หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วัสดุและวิธีการ

วัสดุอุปกรณ์

1. เชื้อที่ใช้ในการเตรียมชุดตรวจสอบหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมโค

B. stearothermophilus var. *calidolactis* NIZO และ *B. subtilis* ATCC 6633 ได้รับจากภาควิชาสัตวแพทยศาสตร์สาธารณสุข คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมิยาซากิ ประเทศญี่ปุ่น (Department of Veterinary Public Health, Faculty of Agriculture, Miyazaki University, Miyazaki, Japan)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. ยาต้านจุลชีพ

กานามัยซิน โมโนซัลเฟต (Kanamycin monosulfate) (Sigma, U.S.A.)

คลอกซาซิลิน โซเดียม (Cloxacillin sodium) (Sigma, U.S.A.)

คลอแรมเฟนนิคอล ซัคซิเนต (Chloramphenicol succinate) (Sigma, U.S.A.)

เจนตามัยซิน ซัลเฟต (Gentamicin sulfate) (Sigma, U.S.A.)

ไตรเมทโธรพริม (Trimethoprim) (Sigma, U.S.A.)

ซัลฟาไธอะโซล โซเดียม (Sulfathiazole sodium) (Sigma, U.S.A.)

ซัลฟาเมทาซีน โซเดียม (Sulfamethazine sodium) (Sigma, U.S.A.)

เพนนิซิลิน จี โซเดียม (Penicillin G sodium) (Sigma, U.S.A.)

สเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต (Streptomycin sulfate) (Sigma, U.S.A.)

แอมพิซิลิน โซเดียม (Ampicillin sodium) (Sigma, U.S.A.)

อีริทโธรมัยซิน เอสโทเลต (Erythromycin estolate) (Sigma, U.S.A.)

ออกซีเตตราซัยคลิน ไดไฮเดรต (Oxytetracycline dihydrate)
(Sigma, U.S.A.)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. ชุดตรวจยาต้านจุลชีพตกค้างทางการค้า (Commercial Test Kits)

3.1 ชุดตรวจหายาต้านจุลชีพตกค้างด้วยวิธี Colourimetric method ได้แก่

Charm-AIM 96® (Charm Sciences, Inc., U.S.A)

Charm Farm Test® (Charm Sciences, Inc., U.S.A)

3.2 ชุดตรวจหายาปฏิชีวนะตกค้างด้วยวิธี Tube diffusion method ได้แก่

ADM® single test (COPAN, Italy)

Delvotest-P® (Gist Brocades, Inc., Netherland)

3.3 ชุดตรวจหายาปฏิชีวนะตกค้างด้วยวิธี Microbial receptor test หรือ Charm II test® (Charm Sciences, Inc., U.S.A) ได้แก่

ชุดตรวจหา β-lactams

ชุดตรวจหา Aminoglycosides

ชุดตรวจหา Macrolides

ชุดตรวจหา Tetracyclines

ชุดตรวจหา Sulfonamides

ชุดตรวจหา Chloramphenicol

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I18745632

4. อาหารเลี้ยงเชื้อและอาหารเสริมในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ซอยโตน (Soytone) (Difco, U.S.A)

ทริปโตน (Tryptone) (Difco, U.S.A)

นิวเตรียน เอการ์ (Nutrient agar) (Difco, U.S.A)

บีฟ เอ็คซแทร็ค (Beef extract) (Difco, U.S.A)

เปปโตน (Peptone) (Difco, U.S.A)

แพนเครียติค ไดเจส เจลาติน (Pancreatic digest gelatin) (Difco, U.S.A)

โพลีซอร์เบท (Polysorbate) (Difco, U.S.A)

มีท เอ็คซแทร็ค (Meat extract) (Difco, U.S.A)

มุลเลอร์ ฮินตัน เอการ์ (Mueller Hinton agar) (Difco, U.S.A)

ยีส เอ็คซแทร็ค (Yeast extract) (Difco, U.S.A)

เอการ์ (Agar) (Difco, U.S.A)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. สารเคมี

กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid) (J. T. Baker, U.S.A)

กลูโคส (Glucose) (Difco, U.S.A)

คริสตัล ไวโอเลต (Crystal violet) (Merck, Germany)

ซาฟรานิน โอ (Safranin O) (Merck, Germany)

ซิลทิลเลชั่น ฟลูอิด (Scintillation fluid) (Packard Instruments, U.S.A)

โซเดียม คลอไรด์ (Sodium chloride) (Merck, Germany)

โซเดียม ไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) (May & Baker, England)

โซเดียม ไฮโดรเจน ซิเตรต (Sodium hydrogen citrate) (BDH, England)

โซเดียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต (Sodium hydrogen phosphate)
(May & Baker, England)

ไดโซเดียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต (Disodium hydrogen phosphate)
(BDH, England)

ไดโพแทสเซียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต (Dipotassium hydrogen phosphate)
(Merck, Germany)

โพแทสเซียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต (Potassium hydrogen phosphate)
(Merck, Germany)

โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต (Potassium dihydrogen phosphate)
(Merck, Germany)

โพแทสเซียม ไอโอไดด์ (Potassium iodide) (May & Baker, England)

น้ำกลั่น (Distilled water)

บรอมครีซอล เพอร์เพิล (Bromcresol purple) (Difco, U.S.A)

แบเรียม คลอไรด์ (Barium chloride) (May & Baker, England)

แป้ง (Starch) (Mallinekodt, Inc., U.S.A)

เมลาไคท์ กรีน (Melachite green) (Fluka, Japan)

แมกเนเซียม ซัลเฟต (Magnesium sulfate) (Merck, Germany)

อะซิโตน (Acetone) (J.T. Baker, U.S.A)

เอธานอล (Ethanol) (Merck, Germany)

แอมโมเนียม คลอไรด์ (Ammonium chloride) (BDH, England)

แอมโมเนียม ซัลเฟต (Ammonium sulfate) (Merck, Germany)

นมผงที่ตรวจสอบแล้วว่าไม่มีสารยับยั้งการเจริญของเชื้อสำหรับผสม
ยาต้านจุลชีพ

6. เครื่องแก้ว

กระบอกตวง (Measuring cylinders) (Pyrex, U.S.A)

กลาส สไลด์ (Glass slides) (Clay Adams, U.S.A)

ขวดปริมาตร (Volumetric flasks) (Witeg, Germany)

ดิสเพนเซอร์ (Dispenser) (TOVGS, Germany)

แท่งแก้วคน (Glass rod)

แท่งแก้วโค้ง (L-shaped rods) (Pyrex, U.S.A)

บอโรซิลิเคต กลาส (Borosilicate glass) (Charm Science, Inc., U.S.A)

ปิเปต (Pipettes)(HBG, W-Germany)

พาสเจอร์ ปิเปต (Pasteur pipettes)(John Pouten, England)

เพตริ ดิช (Petri dishes)(Pyrex, U.S.A.)

