอบของ Delvo ที่ตรวจสอบได้ทั้ง 6 ชนิด ดังตารางที่ 1 รูปที่ 2 (Penicillin) และ รูปที่ 3 (Oxytetracycline)

ตารางที่ 1 ปริมาณต่ำสุดซึ่งชุดทดสอบที่ผลิตขึ้นและ Delvotest kit สามารถตรวจสอบยาปฏิชีวนะและสารต้านจุลชีพ

ลำดับที่	ชนิดของยาปฏิชีวนะ	ปริมาณต่ำสุด (Detection limit) ยูนิต/มิลลิลิตรหรือไมโครกรัม/มิลลิลิตร	
		ชุดทดสอบที่ผลิตขึ้น	Delvotest kit
1	Penicillin	0.004	0.004
2	Amoxicillin	0.004	0.004
3	Rifampicin	0.01	0.01
4	Tetracyeline	0.10	0.10
5	Oxytetracycline	0.10	0.10
6	Tyrosin	0.0625	0.0625
7	Ampiccilin	0.004	-
8	Chlortetracycline	0.05	-
9	Erythromycin	0.60	-
10	Bacitracin	0.56	-
11	Spiramycin	7.5	-
12	Kanamycin	2.0	-
13	Sulfadimethoxine	6.0	-





ผลวิเคราะห์เปรียบเทียบนมดิบจำนวน 108 ตัวอย่าง โดยใช้ชุดทดสอบที่ผลิตขึ้นกับวิธีมาตรฐาน (Disc assay) พบว่าวิธี Disc assay ตรวจพบสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 13 ตัวอย่างและชุดทดสอบที่ผลิตขึ้นตรวจพบ 22 ตัวอย่าง เมื่อนำผลที่ได้มาประเมินผลชุดทดสอบพบว่ามีความถูกต้องร้อยละ 91.7 มีความไวของการตรวจสอบร้อยละ 100 และมีความจำเพาะของการตรวจสอบร้อยละ 90.5 ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การประเมินประสิทธิภาพของชุดทดสอบที่ใช้ในการตรวจหาสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน (Disc assay)

ผลการตรวจสอบนมดิบ โดยใช้ชุดทดสอบ(ตัวอย่าง)	ผลการตรวจสอบนมดิบ โดยใช้วิธี Disc assay (ตัวอย่าง)		จำนวนตัวอย่างนมดิบ ทั้งหมด
ผลบวก	13 TP	9 FP	22
ผลลบ	0 FN	86 TN	86
จำนวนตัวอย่างนมดิบทั้งหมด	13	95	108

- TP = True positive
- FP = False positive
- FN = False negative
- TN = True negative

1. ความถูกต้อง (Accuracy) $= \frac{TP+TN}{(TP+FP)+FN+TN} \times 100 = \frac{13+86}{13+9+0+86} \times 100$

$= \frac{99}{108} \times 100 = 91.7\%$

2. ความไว (Sensitivity) $= \frac{TP}{TP+FN} \times 100 = \frac{13}{13+0} \times 100$

$= \frac{13}{13} \times 100 = 100\%$

3. ความจำเพาะ (Specificity) $= \frac{TN}{TN+FP} \times 100 = \frac{86}{86+9} \times 100$

$= \frac{86}{95} \times 100 = 90.5\%$

จากการใช้ชุดทดสอบเปรียบเทียบกับวิธี Disc assay สำหรับตรวจวิเคราะห์สารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยเฉพาะยาปฏิชีวนะในนมพาสเจอร์ไรส์ ซึ่งส่งวิเคราะห์เพื่อควบคุมคุณภาพและเพื่อขึ้นทะเบียนตำรับอาหาร 41 ตัวอย่าง พบว่าวิธี Disc assay ตรวจพบยาปฏิชีวนะ β-lactams 2 ตัวอย่าง ปริมาณเทียบเท่า Penicillin 0.008 และ 0.008-0.016 ยูนิต/มิลลิลิตร สำหรับชุดทดสอบตรวจวิเคราะห์พบสารยังยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 4 ตัวอย่าง โดย 2 ตัวอย่าง เป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่ม β-lactams ปริมาณมากกว่า 0.008 ยูนิต/มิลลิลิตร ซึ่งเป็นตัวอย่างที่วิธี Disc assay ตรวจพบเช่นเดียวกัน และอีก 2 ตัวอย่าง พบในปริมาณน้อยกว่า 0.008 ยูนิต/มิลลิลิตร และเมื่อทดสอบด้วย Penicillinase ปรากฏว่าเป็นสารชนิดอื่น ไม่ใช่ β-lactams นอกจากนั้นยังพบว่านมพาสเจอร์ไรส์ที่มีการปรุงแต่งสี ได้แก่ ช็อคโกแลต และสตรอเบอรี่ จะไม่ทำให้การอ่านผลผิดไป ยกเว้นนมช็อกโกแลต ซึ่งมีส่วนผสมของคาราเมล ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการตรวจสอบนมพลาสเจอร์ไรส์ โดยใช้ชุดทดสอบที่ผลิตขึ้น และวิธี Disc assey

ชนิดของตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์	จำนวนตัวอย่าง	พบสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (ตัวอย่าง)	
		ชุดทดสอบ	Disc assey
นมสด	7	1 (มากกว่า 0.008*)	1 (0.008-0.016*)
นมสดพร่องมันเนย	2	1 (มากกว่า 0.008*)	1 (0.008 *)
นมคืนรูป	6	1 **	0
นมปรุงแต่งรสหวาน	10	1 **	1 (0.008-0.016*)
นมปรุงแต่งรสชอคโกแลต	9	0	1 (0.008 *)
นมปรุงแต่งรสสตรอเบอรี่	5	0	0
นมปรุงแต่งรสน้ำผึ้ง	2	0	0
รวม	41	4	2

* ความแรงเทียบเท่า Penicillin (ยูนิต/มิลลิลิตร)

** สารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นยกเว้น ยาปฏิชีวนะในกลุ่ม β-lactams

จากผลวิเคราะห์เปรียบเทียบการใช้ชุดทดสอบที่ผลิตขึ้น กับชุดทดสอบ Delvo และวิธี Disc assay ตรวจสอบสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในนมดิบ 25 ตัวอย่าง ซึ่งให้ความร้อนและไม่ให้ความร้อนที่ 82±2 °ซ, 2 นาที ยกเว้นชุดทดสอบ Delvo ตรวจสอบเฉพาะนมที่ไม่ผ่านความร้อน พบว่า วิธี Disc assay ให้ผลเหมือนกันทั้งน้ำนมดิบที่ผ่านและไม่ผ่านความร้อน คือ พบยาตกค้างเทียบเท่า Penicillin 0.008-0.016 ยูนิต/มิลลิลิตร 1 ตัวอย่าง และมากกว่า 0.016 ยูนิต/มิลลิลิตร 1 ตัวอย่าง ชุดทดสอบ Delvo ให้ผลบวกสำหรับนมที่ไม่ผ่านความร้อน 4 ตัวอย่าง ปริมาณเทียบเท่า Penicillin น้อยกว่า 0.008 ยูนิต/มิลลิลิตร 2 ตัวอย่างและ 0.008-0.016 ยูนิต/มิลลิลิตร 2 ตัวอย่าง และชุดทดสอบที่ผลิตขึ้นให้ผลนมที่ผ่านความร้อน เช่นเดียวกับชุดทดสอบ Delvo แต่นมที่ไม่ผ่านความร้อนให้ผลบวก 8 ตัวอย่าง

การทดสอบอายุการใช้งาน (stability and shelflife) ของชุดทดสอบ พบว่าหลังจาก 4 เดือน แล้วชุดทดสอบยังมีประสิทธิภาพ เช่นเดียวกับเมื่อผลิตใหม่ๆ

แต่ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงเล็กน้อย

ในการส่งชุดทดสอบพร้อมแบบสอบถาม ให้โรงงานผลิตนมขนาดใหญ่ จำนวน 6 แห่ง ได้รับตอบกลับมา 3 แห่ง 1 แห่ง พอใจในประสิทธิภาพของชุดทดสอบ 1 แห่งแจ้งว่าจำนวนชุดทดสอบที่ให้ไปทดสอบน้อยไม่สามารถสรุปร้อยละของความแตกต่างที่ได้ว่ายอมรับหรือไม่ และอีก 1 แห่ง ไม่พอใจในการบ่มเพาะเชื้อโดยใช้ Water bath

