หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

ข้อสรุปและอภิปรายผลการวิจัย

1. การเตรียมชุดตรวจ

การเลี้ยง *B. stearothermophilus* NIZO ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (Broth medium) และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (Agar medium) ปริมาตร 10 ลิตรที่อุณหภูมิ $65^{\circ}\pm1^{\circ}$ ซ. เมื่อใช้เวลาในการเลี้ยงเท่ากันพบว่า เชื้อที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งได้จำนวนเชื้อ (CFU/ml) มากกว่าจำนวนเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว และเมื่อเปรียบเทียบจำนวนเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกัน แต่ใช้เวลาในการเลี้ยงต่างกัน (เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 18-20 ชม. และ 72 ชม., เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 18-20 ชม. และ 72 ชม.) พบว่า จำนวนเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อนาน 18-20 ชม. มากกว่าจำนวนเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อนาน 72 ชม. (จำนวนเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งปริมาตร 10 ลิตร เมื่อใช้เวลาเลี้ยงเชื้อนาน 18-20 ชม. เท่ากับ 3×10^{5} CFU/ml และ 1.12×10^{14} CFU/ml และการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวนาน 72 ชม. ได้ปริมาณเชื้อ 2.5×10^{6} CFU/ml และ 6.2×10^{8} CFU/ml ตามลำดับ)

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปัจจัยที่คาดว่าเป็นตัวกำหนดการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิดคือ ปริมาณออกซิเจนในสภาพแวดล้อม เนื่องจาก *B. stearothermophilus* เป็นแบคทีเรียที่เจริญในอุณหภูมิสูงและต้องการออกซิเจนอย่างมาก (Thermophilic, strictly aerobic bacteria) (74-77) โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญที่ 55°-65° ซ. (78-79) แต่เนื่องจากปริมาณออกซิเจนซึ่งละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่อุณหภูมิ 55° ซ. เท่ากับครึ่งหนึ่งของปริมาณออกซิเจนซึ่งละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่อุณหภูมิ 30° ซ. (80-82) และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นปริมาณออกซิเจนในสารละลายยิ่งลดลง (74, 77, 81) ดังนั้นการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งบนจานเพาะเชื้อซึ่งมีพื้นผิวกว้าง จะทำให้มีอัตราการเจริญของเชื้อมากกว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวซึ่งบรรจุอยู่ในขวดหรือฟลาสค์ (flask) ที่มีปากแคบและไม่มีการเขย่า (shaking) เพื่อให้เชื้อได้สัมผัสออกซิเจน เนื่องจากการเลี้ยงเชื้อบนจานเพาะเชื้อทำให้เชื้อมีโอกาสสัมผัสออกซิเจนอย่างเพียงพอ ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการทดลองของ Imsenecki และ Solzeva ซึ่งสรุปว่า ภาวะขาดออกซิเจนเป็นปัจจัยสำคัญที่จำกัดการเจริญของแบคทีเรียที่เจริญในอุณหภูมิสูง (83) และ Allen กล่าวว่า ภาวะขาดออกซิเจน (Oxygen starvation) ทำให้เวลาที่ใช้ในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Generation time) ของ Thermophilic bacteria เพิ่มขึ้นจากเวลาที่ใช้ในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าของแบคทีเรียดังกล่าว ในภาวะที่มีออกซิเจนอย่างเพียงพอ (81) Tanner และ Wallace ได้ทดลองเลี้ยง Thermophilic spore former ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีชั้นของอาหารเลี้ยงเชื้อหนาโดยปราศจากการเติมอากาศ (aeretion) ที่ 55° ซ. และพบว่า ในภาวะดังกล่าว Generation time ของเชื้อที่ทดสอบเท่ากับ 24 ชม. (84) ในขณะที่ Hansen ทดลองเลี้ยงเชื้อดังกล่าวในภาวะเดียวกัน แต่จัดให้มีการหมุนเวียนอากาศผ่านผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่า Generation time ของเชื้อที่ทดสอบเท่ากับ 16 นาที (85)