ฟลาส (Erlenmeyer flasks)(Pyrex, U.S.A.)

บีกเกอร์ (Beakers)(Pyrex, U.S.A.)

หลอดแก้วฝาเกลียว (Screw- cap tubes)(Pyrex, U.S.A.)

หลอดแก้วฝาเกลียวขนาด 1.2x4.5 มิลลิเมตร

หลอดทดลอง (Test tubes)(Pyrex, U.S.A.)

7. เครื่องมือ

กล้องจุลทรรศน์ (Light microscope) (Olympus, Japan)

เครื่องชั่ง (Sartorius, U.S.A.)

เครื่องนับโคโลนี (Colony counter) (American Optical Company, U.S.A.)

เครื่องปั่น (Centrifuge) (Clay Adams, U.S.A.)

เครื่องวัดความขุ่น (Spectronic 20) (Baucsh & Lomb, U.S.A.)

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) (Beckman, U.S.A.)

ตู้เย็น (Hitachi, Japan)

ตู้อบ 37° ซ. (Memmert, Germany)

ตู้อบ 65 ±1° (Memmert, Germany)

เซคเกอร์ อินคิวเบเตอร์ (Julabo, Germany)

ฟรีสเซอร์ -20°C (Freezer) (Sunyo, Japan)

มิลลิพอร์ ฟิลเตอร์ เซท (Millipore filter set) (Gelman Science, U.S.A)

แมกเนติค สเตอร์เรอร์ (Magnetic stirrer) (Thermolyne, U.S.A)

ไมโครปิเปต (Micropipettes) (Labsystem, Finland)

วอร์เท็กซ์ ไซโคลมิกเซอร์ (Vortex cyclomixers) (Vortex-genis, U.S.A)

สเตนเลส แรค (Stainless racks)

อ่างน้ำอุ่น (Water bath)

ฮอท เพลท (Hot plate)

Charm Farm Operator' s System (Charm Sciences, Inc., U.S.A)

AIM-96 Operator' s System (Charm Sciences, Inc., U.S.A)

The Charm 7600 System (Charm Sciences, Inc., U.S.A)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

8. เครื่องใช้อื่น ๆ

กระดาษกรองวัตแมนหมายเลข 1 (Whatman filter paper No. 1)

(Whatman, England)

เซนตริฟิวจ์ ทิวบ์ พลาสติค (Plastic centrifuge tubes) (Nalgene, U.S.A.)

ถุงมือ (Disposible gloves)

ปากคีบ (Forceps)

ปิเปต ทิป 5 มิลลิลิตร (Tips) (Finns, U.S.A.)

เปเปอร์ ดิส 10 มิลลิลิตร (Paper disc) (Toyo, Japan)

ปรอทวัดอุณหภูมิ (Thermometer)

ไมโครทิป 200, 1000 ไมโครลิตร (Microtips)

ไม้พันสำลี (Cotton swab)

อะลูมินัม ฟอล์ย (Aluminum foils)

อินซูลิน ไซริงค์ (Insulin syringes)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการ

1. วิธีการเตรียมเชื้อและปริมาณเชื้อที่เหมาะสมในการเตรียมชุดตรวจ

1.1 การเตรียมเชื้อ

วิธีที่ 1

เลี้ยงเชื้อ *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* NIZO ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (Broth medium; ส่วนประกอบแสดงในภาคผนวก ก) 10 ลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 2,000 มล. ขวดละ 1,500 มล. ที่อุณหภูมิ 65° ± 1° ซ. นาน 72 ชม. ปั่นเก็บเซลล์นาน 30 นาที ที่แรงเหวี่ยง 3000xg ทิ้งส่วนน้ำใส ปั่นล้างเซลล์อีก 2 ครั้งด้วยน้ำเกลือ (Normal saline solution (NSS); ภาคผนวก ก) ที่แรงเหวี่ยง 3000xg นาน 30 นาที ทิ้งส่วนน้ำใส ชัสเพนด์ด้วยน้ำเกลือ 500 มล. นำไปอุ่นในอ่างน้ำอุ่นที่ปรับอุณหภูมิให้เท่ากับ 95° ± 1° ซ. นาน 30 นาที เก็บเชื้อที่ได้ในตู้เย็น

วิธีที่ 2

ปฏิบัติตามวิธีที่ 1 แต่เลี้ยงเชื้อนาน 18- 20 ชม.

วิธีที่ 3

เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวตามวิธีที่ 1 นาน 72 ชม. ปั่นเก็บเซลล์นาน 30 นาที ที่แรงเหวี่ยง 3000xg ทิ้งส่วนน้ำใส ปั่นล้างเซลล์อีก 2 ครั้งด้วยน้ำเกลือ ที่แรงเหวี่ยง 3000xg นาน 30 นาที ทิ้งส่วนน้ำใส ชัสเพนด์ด้วยน้ำเกลือ 500 มล. เก็บเชื้อที่ได้ในตู้เย็น

วิธีที่ 4

ปฏิบัติตามวิธีที่ 3 แต่เลี้ยงเชื้อนาน 18- 20 ชม.