วิจารณ์

วิธีวิเคราะห์ที่รวดเร็วโดยทั่วไป เป็นที่คาดหวังว่าเป็นวิธีที่เสียค่าใช้จ่ายน้อย สะดวกรวดเร็ว ผู้ใช้ได้รับการอบรมระดับหนึ่งจะสามารถตรวจสอบได้ผลเป็นที่น่าเชื่อถือ[3] นอกจากนั้นยังตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างแต่ละครั้งได้เป็นจำนวนมาก เป็นทั้งวิธีตรวจสอบเอกลักษณ์ (qualitative) หรือตรวจสอบในเชิงปริมาณ (semiquantitative) สำหรับชุดทดสอบที่ผลิตขึ้นนี้ ใช้หลักการในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B.stearothermophilus* ซึ่งจะมีความไวต่อยาปฏิชีวนะ Penicillin หรือยาในกลุ่ม β-lactams สูงมาก[2] การเลือกตรวจสอบสารตกค้างของกลุ่มยาดังกล่าวในนมหรือผลิตภัณฑ์นม เนื่องจากเกษตรกรได้ใช้ยากลุ่มนี้ในการควบคุมและรักษาโรคเต้านมอักเสบในโคนม และรีดนม โดยไม่หยุดยาตามที่กำหนด[2] จึงทำให้มียาตกค้างในนมและผลิตภัณฑ์นม สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อของชุดทดสอบประกอบด้วยสิ่งสำคัญคือ น้ำตาล glucose และมี bromcresol purple เป็น indicator โดย pH 6.8 อาหารเลี้ยงเชื้อจะเป็นสีม่วงและ pH 5.2 จะเป็นสีเหลือง ถ้าไม่มียาปฏิชีวนะหรือสารยับยั้งชนิดอื่น เชื้อ *B.stearothermophilus* จะเจริญอย่างรวดเร็วและสร้างกรดขึ้นโดยใช้น้ำตาล glucose ในอาหารเลี้ยงเชื้อและ indicator จะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง แต่ถ้ามีสารดังกล่าวจะยับยั้งการเจริญของเชื้อ และ metabolic activity ในการเพิ่มความเป็นกรด จะลดน้อยลงหรือถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ สีของอาหารเลี้ยงเชื้อจะคงเป็นสีม่วง หรือม่วง-เหลืองม่วงอ่อนหรือม่วงเข้ม โดยจะเกิดขึ้นกับ ปริมาณของสารตกค้างฯ ทั้งนี้จะมีหลักการคล้ายคลึงกับชุดทดสอบของ Delvo[1] ชุดทดสอบนี้สามารถตรวจสอบในเชิงปริมาณได้ โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ดังนั้นจึงต้องทราบชนิดของสารที่จะตรวจวิเคราะห์เพราะชุดทดสอบที่ผลิตขึ้นสามารถตรวจสอบยืนยันรายงานได้ เฉพาะยาในกลุ่ม β-lactams โดยใช้ Penicillinase เช่นเดียวกับวิธี Disc assay[1,4,5,6] อย่างไรก็ตามชุดทดสอบในลักษณะนี้จะมีข้อจำกัดเนื่องจากเชื้อที่ใช้ในการผลิตชุดทดสอบเป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ ที่อุณหภูมิสูง 55-64 °ซ (Thermophilic bacteria) และเพื่อให้การตรวจสอบต้องรวดเร็ว จึงจำเป็นต้องใช้ Water bath บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิดังกล่าว