นอกเหนือจากปริมาณออกซิเจนในสภาวะแวดล้อม น้ำ เป็นปัจจัยสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์อีกประการหนึ่ง จากการทดลองเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเป็นเวลา 18-20 ชม. มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable count) มากกว่าเชื้อที่เลี้ยงโดยวิธีเดียวกันเป็นเวลา 72 ชม. เนื่องจากอุณหภูมิที่ใช้เพาะเลี้ยงสูงถึง 65°±1° ซ. การระเหยของน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงเป็นไปอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้อาหารเลี้ยงเชื้อแห้งลง เชื้อบางส่วนอาจตายจากการสูญเสียน้ำออกนอกเซลล์ตามวิธีออสโมซิส เนื่องจากความเข้มข้นของตัวถูกละลายและอิออนต่าง ๆภายนอกเซลล์สูงกว่าภายในเซลล์

จากการทดลองเลือกการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่อุณหภูมิ 65°±1° ซ. เป็นเวลา 18-20 ชม. โดยไม่ผ่านการอุ่นที่อุณหภูมิ 95° ซ. หลังการเก็บเชื้อ เป็นวิธีการเตรียมเชื้อเพื่อใช้สำหรับเตรียมชุดตรวจหายาต้านจุลชีพตกค้างในน้ำนม เนื่องจากเป็นวิธีที่ให้จำนวนเชื้อ (CFU/ml) สูง เมื่อเทียบกับการเลี้ยงวิธีอื่น ๆโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตรเท่ากัน รวมทั้งในการทดสอบการเจริญของเชื้อที่ได้จากการเตรียมแต่ละวิธีไม่สามารถบอกได้ว่าเชื้อที่ได้จากการเตรียมวิธีใดสามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบได้ดีกว่าวิธีอื่น เนื่องจากจำนวน (CFU/ml) ของเชื้อที่ได้จากการเตรียมแต่ละวิธีปริมาตร 0.4, 0.2 และ 0.1 มล. มีจำนวนไม่เท่ากัน อย่างไรก็ตามผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปัจจัยสำคัญที่เป็นตัวกำหนดระยะเวลาอ่านผล (เชื้อเจริญรวมทั้งกรดที่เกิดจากการเจริญมีปริมาณมากพอจนสามารถเปลี่ยนระดับความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ และทำให้อินดิเคเตอร์เปลี่ยนสีให้เห็นได้) คือจำนวนเชื้อที่ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เห็นได้จากการทดสอบเชื้อที่เตรียมโดยวิธีเดียวกันแต่ใส่เชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบต่างกัน (ปริมาตร 0.4, 0.2 และ 0.1 มล.) พบว่า การลดจำนวนเชื้อทำให้เวลาการอ่านผลเพิ่มขึ้นตามลำดับ

จำนวนเชื้อที่ทำให้สามารถอ่านผลการเจริญได้ในช่วงเวลา 2:30-4:00 ชม. คือ 10^6-10^8 CFU/ml จากการศึกษาการใช้ *B. stearothermophilus* เพื่อตรวจหายาต้านจุลชีพตกค้างในน้ำนมโดย IDF พบว่า เชื้อดังกล่าวจำนวน 5-10x10^7 CFU/ml ทำให้สามารถอ่านผลการทดสอบด้วยวิธี Disk assay ได้ภายใน 2:30-5:00 ชม. เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 55 ° ซ. และอ่านผลการทดสอบด้วยวิธี Tube diffusion ได้ภายใน 2:45-3:15 ชม. เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 65°±1° ซ. (50)