วิธีที่ 5

เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (Agar medium; ภาคผนวก ก) ที่บรรจุอยู่ในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 มม. เพลทละ 20 มล. จำนวน 500 เพลท ที่อุณหภูมิ 65° ± 1° ซ. นาน 72 ชม. ล้างเก็บเซลล์บนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยน้ำเกลือ ปั่นเก็บเซลล์นาน 30 นาที ที่แรงเหวี่ยง 3000xg ปั่นล้างเซลล์อีก 2 ครั้งด้วยน้ำเกลือ ที่แรงเหวี่ยง 3000xg นาน 30 นาที ทิ้งส่วนน้ำใส ชัสเพนด์ด้วยน้ำเกลือ 500 มล. นำไปอุ่นในอ่างน้ำอุ่นที่ปรับอุณหภูมิให้เท่ากับ 95° ± 1° ซ. นาน 30 นาที เก็บเชื้อที่ได้ในตู้เย็น

วิธีที่ 6

ปฏิบัติตามวิธีที่ 5 แต่เลี้ยงเชื้อนาน 18- 20 ชม.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีที่ 6

เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตามวิธีที่ 5 ที่อุณหภูมิ 65° ± 1° ซ. นาน 72 ชม. ล้างเก็บเซลล์บนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยน้ำเกลือ ปั่นเก็บเซลล์นาน 30 นาที ที่แรงเหวี่ยง 3000xg ปั่นล้างเซลล์อีก 2 ครั้งด้วยน้ำเกลือ ที่แรงเหวี่ยง 3000xg นาน 30 นาที ทิ้งส่วนน้ำใส ซัสเพนด์ด้วยน้ำเกลือ 500 มล. เก็บเชื้อที่ได้ในตู้เย็น

วิธีที่ 8

ปฏิบัติตามวิธีที่ 7 แต่เลี้ยงเชื้อนาน 18- 20 ชม.

1.2 การเปรียบเทียบลักษณะเชื้อที่ได้จากการเตรียมวิธีต่าง ๆ

นับปริมาณเชื้อที่ได้จากการเตรียมแต่ละวิธี dilution plate count ในเอสเสมีเดียม (Assay medium; ภาคผนวก ก) ย้อมสีแกรมและเมลาไคท์ กรีน เพื่อดูลักษณะเชื้อ

เปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการเจริญของเชื้อที่ได้จากการเตรียมแต่ละวิธีในอาหารเลี้ยงเชื้อ 18 สูตรที่จะใช้เตรียมชุดตรวจยาตกค้าง โดยทดสอบเชื้อ 3 ขนาดคือ นำเชื้อที่ได้จากการเตรียมแต่ละวิธีปริมาตร 0.4, 0.2 และ 0.1 มล. ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 18 สูตร แต่ละสูตรใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 2 มล. ต่อเชื้อ 1 ปริมาตร (เชื้อจากการเตรียม 1 วิธีเตรียมชุดตรวจได้ 54 ชุด รวมเชื้อจากการเตรียม 8 วิธีเตรียมชุดตรวจได้ 432 ชุด) หลังจากผสมเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว ดูดแยกใส่หลอดแก้วฝาแก้วขนาด 1.2x4.5 มม. หลอดละ 0.5 มล. บ่มที่ 65° ± 1° ซ. บันทึกระยะเวลาที่อินดิเคเตอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง

2. การทดสอบเพื่อเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการเตรียมชุดตรวจ

2.1 การเตรียมชุดตรวจ

ผสมเชื้อ *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* NIZO ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตามวิธีที่ 8 ในอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 18 สูตร ปรับความเข้มข้นของเชื้อในชุดตรวจให้เท่ากับ 10^8 CFU/ml ดูดแยกใส่หลอดแก้วผาเกลียวขนาด 1.2x4.5 มม. หลอดละ 0.5 มล. เก็บชุดตรวจที่เตรียมจากอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 18 ชนิดดังกล่าวไว้ที่อุณหภูมิ 7°ซ.

2.2 การเตรียมยาต้านจุลชีพ

เตรียม stock solutions และ working solutions ของยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดให้มีความเข้มข้นและใช้ตัวทำละลายและตัวเจือจางตามตารางที่ 5 โดยการละลายตัวยาด้วยตัวทำละลายปริมาตรน้อย ๆ จากนั้นเจือจางด้วยตัวเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตามตารางที่ 5 บรรจุใส่ขวดเล็ก ๆเก็บที่ -20°ซ.

ละลายนมผงด้วยน้ำกลั่นอุ่น ๆในอัตราส่วน 1 ต่อ 7 (w/v) ผสมจนนมผงละลาย เตรียมน้ำนมผสมยาต้านจุลชีพความเข้มข้นตามตารางที่ 6 โดยเจือจาง working solutions ของยาต้านจุลชีพด้วยน้ำนมที่เตรียมไว้ให้มีความเข้มข้นเท่ากับความเข้มข้นสูงสุดที่ต้องการทดสอบของยาชนิดนั้น ๆ จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้นลดลงทุก 2 เท่าไปเรื่อย ๆ จนได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ (2-fold serial dilution)

ตารางที่ 5 ความเข้มข้น stock solution, working solution, ตัวทำละลาย และตัวเจือจาง ของยาต้านจุลชีพแต่ละชนิด

ยาต้านจุลชีพ	ความเข้มข้น (ppm)		ตัวทำละลาย	ตัวเจือจาง
	Stock solution	Working solution		
AC*	400	40	DW**	DW
CX	400	40	DW	DW
PG	400	40	DW	DW
CEP	400	40	DW	DW
SM	6,000	600	DW	DW
GM	4,000	400	DW	DW
KM	30,000	3,000	DW	DW
EM	4,000	400	96% Ethanol	DW
OTC	4,000	400	DW	DW
SMZ	400,000	40,000	10% NaOH	DW
STZ	400,000	40,000	10% NaOH	DW
CP	40,000	400	96% Ethanol	DW

* อักษรย่อดูหน้าอักษรย่อ

** Distilled water

ตารางที่ 6 ความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพที่ใช้ทดสอบหาชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมและทดสอบหา Dose response curve ของชุดตรวจในการตรวจหายาต้านจุลชีพชนิดต่าง ๆในน้ำนม

ยาต้านจุลชีพ	ความเข้มข้น (ppb)	
	ทดสอบหาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม	ทดสอบหา Dose response curve
AC*	0.625-20	1.25-40
CX	0.625-20	1.25-40
PG	0.625-40	1.25-40
CEP	0.625-40	1.25-40
SM	1,875-60,000	375-12,000
GM	7.5-480	30-960
KM	468.75-15,000	468.75-15,000
EM	50-1,600	50-1,600
OTC	7.5-960	15-960
SMZ	3,125-200,000	12,500-400,000
STZ	3,125-200,000	12,500-400,000
CP	3,125-20,000	1,250-40,000

* อักษรย่อดูหน้าอักษรย่อ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 การทดสอบหาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับเตรียมชุดตรวจ

หยอดน้ำนมผสมยาต้านจุลชีพตามตารางที่ 6 ลงในชุดตรวจทั้งหมดหลอดละ 0.2 มล. ใช้ชุดตรวจยาตกค้าง 2 หลอดต่อยา 1 ความเข้มข้น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65°±1°ซ. อ่านผลเมื่อสีอินดิเคเตอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อของหลอด Negative control (หยอดด้วยน้ำนมที่ไม่ผสมยาต้านจุลชีพ) เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง (ประมาณ 3-4 ชม.) บันทึกความเข้มข้นต่ำสุดของยาต้านจุลชีพที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวก (Detectable concentration) โดยชุดตรวจแต่ละชุด เปรียบเทียบความสามารถในการตรวจหายาต้านจุลชีพของชุดตรวจที่เตรียมจากอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 18 ชนิด โดยดูจากความเข้มข้นต่ำสุดของยาแต่ละชนิดที่ชุดตรวจแต่ละชุดสามารถตรวจพบ

3. ความสามารถ (Capability) ของชุดตรวจ K1 และ K2 ในการตรวจหายาต้านจุลชีพในน้ำนม

3.1 การทดสอบหา Dose response curve ของชุดตรวจ K1 และ K2 ในการตรวจหายาต้านจุลชีพความเข้มข้นต่าง ๆ

3.1.1 การเตรียมชุดตรวจ

เตรียมชุดตรวจโดยผสมเชื้อ *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* NIZO ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตามวิธีที่ 8 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 4 (ชุดตรวจ K1) และสูตรที่ 9 (ชุดตรวจ K2) ให้มีความเข้มข้นของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละสูตรเท่ากับ 10^8

CFU/ml ดูดแยกใส่หลอดแก้วฝาเกลียวขนาด 1.2ป4.5 มม. หลอดละ 0.5 มล. เก็บชุดตรวจดังกล่าวที่อุณหภูมิ 7°ซ.

3.1.2 การทดสอบ

ทยอดน้ำนมผสมยาต้านจุลชีพความเข้มข้นตามตารางที่ 6 (ใช้ช่วงความเข้มข้นสำหรับทดสอบหา Dose response curve ของยาต้านจุลชีพแต่ละชนิด) ลงในชุดตรวจหลอดละ 0.2 มล. ใช้ชุดตรวจ 2 หลอดต่อยา 1 ความเข้มข้น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65°±1°ซ. สังเกตการเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อของหลอด Negative control บันทึกระยะเวลาที่สีอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง และบันทึกผลการตรวจหายาต้านจุลชีพของชุดตรวจทั้งสอง ทดลองซ้ำ 6 ครั้ง คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ผลบวกในการตรวจหายาต้านจุลชีพแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของชุดตรวจ K1 และ K2

3.2 การทดสอบหา Dose response curve ของชุดตรวจ K2 ในการตรวจหายาต้านจุลชีพผสม 2 และ3 ชนิดในน้ำนม

เตรียมน้ำนมผสมยาต้านจุลชีพผสม 2 และ 3 ชนิด ให้มีความเข้มข้นตั้งต้นตามตารางที่ 7 เจือจางให้มีความเข้มข้นเป็น 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 และ 1:64 เท่าตามลำดับ ทดสอบตามวิธีข้อ 3.1.2 โดยใช้ชุดตรวจ K2 ที่เตรียมจากข้อ 3.1.1 บันทึกผลการทดสอบ ทดลองซ้ำให้ครบ 6 ครั้ง และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ผลบวกในการตรวจหายาผสมแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่าง ๆของชุดตรวจ K2

ตารางที่ 7 ความเข้มข้นของน้ำนมผสมยาต้านจุลชีพ 2 และ 3 ชนิดที่ใช้ทดสอบ

ยาผสม	ความเข้มข้นตั้งต้น (ppb)	Dilutions ที่ทดสอบ
PG + SM*	20 + 6,000	1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64
CX + SM	20 + 6,000	"
CX + OTC	20 + 480	"
STZ + GM	200,000 + 480	"
KM + CEP	7,500 + 20	"
SMZ + OTC	200,000 + 480	"
PG + OTC	20 + 480	"
EM + SM	800 + 6,000	"
AC + CX	20 + 20	"
PG + SM + OTC	20 + 6,000 + 480	"
STZ + SMZ + KM	200,000 + 200, 000 + 7,500	"
PG + SM + KM	20 + 6,000 + 480	"
PG + M + EM	20 + 7,500 + 400	"
CX + SM + OTC	20 +6,000 + 480	"
EM + OTC + CX	400 + 480 + 20	"
CEP + SM + GM	20 + 6,000 + 480	"
EM + PG +CX	400 + 20 + 20	"
AC + CX + KM	20 + 20 + 7,500	"

** อักษรย่อดูหน้าอักษรย่อ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. การเพิ่มประสิทธิภาพชุดตรวจ K2 ในการตรวจหา Sulfonamides

4.1 การเตรียมชุดตรวจ

ละลาย Trimethoprim 2.5 และ 5 มก. ใน 96% เอทานอล 5 มล. เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มล. จะได้สารละลายความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เติมสารละลาย TMP แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 10 มล. ลงในชุดตรวจ K2 ปริมาตร 500 มล. จะได้ชุดตรวจ K2 ที่มี TMP เข้มข้น 0.05 และ 0.1 ไมโครกรัม/มล. ดูดแยกใส่หลอดแก้วฝาเกลียวขนาด 1.2x4.5 มล. หลอดละ 0.5 มล. เก็บชุดตรวจที่ 7°ซ.

4.2 การทดสอบความไวของชุดตรวจหา Sulfonamides

เตรียมน้ำนมผสม Sulfamethazine และ Sulfathiazole ให้มีความเข้มข้น 125-4,000 ppb ทดสอบหาความสามารถในการตรวจหา Sulfonamides ทั้งสองชนิดด้วยชุดตรวจ K2 ที่เติม Trimethoprim โดยคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ผลบวกในการทดสอบหา Sulfonamides ทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. การหา Shelf-life ของชุดตรวจ

เตรียมชุดตรวจ K2 ตามวิธี 3.1.1 ทั้งหมด 3 ชุด (K2L1, K2L2 และ K2L3) เก็บชุดตรวจไว้ที่อุณหภูมิ 7°ซ. นำออกมาทดสอบกับน้ำนมผสมยาต้านจุลชีพความเข้มข้นตามตารางที่ 6 ทุกเดือนเป็นเวลา 4 เดือน วิธีการทดสอบปฏิบัติตามข้อ 3.1.2 วิเคราะห์ความสามารถในการตรวจหายาตกค้างของชุดตรวจที่เก็บไว้ช่วงอายุ 1-4 เดือน โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นต่ำสุดของยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดที่ตรวจพบโดยชุดตรวจ K2 ทั้ง 3 Lots เมื่อชุดตรวจมีอายุต่างๆ (1-4 เดือน) กับความเข้มข้นต่ำสุดของยาต้านจุลชีพชนิดนั้นที่ตรวจพบ 100 เปอร์เซ็นต์โดยชุดตรวจ K2 ทันทีที่เตรียมชุดตรวจเสร็จ และเปรียบเทียบระยะเวลาในการอ่านผลของชุดตรวจ K2 ทั้ง 3 Lots เมื่อมีอายุต่างๆกันว่าเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมอย่างไร

6. การเปรียบเทียบความไวของชุดตรวจ K2 กับวิธีการตรวจยาตกค้างอื่นๆ

ทดสอบน้ำนมผสมยาปฏิชีวนะและซัลฟาความเข้มข้นต่างๆตามตารางที่ 8 ด้วยชุดตรวจยาตกค้าง ADM® (วิธีทดสอบแสดงในภาพที่ 3), Delvotest-P® (วิธีทดสอบแสดงในภาพที่ 4), Charm AIM 96® (วิธีทดสอบแสดงในภาพที่ 5), Charm Farm® (วิธีทดสอบแสดงในภาพที 6), Charm II test® (วิธีทดสอบแสดงในภาพที่ 9) และวิธี Disk assay plate method โดยใช้เชื้อ *B. stearothermophilus* (วิธีทดสอบแสดงในภาพที่ 7) และ *B. subtilis* (วิธีทดสอบแสดงในภาพที่ 8) ตามวิธีของ IDF (50) บันทึกผลการตรวจหายาต้านจุลชีพของการตรวจวิธีต่างๆ คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ผลบวกของการตรวจแต่ละวิธี

ในการตรวจหายาแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์ผลบวกที่ได้จากการตรวจโดยใช้ชุดตรวจ K2

6.1 การเตรียมยาต้านจุลชีพ

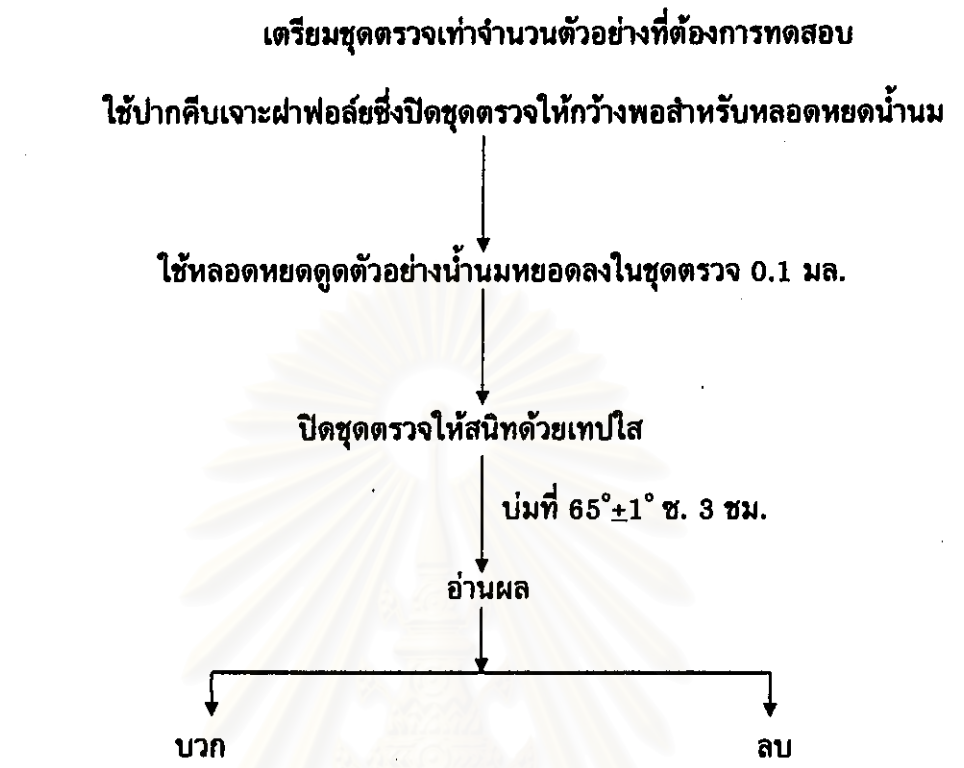
เจือจาง working solution ของยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดด้วยนมผงละลายน้ำให้มีความเข้มข้นตามตารางที่ 8 เก็บน้ำนมผสมยาดังกล่าวที่ 4°-7° ซ.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 ความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพที่ใช้ทดสอบหา Detection limit ของวิธีการตรวจต่าง ๆ (ppb)

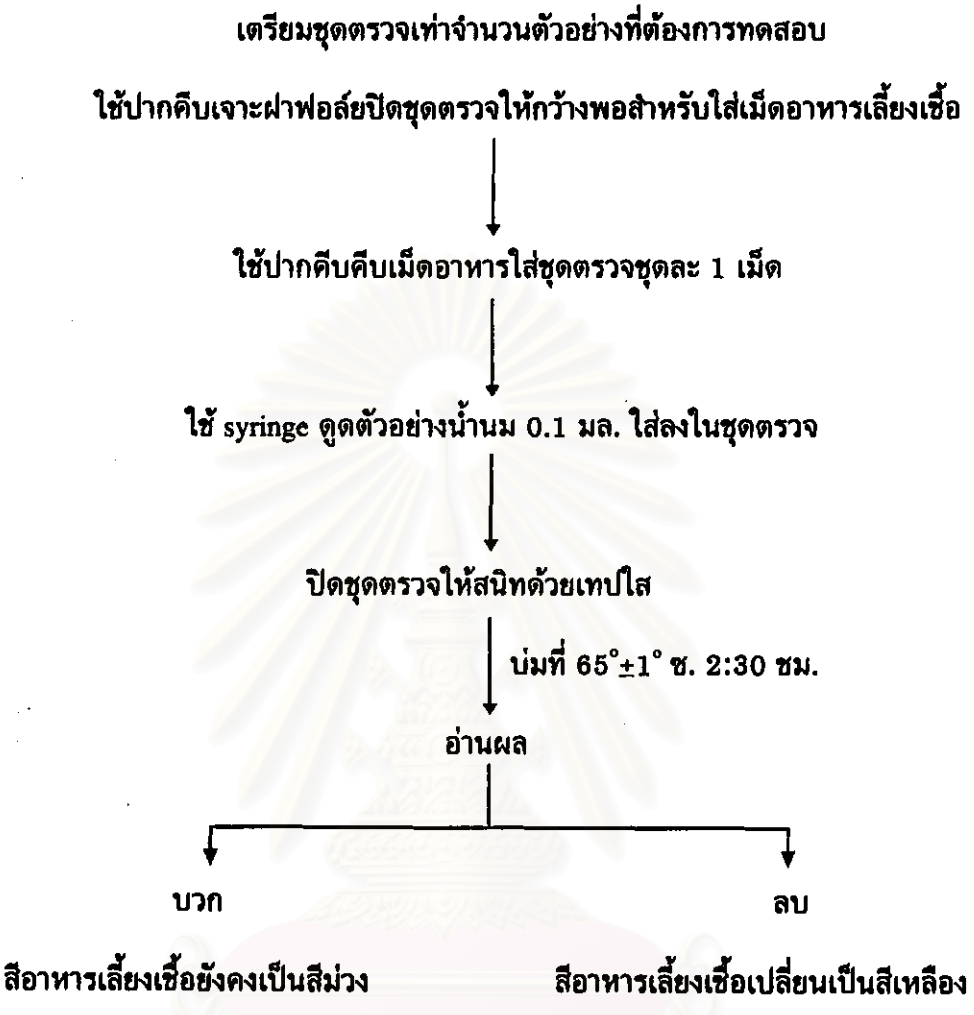
Antibiotics & Sulfas	Test methods				
	ADM, Delvotest-P	AIM-96	Charm Farm	Charm II	Disk assay
AC	1.25-40	1.25-40	2.5-10	2.5-10	1.25-40
CX	5-40	5-80	10-460	10-80	1.25-40
P	2.5-20	1.25-40	1.25-20	2.5-5	0.625-40
CEP	1.25-40	2.5-80	2.5-80	2.5-10	1.25-40
SM	375-12,000	125-6,000	250-1,000,3,000,6,000	9.38-37.5	187.5-6,000
GM	30-480	60-480	30-480	30-240	15-960
KM	938-15,000	469-30,000	469-3,750	60-960	469-15,000
EM	100-1,000	50-1,600	50-800	1.25-200	50-1,600
OTC	15-480	60-480	60-960	3.75-15	30-960
SMZ	625-10,000	1.25-20	1.25-20	2.5-10	625-40,000
STZ	6,250-100,000	0.625-20	0.625-20	2.5-10	6,250-200,000
CP	6,250-100,000	1,000, 1,250-10,000	1,250-5,000	60-480	12,500400,000

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 3 ขั้นตอนการตรวจหายาต้านจุลชีพในน้ำนมด้วยชุดตรวจ ADM®
ตามเอกสารประกอบการใช้ของบริษัทผู้ผลิต (COPAN, Italy)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4 ขั้นตอนการตรวจหายาต้านจุลชีพในน้ำนมด้วยชุดตรวจ Delvotest-P® ตามเอกสารประกอบการใช้ของบริษัทผู้ผลิต (Gist-Brocades,Inc., Netherland)

การเตรียม heater block (Charm AIM 96® incubator)

1. วาง heater block บนพื้นระนาบให้อยู่ในระดับสมดุล
2. กดปุ่ม P ตั้งโปรแกรม P 43
3. เติมน้ำกลั่นในแต่ละหลุมบน heater block จนผิวหน้าของน้ำในหลุมโค้งนูนขึ้นมาจากขอบหลุม