การเตรียมชุดทดสอบจำเป็นต้องใช้สปอร์ของเชื้อเพราะสามารถเก็บไว้ได้นาน ที่อุณหภูมิ 4 °ซ ดังนั้นก่อนผลิตชุดทดสอบจำเป็นต้องผลิตสปอร์ของเชื้อ *B.stearothermophilus* (รูปที่ 1) หรืออาจสั่งซื้อจากต่างประเทศ ซึ่งมีราคาแพง 1 มิลลิลิตร ราคาประมาณ 300 บาท และต้องเสียเวลาในการสั่งซื้อ อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงเชื้อให้สร้างสปอร์โดยวิธีตามหนังสืออ้างอิง[1,4,5,6] พบว่าเชื้อสร้างสปอร์น้อยมาก เป็นไปได้อาจมีเทคนิคพิเศษ ซึ่งไม่ได้แจ้งไว้ในวิธีดังกล่าว ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาและทดสอบเพื่อให้ได้อาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิและเวลาในการบ่มเชื้อที่ดีที่สุดเพื่อให้เชื้อสร้างสปอร์ประมาณร้อยละ80 (รูปที่ 1) และในที่สุดจึงพบอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar ชนิดหนึ่งนำมาเพาะเลี้ยงเชื้อ B.stearothermophilus ให้สร้างสปอร์ที่อุณหภูมิ 55 °ซ เป็นเวลา 4-5 วัน นอกจากนั้น การศึกษานี้ยังดัดแปลงภาชนะสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อให้สร้างสปอร์เป็นจำนวนมากโดยแทนที่จะใช้ Roux bottle [4] ซึ่งมีราคาแพง และต้องสั่งซื้อต่างประเทศ แต่นำขวดเหล้าชนิดแบน ซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งมาใช้ประโยชน์ และพบว่าซึ่งพบว่าใช้ได้ดี ทั้งนี้เพราะขวดเหล้าชนิดแบน มีลักษณะใกล้เคียงกับ Roux bottle และสามารถทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้

ความร้อนชื้น เพียงแต่หลังจากการฆ่าเชื้อ ต้องปล่อยให้เย็นลงก่อน จึงนำไปล้างทำความสะอาด มิฉะนั้นจะทำให้ขวดแตกได้

จากการใช้ชุดทดสอบที่ผลิตขึ้นและชุดทดสอบ Delvo ตรวจสอบปริมาณต่ำสุดของยาปฏิชีวนะจำนวน 13 ชนิด แต่เนื่องจากชุดทดสอบของ Delvo ต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ และ มีราคาแพง ชุดละประมาณ 75 บาท จึงสุ่มทดสอบยาปฏิชีวนะ เพียง 6 ชนิด (ตารางที่ 1) พบว่าชุดทดสอบที่ผลิตขึ้นสามารถตรวจสอบปริมาณต่ำสุดของยาปฏิชีวนะในกลุ่ม β-lactams ได้ในระดับต่ำกว่ายาปฏิชีวนะ หรือยาต้านจุลชีพชนิดอื่น (รูปที่ 2) ทั้งนี้เพราะเชื้อ B.stearothermophilus มีความไวกับยาปฏิชีวนะ ในกลุ่มดังกล่าวมาก[2] ดังจะเห็นได้จากเกือบทุกวิธีที่มีการตรวจสอบยาปฏิชีวนะกลุ่ม β-lactams ในนมและผลิตภัณฑ์นมจะใช้ *B.stearothermophilus* [1,4,5,6] สำหรับยาปฏิชีวนะชนิดอื่น สามารถใช้ชุดทดสอบนี้ตรวจสอบได้ แต่ Kanamycin, Sulifadimethoxine และ Spiramycin ชุดทดสอบจะตรวจสอบได้เมื่อมีสารดังกล่าวตกค้างในปริมาณ ค่อนข้างสูงคือ 2.0 และ 6.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 7.5 ยูนิต/มิลลิลิตรตามลำดับ ดังนั้นถ้าต้องการตรวจสอบยาดังกล่าวในระดับต่ำ คงต้องเปลี่ยนไปใช้วิธีเคมี หรือชุดทดสอบชนิดอื่น และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างชุดทดสอบที่ผลิตขึ้นกับชุดทดสอบของ Delvo ในการตรวจสอบปริมาณต่ำสุดของยาปฏิชีวนะในนม พบว่าสอดคล้องกันทั้ง 6 ชนิด บ่งชี้ว่าชุดทดสอบที่ผลิตขึ้นมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับที่ซื้อจากต่างประเทศ การที่นำชุดทดสอบของ Delvo ศึกษาเปรียบเทียบกับชุดทดสอบที่ผลิตขึ้นนั้น เพราะชุดทดสอบดังกล่าวได้มีการตรวจสอบยืนยันผลแล้ว (validation) นอกจากนั้นยังหาซื้อจากตัวแทนจำหน่ายในประเทศได้

จากการประเมินผลประสิทธิภาพของชุดทดสอบโดยตรวจหาปริมาณต่ำสุดของยาปฏิชีวนะซึ่งชุดทดสอบตรวจสอบได้แล้ว การทดสอบความถูกต้อง ความไว ความจำเพาะ และความคงตัวของชุดทดสอบเป็นสิ่งสำคัญและผู้ผลิตชุดทดสอบจำเป็นต้องตรวจสอบ (ตารางที่ 2) เพราะเมื่อไปถึงผู้ใช้แล้ว การทดสอบเหล่านี้ไม่สามารถดำเนินการได้[2] สำหรับชุดทดสอบที่ผลิตขึ้น มีความถูกต้อง ความไว และความจำเพาะคิดเป็นร้อยละ 91.7 100 และ 90.5ตามลำดับ ค่าparameters ทั้ง 3 อย่างนี้ใกล้เคียงกับค่าร้อยละ 100 บ่งชี้ว่าชุดทดสอบที่ผลิตขึ้นมีประสิทธิภาพเป็นที่น่าพอใจและเป็นไปตามเกณฑ์กำหนดของชุดทดสอบซึ่งผลิตจากต่างประเทศ[2] การหาค่าดังกล่าวนอกจากเป็นการประกันความถูกต้องของชุดทดสอบที่ผลิตขึ้นเพื่อตรวจวิเคราะห์ยาตกค้างในนมและผลิตภัณฑ์นม ยังเป็นการประกันคุณภาพห้องปฏิบัติการด้วย[8] แต่ชุดทดสอบที่ผลิตขึ้นยังมีข้อเสียคือ ระยะเวลาในการอ่านผลจะกินเวลานานกว่าชุดทดสอบของต่างประเทศ ประมาณ 30 นาที สาเหตุอาจเนื่องจากสปอร์ของเชื้อที่ใช้ผลิตชุดทดสอบ ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือลักษณะของภาชนะยังไม่เหมาะสม ซึ่งคงต้องศึกษาและแก้ไขต่อไป

การที่ชุดทดสอบที่ผลิตขึ้นตรวจสอบนมพาสเจอร์ไรส์จำนวน 41 ตัวอย่าง พบว่าตรวจพบสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในนมพาสเจอร์ไรส์ 4 ตัวอย่าง แต่วิธี Disc assay ตรวจสอบได้ 2 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3) โดย 2 ตัวอย่างซึ่งวิธี Disc assay ตรวจไม่พบเพราะ 1 ตัวอย่างตรวจพบสารตกค้างเพียงเล็กน้อย จะสังเกตได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองเกือบหมด มีเฉพาะขอบบนเป็นสีม่วง ดังนั้นตัวอย่างนี้ วิธี Disc assay จึงตรวจไม่พบสารตกค้าง เพราะปริมาณต่ำสุด ซึ่งวิธี Disc assay ตรวจสอบได้ จะสูงกว่าชุดทดสอบตรวจวิเคราะห์ได้ สำหรับอีกตัวอย่างหนึ่งอาจเป็นสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียซึ่งเกิดขึ้นตามธรรมชาติในนม และทนความร้อน (heat stable inhibitor) แต่เวลาที่บ่มเพาะเชื้อสำหรับวิธีมาตรฐานกินเวลานานโดยบ่มเพาะเชื้อที่ 55 °ซ, 16-18 ชั่วโมง หรือที่ 64 °ซ ประมาณ4 ชั่วโมง อาจจะทำลายสารดังกล่างว วิธี Disc assay จึงตรวจไม่พบ ส่วนชุดทดสอบใช้เวลาเพียง 3 ชั่วโมง สารยับยั้ง

การเจริญของแบคทีเรีย ยังไม่ถูกทำลายจึงตรวจพบได้ อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถบอกสาเหตุได้ชัดเจน คงต้องศึกษาให้ละเอียดถึงข้อมูลของการใช้ยาในฟาร์ม หรือใช้วิธีทางเคมีตรวจสอบยืนยันชนิดของสารตกค้างในนมว่าเป็นชนิดใด จึงจะบอกได้ว่าตัวอย่างนั้นมีสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งเกิดขึ้นตามธรรมชาติ ตกค้างอยู่หรือเป็นสารชนิดอื่น

การให้ความร้อนนมดิบที่อุณหภูมิ 82 ± 2 °ซ เป็นเวลา 2 นาที นั้น สามารถทำลายสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งเกิดขึ้นตามธรรมชาติและไม่ทนความร้อน นอกจากนั้นยังสามารถฆ่าเชื้อซึ่งอาจปนเปื้อนในนมดิบมากเกินไป และรบกวนการทดสอบได้[2] จากการศึกษาในนมดิบ 25 ตัวอย่าง พบว่าวิธี Disc assay ซึ่งใช้ในงานประจำไม่ว่าจะให้ความร้อนตัวอย่างนมหรือไม่ก็ไม่ต่างกัน คือพบยาปฏิชีวนะ ในกลุ่ม β-lactams เทียบเท่า Penicillin มากกว่า 0.008 ยูนิต/มิลลิลิตร 2 ตัวอย่าง แต่อีก 2 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบสารดังกล่าว แต่ชุดทดสอบทั้งที่ผลิตขึ้นและของ Delvo ตรวจพบนั้น เพราะปริมาณของสารตกค้างฯ มีปริมาณน้อยกว่าปริมาณต่ำสุดที่วิธี Disc assay จะตรวจสอบได้ ทั้งนี้จะสอดคล้องกับผลวิเคราะห์ในนมพาสเจอร์ไรส์ดังที่กล่าวมาแล้ว และจะสอดคล้องกับรายงานวิจัยที่ว่าวิธีที่รวดเร็วจะมีความไวมากกว่าวิธี Disc assay[3] ในเวลาเดียวกัน ชุดทดสอบที่ผลิตขึ้นจะมีความไวมากกว่าชุดทดสอบ Delvo โดยนมที่ไม่ผ่านความร้อนจะตรวจพบสารยับยั้ง การเจริญของแบคทีเรียซึ่งเกิดขึ้นตามธรรมชาติและไม่ทนความร้อน แต่ชุดทดสอบของ Delvo ตรวจไม่พบสารดังกล่าว ความไว ของชุดทดสอบนี้ อาจจะมีประโยชน์ ต่ออุตสาหกรรมการผลิตนม ซึ่งใช้นมดิบเป็นวัตถุดิบ เพราะสารดังกล่าวอาจไปยับยั้งจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก ส่งผลเสียต่ออุตสาหกรรมการผลิต แต่ถ้าใช้วิธีอื่นจะไม่ทราบว่านมดิบมีสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียซึ่งเกิดขึ้นตามธรรมชาติ

ความคงทนและอายุการใช้งานของชุดทดสอบเป็นสิ่งสำคัญ ซึ่งต้องพิจารณา แต่ละรุ่นของชุดทดสอบที่ผลิตขึ้นจะแตกต่างกันในเรื่องระยะเวลาของการอ่านผล บางรุ่นกินเวลา 3 ชั่วโมง และบางรุ่น 3 ชั่วโมง 15 นาที ทั้งนี้อาจจะขึ้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อ และประสิทธิภาพของเชื้อ พบว่าชุดทดสอบที่ผลิตขึ้นหลังจาก4เดือนแล้วคุณภาพยังไม่เปลี่ยนแปลง

การประเมินผลจากการส่งตัวอย่างชุดทดสอบและแบบสอบถาม ไปให้สถานที่ผลิตนม พบว่าโรงงานยังไม่ให้ความสนใจเท่าที่ควร ทั้งๆที่ชุดทดสอบนี้มีประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมผลิตนม แต่ละปีโรงงานดังกล่าวต้องซื้อชุดทดสอบเป็นจำนวนมาก ทำให้สูญเสียเงินตราให้ต่างประเทศและไม่สามารถพึ่งตนเองได้ ทั้งชุดทดสอบที่ผลิตขึ้นมีราคาถูกชุดละไม่เกิน 15 บาท ซึ่งราคาต่ำกว่าชุดทดสอบของ Delvo ถึง 5 เท่า การตรวจสอบง่ายกว่า Delvo โดยเติมเฉพาะตัวอย่างนมเพียงอย่างเดียว ส่วนชุดทดสอบของ Delvo ต้องเติมอาหารเลี้ยงเชื้อในชุดทดสอบด้วย