การเตรียมชุดตรวจ K2 เลือกให้มีปริมาณเชื้อในชุดตรวจเท่ากับ 10^8 CFU/ml ซึ่งเท่ากับปริมาณเชื้อที่ IDF กำหนดเมื่อใช้ *B. stearothermophilus* ในการทดสอบหายาต้านจุลชีพในน้ำนมด้วยวิธี Disk assay หรือ Tube diffusion เนื่องจากเมื่อทดสอบความสามารถของชุดตรวจที่เตรียมขึ้นโดยให้มีปริมาณเชื้อสองขนาดคือ 10^6 และ 10^8 CFU/ml พบว่า ความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดที่ตรวจพบโดยชุดตรวจที่เตรียมจากเชื้อทั้งสองขนาดมีค่าใกล้เคียงกัน โดยชุดตรวจที่มีเชื้อ 10^8 CFU/ml สามารถอ่านผลได้ภายใน 3:00-4:00 ชม. ในขณะที่ชุดตรวจที่มีเชื้อ 10^6 CFU/ml ใช้เวลาอ่านผลมากกว่า 4:00 ชม. ขึ้นไป (ข้อมูลไม่ได้แสดง) ทั้งนี้เนื่องจากการเติมน้ำนมลงในชุดตรวจทำให้เวลาอ่านผลเพิ่มขึ้นจากเวลาอ่านผลของชุดตรวจที่ไม่เติมน้ำนมประมาณ 30-60 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2 การทดสอบการเจริญของเชื้อที่ได้จากการเตรียมแต่ละวิธี

เนื่องจากจำนวนเชื้อ (CFU/mL) จากการเตรียมแต่ละวิธีปริมาตร 0.4, 0.2 และ 0.1 มล. มีจำนวนไม่เท่ากัน จึงไม่สามารถบอกได้ว่าเชื้อที่ได้จากการเตรียมวิธีใดสามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบได้ดีกว่าวิธีอื่น จากผลการทดลองคาดว่าปัจจัยสำคัญที่เป็นตัวกำหนดระยะเวลาอ่านผล (เชื้อเจริญและกรดที่เกิดจากกระบวนการเจริญมีปริมาณมากพอจนสามารถเปลี่ยนแปลงระดับความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อและทำให้อินดิเคเตอร์เปลี่ยนสีให้เห็นได้) คือจำนวนเชื้อที่ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เห็นได้จากการทดสอบเชื้อที่เตรียมจากการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ $65^{\circ}\pm1^{\circ}$ ซ. เป็นเวลา 18-20 ชม. ซึ่งเป็นวิธีที่ได้จำนวนเชื้อมากที่สุด ใช้เวลาการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆที่ทดสอบน้อยที่สุด และการทดสอบเชื้อที่เตรียมจากวิธีเดียวกันแต่ใส่เชื้อลงในอาหารที่ทดสอบจำนวนต่างกัน (ปริมาตร 0.4, 0.2 และ 0.1 มล.) พบว่า การลดจำนวนเชื้อให้ระยะเวลาการอ่านผลเพิ่มขึ้นตามลำดับ

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าจำนวนเชื้อที่ทำให้สามารถอ่านผลการเจริญได้ในช่วงเวลา 3-4 ชั่วโมง คือ 10^{6}-10^{8} CFU/ml ซึ่ง IDF ได้ศึกษาการใช้ *B. stearothermophilus* เพื่อตรวจหายาต้านจุลชีพตกค้างในน้ำนมและพบว่า เชื้อดังกล่าวจำนวน 5-10x10^{7} CFU/ml ทำให้สามารถอ่านผลการทดสอบด้วยวิธี Disk assay ได้ภายใน 2:5-5 ชม. (บ่มที่อุณหภูมิ 55° ซ.) และอ่านผลการทดสอบด้วยวิธี Tube diffusion ได้ภายใน 2:45-3:15 ชม. (62)

2. ความสามารถของชุดตรวจ K2 ในการตรวจหายาต้านจุลชีพในน้ำนมและการเปรียบเทียบความสามารถของชุดตรวจ K2 ในการตรวจหายาต้านจุลชีพในน้ำนมกับวิธีการตรวจอื่น ๆ