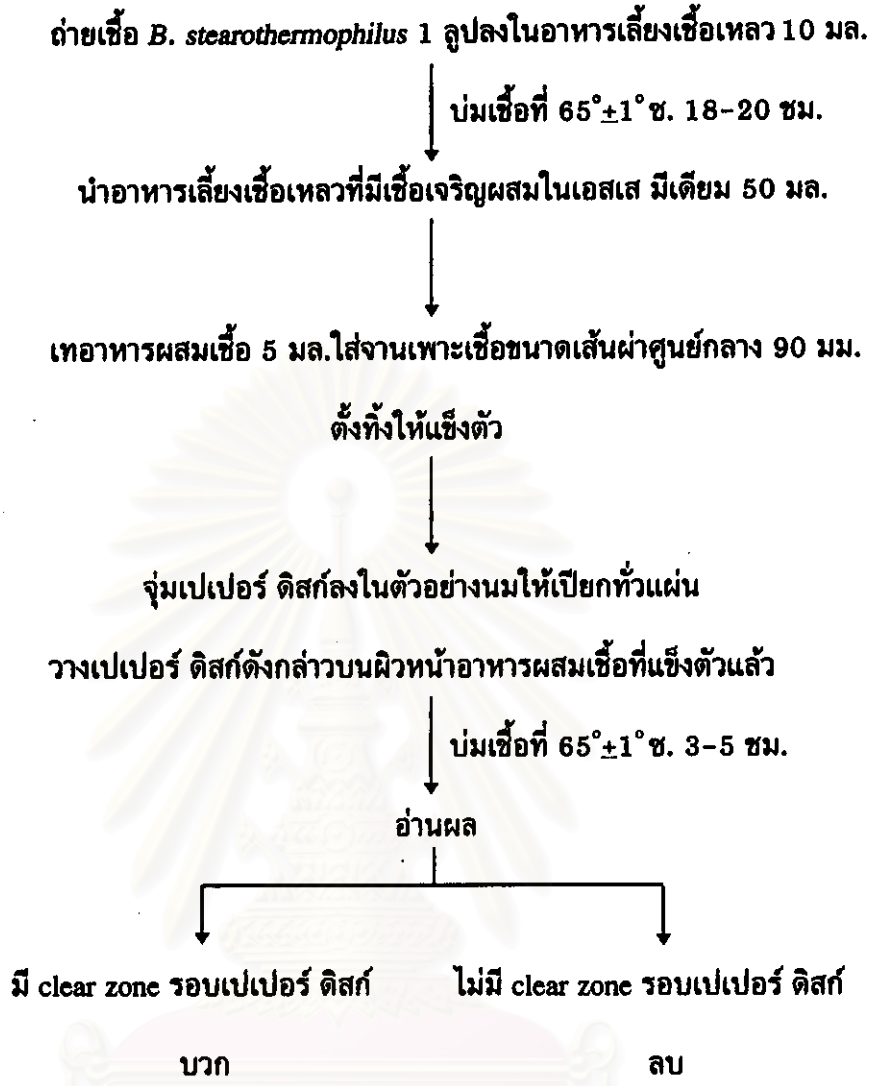
วิธีทดสอบ

1. หยอดตัวอย่างควบคุมลบ (negative control) ลงในหลุม บน 96 well multiplate 2 หลุมๆละ 50 µl
2. หยอด SMZ 50 ppb (positive control) ลงในหลุม บน 96 well multiplate 2 หลุมๆละ 50 µl
3. หยอดตัวอย่างนมที่จะทดสอบในหลุมที่เหลือตัวอย่างละ 50 µl
4. เติมน้ำกลั่น 22 มล. ในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ เขย่าจนผงอาหารละลาย ใส่เม็ดเชื้อลงในขวดอาหารที่ละลายดีแล้ว 1 เม็ด
5. เขย่าให้เม็ดเชื้อกระจาย ตั้งทิ้งไว้ 10 วินาทีให้ solid particle ตกตะกอน ใช้ repipet ดูดอาหารผสมเชื้อขึ้นมาใส่ลงในหลุมที่ใส่ตัวอย่างนมหลุมละ 200 µl ปิดเพลทด้วย sealing tape วางเพลทบน heater block ปิดฝาครอบเพลทให้แน่น
6. กดปุ่ม S รอจนไฟแดงสว่างขึ้น (3-4 ชม.) นำเพลทออกมาอ่านผล โดยเทียบสีกับ reference colour

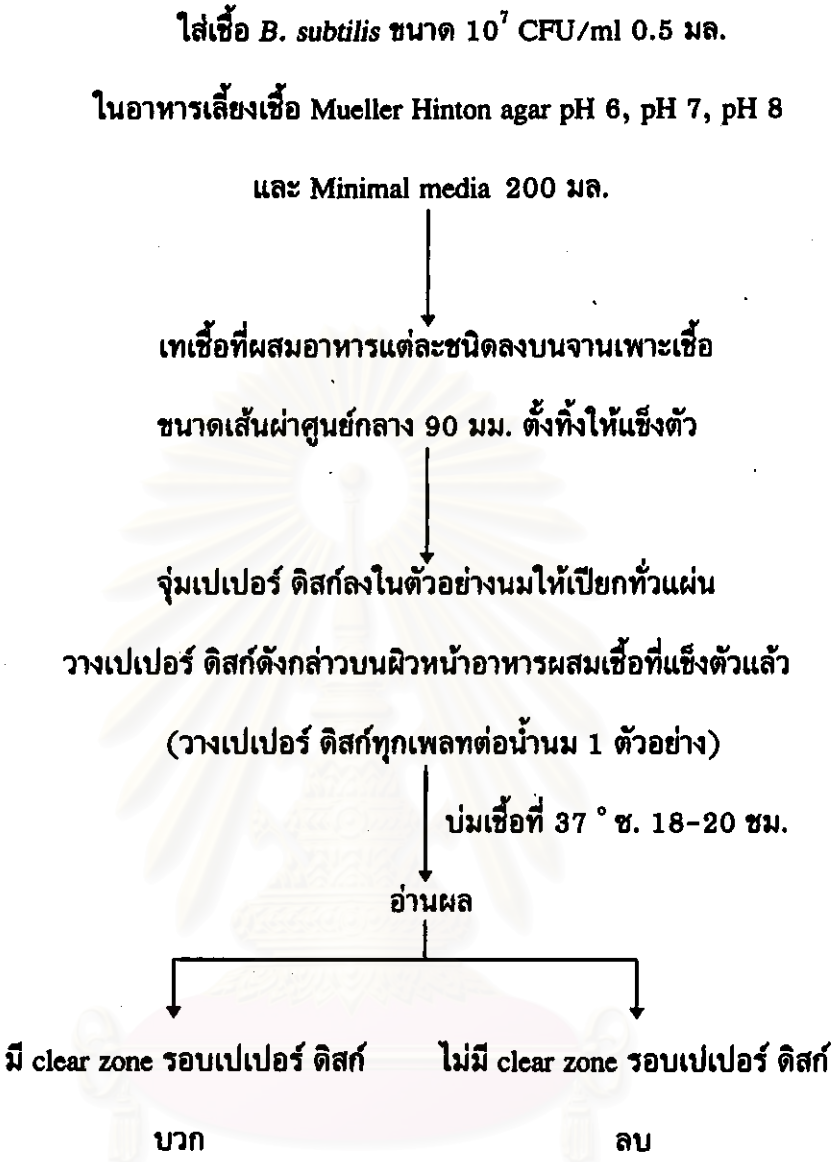
ภาพที่ 5 ขั้นตอนการตรวจหายาต้านจุลชีพในน้ำนมด้วยชุดตรวจ AIM 96 ตามเอกสารประกอบการใช้ของบริษัทผู้ผลิต (Charm Sciences, Inc., USA)

1. วาง heater block ในแนวระนาบ กดปุ่ม S และ I พร้อมกัน
2. กดปุ่ม P ตั้งโปรแกรม F 7
3. ใช้ปิเปตดูด reagent water 0.5 ml ใส่หลอดทดลองแต่ละหลอด
4. เติมตัวอย่างนมที่จะทดสอบ 0.2 ml ลงในหลอดทดลองข้อ 3 ใส่หลอดทดลองลงใน heater block
5. กดปุ่ม S รอจนได้ยินสัญญาณเตือนและไฟเขียวปุ่มบนสุดสว่างขึ้น จับ heater block ตั้งเอียงทำมุมกับพื้นรอจนไฟเขียวปุ่มที่ 2 สว่างขึ้น
6. วาง heater block ลงในแนวระนาบเติมเม็ดเชื้อลงในหลอดทดลองหลอดละ 1 เม็ด
7. กดปุ่ม I รอจนไฟเขียวปุ่มที่ 3 สว่างขึ้น จับ heater block ตั้งเอียงทำมุมกับพื้นรอจนไฟเขียวปุ่มที่ 4 สว่างขึ้น วาง heater block ลงในแนวระนาบ เติมเม็ดอาหารลงในหลอดทดลองหลอดละ 1 เม็ด
8. นำหลอดทดลองออกมาเขย่าให้เม็ดอาหารละลาย ปิดฝาหลอด ใส่หลอดทดลองกลับลงใน heater block
9. จับ heater block ตั้งเอียงทำมุมกับพื้นห้ามขยับบล็อกอีกจนกว่าจะสิ้นสุดการทดสอบ (ประมาณ 3 ชม.)
10. รอจนไฟแดงสว่างขึ้น นำหลอดทดลองออกมาเขย่าและอ่านผลโดยเทียบสีกับ reference colour

ภาพที่ 6 ขั้นตอนการตรวจหายาต้านจุลชีพในน้ำนมด้วยชุดตรวจ Charm Farm® ตามเอกสารประกอบการใช้ของบริษัทผู้ผลิต (Charm Sciences, Inc., USA)



ภาพที่ 7 ขั้นตอนการตรวจหายาต้านจุลชีพในน้ำนมด้วยวิธี *B. stearothermophilus* Disk assay ตามวิธี IDF (50)



ภาพที่ 8 ขั้นตอนการตรวจหายาต้านจุลชีพในน้ำนมด้วยวิธี *B. subtilis* Disk assay ตามวิธี IDF (50)

1. ใส่เม็ดเชื้อ (microbial tablet) ลงในหลอดทดลอง
2. เติมน้ำกลั่น 300 ± 100 µl ในหลอดที่ใส่เม็ดเชื้อ
   เขย่าบนเครื่องเขย่าจนเม็ดเชื้อแตกตัว (disperse)
3. เติมตัวอย่างนม 5±0.5 มล. เขย่าบนเครื่องเขย่าให้เข้ากัน[a]
4. บ่มในอุณหภูมิที่เหมาะสม[b]
5. นำหลอดทดลองออกจาก incubator เติม binding tablet
   เขย่าบนเครื่องเขย่าให้เข้ากัน
6. บ่มในอุณหภูมิที่เหมาะสม[c]
7. ปั่นที่ 1200xg 3 นาที เทน้ำนมทิ้ง ใช้ไม้พันสำลีเช็ดคราบไขมันและ
   น้ำนมที่เหลือให้สะอาด[d] ระวังไม่ให้ไม้พันสำลีถูกตะกอนที่ก้นหลอด
8. เติม scintillation fluid 3 มล. ปิดฝา เขย่าบนเครื่องเขย่าให้เข้ากัน
9. วัดปริมาณ ^{14}C หรือ ^{3}H ด้วย Charm 7600 system[f]
   อ่านผลเป็นบวกหรือลบโดยเทียบกับค่า control point[g]

[a] การตรวจหา Chloramphenicol ใช้ตัวอย่างนม 1 มล.
การตรวจหา Aminoglycosides ใช้ตัวอย่างนมที่ผ่านการปั่นที่ 1200xg 5 นาที โดยใช้น้ำนมใต้ชั้นไขมัน

[b] การตรวจหา β-lactams, Macrolides บ่มที่ 65°±2° ซ. 2 นาที
การตรวจหา Aminoglycosides, Tetracyclines, Sulfonamides และ Chloramphenicol ไม่ต้องทำข้อ 4

[c] การตรวจหา β-lactams, Macrolides บ่มที่ 65°±2° ซ. 2 นาที
การตรวจหา Aminoglycosides, Tetracyclines บ่มที่ 35°±2° ซ. 3 นาที
การตรวจหา Sulfonamides บ่มที่ 85°±2° ซ. 2 นาที
การตรวจหา Chloramphenicol ไม่ต้องบ่ม แต่เติม black tablet ลงในหลอดตัวอย่าง
เขย่าบนเครื่องเขย่าให้เข้ากัน นำหลอดไปแช่ใน ice bath (50 % ice, 50 % water) 3 นาที

[d] การตรวจหา Chloramphenicol ปั่น 5 นาที ใช้ปิเปตดูดน้ำนมใต้ชั้นไขมันใส่หลอดใหม่ 300 µl
โดยไม่ต้องเทน้ำนม

[f] β-lactams, Macrolides วัด ^{14}C
Aminoglycosides, Tetracyclines, Sulfonamides และ Chloramphenicol วัด ^{3}H

[g] control point = ค่าเฉลี่ย ^{14}C หรือ ^{3}H ของการตรวจ positive control 6 ครั้ง บวก 15% ของค่าเฉลี่ยดังกล่าว

ภาพที่ 9 ขั้นตอนการตรวจหายาต้านจุลชีพในน้ำนมด้วยชุดตรวจ Charm II test®
ตามเอกสารประกอบการใช้ของบริษัทผู้ผลิต (Charm Sciences, Inc., USA)