สรุป

จากการศึกษาผลิตชุดทดสอบสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย พบว่าชุดทดสอบนี้ สามารถตรวจสอบในเชิงปริมาณไม่ใช่เฉพาะยาปฏิชีวนะยังสามารถตรวจสอบสารต้านจุลชีพอื่นๆ รวมทั้งสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียซึ่งเกิดขึ้นตามธรรมชาติในนมและผลิตภัณฑ์นม เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน พบว่าชุดทดสอบที่ผลิตขึ้นมีขั้นตอนในการวิเคราะห์ง่ายและรวดเร็ว สามารถตรวจสอบปริมาณต่ำสุดของยาปฏิชีวนะ ในกลุ่ม Penicillin และ Oxytetracycline ได้ต่ำกว่าวิธีมาตรฐาน นอกจากนั้นยังพบว่าประสิทธิภาพของชุดทดสอบที่ผลิตขึ้นเทียบเท่ากับชุดทดสอบ Delvo ซึ่งผลิตจากต่างประเทศ มีราคาถูกกว่า 5 เท่า แต่ระยะเวลาที่ใช้ตั้งแต่วิเคราะห์ถึงการอ่านผลช้ากว่าประมาณ 30 นาที ดังนั้นสิ่งที่ต้องพัฒนาต่อไป สำหรับชุดทดสอบนี้ คือระยะเวลาในการตรวจสอบให้เร็วขึ้นเทียบเท่ากับของต่างประเทศ และ

พัฒนาชุดทดสอบนี้ตรวจสอบยกตกค้างในอาหารประเภทอื่นต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการกองอาหาร นางสาวทัศนีย์ จุฬามรกต ที่ให้การสนับสนุนการวิจัย และขอขอบคุณบริษัทอุตสาหกรรมนมไทย องค์การส่งเสริมกิจการโคนมไทยเดนมาร์คและบริษัทโฟร์โมสต์ ที่ให้ความร่วมมือในการให้นมดิบและตอบแบบสอบถามสำหรับการวิจัย ครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Bishop, J.R., Senyk, G.F. and Duncan, S.E. 1992. Detection of antibiotic/drug residues in milk and dairy products. in : Marshall, R.T. ed, Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 16 th ed. American Public Health Association, Washington DC. p 347-395
2. Oka, H., Nakazawa, H., Harada, K-I. and Macneil, J.D. eds 1995. Chemical Analysis for Antibiotics used in Agriculture. AOAC INTERNATIONNAL. Arlington. p 1-437
3. Senyk, G.F., Davidsan, J.H., Brown, J.M., Hallstead, E.R. and Sherbon, J.W. 1990. Camparison of rapid tests used to detect antibiotic residues in milk. J. Food Prot 53 (2) : 158
4. Maturin, L.J 1995. Inhibitory substance in milk. in : Anonymous, Bacteriological Analytical Manual 8 th ed. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg. p 20.01-20.06
5. Cunniff. P. ed 1996.Official Methods of Analysis of AOAC International. volume2, 6 th ed. AOAC INTERNATIONAL Gaithersburg. Chapter 33, p 38-44
6. Richardson, G.H., Associate chapt. ed, 1990 Dairy products. in : Helrich, K. ed. Official Methods of Analysis of AOAC, volume 2, 15 th ed. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg. p 825-827
7. ไพบูลย์ โล่ห์สุนทร การทดสอบเพื่อตรวจคัดโรคและวินิจฉัยโรค ใน : ไพบูลย์ โล่ห์สุนทร, พรณรงค์ โชติวรรณ, องอาจ วิพุธศิริ และ ภิรมย์ กมลรัตนกุล วิทยาการระบาดประยุกติ ภาควิชาเวชศาสตร์ป้องกันและสังคม คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หน้า 18-25
8. สมพงษ์ จินายน.2529 หลักการประเมินผลคุณสมบัติของเทคนิควิเคราะห์ ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โรงพิมพ์ตีรณสาร กรุงเทพฯ หน้า 27-35