ผลการตรวจหายาต้านจุลชีพชนิดต่าง ๆในน้ำนมโดยชุดตรวจ K2 พบว่าชุดตรวจ K2 สามารถตรวจหายากลุ่ม β-lactams ในน้ำนมได้ดีกว่าการตรวจหายาต้านจุลชีพกลุ่มอื่น ๆ ความเข้มข้นต่ำสุดของยา Ampicillin, Cloxacillin, Penicillin G และ Cephapirin ที่ตรวจพบ 100 เปอร์เซ็นต์โดยชุดตรวจ K2 เท่ากับ 40, 20, 5 และ 40 ppb ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับระดับความเข้มข้นของยาดังกล่าวที่ตรวจพบ 100 เปอร์เซ็นต์โดยชุดตรวจ Delvotest-P® และ ADM® ในการทดลองครั้งนี้ อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของ Ampicillin, Cloxacillin, Penicillin G และ Cephapirin ที่ตรวจพบ 100 เปอร์เซ็นต์โดยชุดตรวจ Delvotest-P® และ ADM® ในการทดลองครั้งนี้ สูงกว่าระดับความเข้มข้นของยาดังกล่าวที่บริษัทผู้ผลิตได้อ้างไว้ว่าสามารถตรวจพบได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และสูงกว่า MRL, ซึ่งขัดแย้งกับการศึกษาของ FDA และ AOAC ที่สรุปว่า ชุดตรวจ Delvotest-P® เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจหายาปฏิชีวนะกลุ่ม β-lactams โดยที่สามารถตรวจหา Ampicillin, Penicillin G, Amoxycillin, Cephapirin และ Ceptiofur ได้ในระดับต่ำกว่า MRL ของยาชนิดนั้น (Gist-Brocades, Inc., Netherland)

การตรวจหายาปฏิชีวนะกลุ่ม β-lactams ในน้ำนมโดยชุดตรวจ Charm Farm® ซึ่งเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ได้รับการรับรองมาตรฐานจาก FDA ในการใช้ตรวจหายาปฏิชีวนะกลุ่ม β-lactams ในน้ำนม พบว่าการตรวจหา Ampicillin, Penicillin G, Cephapirin ได้ผลตรงตามที่บริษัทได้อ้างไว้และสอดคล้องกับการศึกษาของ FDA ยกเว้นยา Cloxacillin

สาเหตุประการหนึ่งที่ทำให้ระดับความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพบางชนิด ซึ่งตรวจพบ 100 เปอร์เซ็นต์โดยวิธีการตรวจมาตรฐานเหล่านี้ มีค่าสูงเกินจากค่าที่ทางบริษัทผู้ผลิตรับรองว่าสามารถตรวจพบได้ 100 เปอร์เซ็นต์คือ ระดับความเข้มข้นของยาที่เตรียมในการทดลองครั้งนี้ เนื่องจากความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดในการทดลองเตรียมเป็น 2-fold serial dilution จากความเข้มข้นสูงไปต่ำ ซึ่งมีช่วงห่างระหว่างลำดับความเข้มข้นมาก ดังนั้นความเข้มข้นที่แท้จริงของยาต้านจุลชีพบางชนิดซึ่งตรวจพบ 100 เปอร์เซ็นต์โดยวิธีการตรวจเหล่านี้ อาจอยู่ระหว่างค่าที่ได้จากการทดลองและความเข้มข้นที่ต่ำลงไปหนึ่งลำดับ ในการเตรียมยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดและแต่ละความเข้มข้นเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลให้เกิดความแปรปรวนของผลการทดลองได้ เช่น ยาต้านจุลชีพที่ใช้นั้นเสื่อมคุณภาพหรือด้อยคุณภาพลง ความไม่แม่นยำเที่ยงตรงขณะผสมยาลงในน้ำนมแต่ละลำดับความเข้มข้น ล้วนส่งผลให้เกิดความคลาดเคลื่อนของผลการทดลองได้ซึ่งในการทดลองจะต้องควบคุมปัจจัยเหล่านี้ให้ได้

การเตรียมชุดตรวจเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ก่อให้เกิดความแปรปรวนของปริมาณยาที่วัดได้ (Detectable concentration) การผสมเชื้อที่ใช้ทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนบรรจุลงชุดตรวจเป็นขั้นตอนที่สำคัญ ถ้าเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ ย่อมทำให้ปริมาณเชื้อในชุดตรวจมีความแตกต่างกัน ส่งผลให้ความเข้มข้นของยาที่วัดได้โดยชุดตรวจแต่ละชุดมีความแตกต่างกันได้แม้เป็นยาชนิดเดียวกัน และการที่ปริมาณต่ำสุดของยาต้านจุลชีพบางชนิดที่ถูกตรวจพบโดยชุดตรวจ K2 มีค่าสูงกว่าปริมาณต่ำสุดของยาชนิดนั้นที่ IDF ระบุว่าสามารถตรวจพบได้ 100 เปอร์เซ็นต์โดยวิธี Tube assay (50) มีสาเหตุมาจากความไม่คงที่ของปริมาณเชื้อในชุดตรวจแต่ละชุดดังกล่าวข้างต้น นอกเหนือจากองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้

ปัจจัยทางกายภาพอื่น ๆเช่นความหนาของชั้นอาหารเลี้ยงเชื้อในชุดตรวจ, pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ, คุณภาพของเชื้อ และการควบคุมอุณหภูมิภายในตู้อบเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดความแปรปรวนของผลการทดลองได้

การใช้ชุดตรวจ K2 ตรวจหายาต้านจุลชีพชนิดอื่น ๆนอกเหนือจากยาปฏิชีวนะกลุ่ม β-lactams ให้ผลการตรวจคล้ายคลึงกับการศึกษาของ IDF (50) คือ สามารถตรวจพบยาต่าง ๆเหล่านั้นในระดับความเข้มข้นสูง ยกเว้นยา Oxytetracycline ที่สามารถตรวจพบได้ใกล้เคียงกับค่า MRL ของยา ทั้งนี้เนื่องจาก *B. stearothermophilus* มีความไวรับ (Susceptible) ต่อยา Aminoglycosides, Erythromycin, Sulfonamides และ Chloramphenicol น้อยกว่า Oxytetracycline และยากลุ่ม β-lactams จากการศึกษาการตรวจหายาต้านจุลชีพ 34 ชนิดด้วยวิธี Disk diffusion โดยใช้เชื้อแบคทีเรียและอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆโดย Tsai and Kondo สรุปว่า ควรใช้ จาก *B. stearothermophilus* ในการตรวจหา Penicillins, ใช้ *B. subtilis* กับ Minimum medium (MM) ในการตรวจหา Tetracyclines, ใช้ *B. stearothermophilus* กับ Synthetic assay medium (SAM) หรือ *M. luteus* กับ Mueller-Hinton agar (MHA) ในการตรวจหา Erythromycin, ใช้ *B. subtilis* กับ Mueller-Hinton agar ในการตรวจหา Aminoglycosides และใช้ *B. subtilis* กับ Minimum medium ในการตรวจหา Sulfonamides (52)

จากผลการทดลอง ชุดตรวจ K2 ที่พัฒนาขึ้นสามารถนำมาใช้ในการตรวจกรอง (Screening test) หายาต้านจุลชีพในน้ำนมได้ โดยควรปรับปรุงเรื่องการควบคุมคุณภาพการผลิต (Quality control) ควบคุมปัจจัยต่าง ๆที่อาจก่อให้เกิดความแปรปรวน (Variation) ของผลการทดสอบ เพิ่มเวลาการศึกษา Shelf-life รวมทั้งมีการตรวจสอบ

(Validation) ความสามารถของชุดตรวจในการตรวจหายาต้านจุลชีพตกค้างในน้ำนมดิบจากโค เพื่อศึกษาความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) ของชุดตรวจก่อนนำไปใช้จริง เนื่องจากในน้ำนมโคดิบมีองค์ประกอบหลายชนิดที่อาจส่งผลต่อผลการตรวจได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย