หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วรรณกรรมปริทัศน์

การตรวจหายาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพในน้ำนม

หลักการที่ใช้ตรวจยาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพในน้ำนมแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มคือ

1. การทดสอบโดยอาศัยหลักการยับยั้งการแบ่งตัวของจุลินทรีย์ (Microbial Inhibitor assays)
2. การทดสอบทางอิมมิวโน (Immuno assays)
3. การทดสอบโดยวิธีไมโครเบียลรีเซฟเตอร์ (Microbial receptor assays)
4. การทดสอบโดยวิธีทางเคมี-ฟิสิกส์ (Physicochemical assays)

1.การทดสอบโดยอาศัยหลักการยับยั้งการแบ่งตัวของจุลินทรีย์ (Microbial Inhibitor assays)

เป็นวิธีการตรวจโดยใช้แบคทีเรียที่ไวต่อยาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพเป็นตัวทดสอบ สามารถทำได้หลายวิธีโดยใช้การเจริญของเชื้อในชุดทดสอบหลังจากเติมตัวอย่างน้ำนมที่ต้องการทดสอบ และบ่ม (Incubate) ไว้ในอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อเป็นตัวบ่งชี้ผลการทดสอบ ถ้าเชื้อสามารถเจริญได้ภายหลังการเติมตัวอย่างน้ำนมและบ่มไว้

ในอุณหภูมิที่เหมาะสม แสดงว่าในน้ำนมที่ทดสอบนั้นปราศจากสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ หรือปราศจากยาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพ เชื้อจุลินทรีย์มาตรฐานที่ใช้ทดสอบมีหลายชนิดเช่น *B. stearothermophilus* var. *calidolactis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. lutea*, *S. thermophilus*, *E. coli* และเชื้ออื่นๆอีกหลายชนิดตามตารางที่ 1 เป็นต้น (12, 50)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 ตัวอย่างจุลินทรีย์มาตรฐานที่ใช้เตรียมชุดตรวจหายาต้านจุลชีพตกค้าง โดยอาศัยหลักการยับยั้งการแบ่งตัวของจุลินทรีย์ (50-52)

1. *Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC 11778

2. *Bacillus megaterium* ATCC 9885

3. *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C 953 (ATCC 10149, NIZO)

4. *Bacillus subtilis* ATCC 6633

5. *Escherichia coli* ATCC 10536

6. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031

7. *Lactobacillus bulgaricus*

8. *Sarcina subflava* ATCC 7468

9. *Sarcina lutea* ATCC 9341

10. *Sarcina lutea* resistant to dihydrostreptomycin ATCC 9341a

11. *Sarcina lutea* resistant to neomycin ATCC 12692

12. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p

13. *Staphylococcus aureus* resistant to dihydrostreptomycin ATCC 6538-DR

14. *Staphylococcus aureus* resistant to novobiocin ATCC 12692

15. *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

16. *Pseudomonas pyocyanea* ATCC 25619

การทดสอบโดยอาศัยหลักการยับยั้งการแบ่งตัวของจุลินทรีย์สามารถแบ่งออกเป็นวิธีต่าง ๆดังนี้

1.1 Disk diffusion method

เป็นการทดสอบหายาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพในน้ำนมโดยอาศัยหลักการยับยั้งการแบ่งตัวของแบคทีเรียจากการซึมกระจายของน้ำนมและยาจากแผ่นกระดาษกรอง (paper disk) ซึ่งทำการทดสอบโดยนำกระดาษกรองแผ่นกลมเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10 มิลลิเมตรจุ่มในน้ำนมที่จะทดสอบ แล้ววางบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบผสมอยู่ (seed agar) นำจานเพาะเชื้อดังกล่าวบ่มในอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ ส่วนใหญ่เชื้อเกือบทุกชนิดบ่มที่ 35°-45° เซลเซียส เป็นเวลา 3-18 ชั่วโมง ยกเว้นถ้าทำการทดสอบโดยใช้เชื้อ *B. stearothermophilus* บ่มที่ 65°±1° เซลเซียส เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง หลังจากบ่มเชื้อนำจานเลี้ยงเชื้อออกมาอ่านผล ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อในจานมีลักษณะขุ่นหรือมีโคโลนีของแบคทีเรียเป็นจุดเล็กกระจายทั่วไป ยกเว้นตรงบริเวณกระดาษกรองและรัศมีโดยรอบมีลักษณะใส (clear zone of inhibition หรือ inhibitory zone) วัดเส้นผ่าศูนย์กลางได้เกิน 12 มิลลิเมตร แสดงว่าในน้ำนมที่ทดสอบมีสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้หรือมียาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพ

จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นเชื้อทดสอบหลายชนิดเช่น *B. stearothermophilus, B. subtilis, B. megaterium, B. cereus, Sarcina lutea, S. thermophilus* และ *E. coli* เป็นต้น ถ้าทำการทดสอบกับเชื้อมากกว่าหนึ่งชนิด (three-plate test หรือ six-plate test) จะทำให้การตรวจหายาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพในน้ำนมด้วยวิธีดังกล่าวมีความถูกต้อง

แม่นยำ (accuracy) เพิ่มมากขึ้น (50) การตรวจหายาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพในน้ำนม โดยวิธี Disk diffusion เป็นวิธีการที่ใช้มานานกว่า 30 ปีและยังเป็นวิธีที่นิยมใช้อยู่มากที่สุด ในห้องปฏิบัติการตรวจคุณภาพน้ำนมทั่วโลก เช่น ในประเทศสหรัฐอเมริกา แคนาดา กลุ่มประเทศยุโรป และออสเตรเลีย ได้กำหนดให้ใช้การทดสอบวิธีนี้เป็นวิธีมาตรฐานใน การตรวจหายาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพในน้ำนมร่วมกับการทดสอบอื่น ๆ (48) อย่างไร ก็ตามการตรวจวิธีนี้ค่อนข้างยุ่งยาก เหมาะสำหรับเป็นการทดสอบในห้องปฏิบัติการทาง จุลชีววิทยาที่มีอุปกรณ์ครบถ้วนเท่านั้น

1.2 Tube diffusion methods

1.2.1 Tube diffusion Test

เป็นการทดสอบหายาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพตกค้างในน้ำนมโดยอาศัย หลักการยับยั้งการแบ่งตัวของจุลินทรีย์เช่นเดียวกับวิธี Disk diffusion การทดสอบทำโดย หยอดตัวอย่างน้ำนมที่ต้องการทดสอบและเม็ดอาหารเลี้ยงเชื้อ (nutrient tablet) ลงใน หลอดทดลองขนาดเล็กหรือ ampoule ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 8 มิลลิเมตร ซึ่ง ภายในบรรจุสปอร์ของ *B. stearothermophilus* ผสมกับ agar gel และ Bromcresol purple ปิดชุดทดลองให้สนิท บ่มที่อุณหภูมิ 65°±1° เซลเซียสเป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง อ่านผลโดย สังเกตการเปลี่ยนสีของ Bromcresol purple ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในกรณีที่ตัวอย่างน้ำนม ปราศจากสารใด ๆที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ กรดที่เกิดขึ้นขณะเชื้อเจริญทำให้พีเอช (pH) ในระบบลดลง Bromcresol purple จะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง แต่ถ้าการเจริญของเชื้อ ถูกยับยั้งโดยสารในตัวอย่างน้ำนมที่ทดสอบ pH ในระบบคงเดิม Bromcresol purple จะไม่ เปลี่ยนสี (50) การทดสอบวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายและสะดวกในการปฏิบัติทั้งในห้องปฏิบัติการ

และภาคสนาม ปัจจุบันมีการพัฒนาจนสามารถจำหน่ายในรูปแบบของชุดตรวจเบื้องต้นทางการค้า (Commercial Kit) ได้แก่ชุดตรวจ Delvotest-P®(Gist-Brocades, Inc., Netherland) และชุดตรวจ ADM® (COPAN, Italy) ชุดตรวจ Delvotest-P® เป็นชุดตรวจที่กลุ่มประเทศยุโรปนิยมใช้เป็นชุดทดสอบเบื้องต้น (Screening test) ในตรวจกรองหายาปฏิชีวนะหรือสารต้านจุลชีพในน้ำนมรวมกับการทดสอบโดยวิธี Disk diffusion (48)

1.2.2 Brilliant Black Reduction test

เป็นการทดสอบโดยอาศัยหลัก Tube diffusion อีกวิธีหนึ่ง โดยเปลี่ยนอินดิเคเตอร์เป็น Brilliant black แทน Bromcresol purple และทดสอบใน microtiter plate ซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อผสมกับเชื้อ *B. stearothermophilus* แทนการทดสอบใน tube หรือ ampoule ถ้า Brilliant black ไม่เปลี่ยนสีหลังจากการเติมตัวอย่างน้ำนมและบ่มที่ 65°±1° เซลเซียส แสดงว่าในตัวอย่างน้ำนมมีสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ หรือมียาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพ แต่ถ้าในตัวอย่างน้ำนมไม่มีสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ Brilliant black จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเนื่องจากกรดที่เกิดขึ้นขณะเชื้อเจริญ (50) ชุดทดสอบ BR Test® (Glengarry Biotech, Germany) ซึ่งใช้หลักการดังกล่าวได้รับความนิยมมากในประเทศออสเตรีย แคนาดา เยอรมัน สวีเดน และแอฟริกาใต้ (48)

1.3 Accusphere method

เป็นการทดสอบโดยใส่เม็ดเชื้อ *S. thermophilus* ที่ถูกทำให้แห้งแบบเยือกแข็งร่วมกับ Bromcresol purple (Freeze dried sphere) ลงในหลอดทดลองซึ่งบรรจุตัวอย่างน้ำนมที่ต้องการทดสอบ นำไปบ่มที่ 65°±1° เซลเซียส เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง

ถ้าในตัวอย่างน้ำนมมีสารยับยั้งการเจริญของเชื้อหรือมียาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพ Bromcresol purple จะไม่เปลี่ยนสี หลังการบ่ม Bromcresol purple จะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง จากกรดที่เกิดขึ้นจากการเจริญของเชื้อถ้าในตัวอย่างน้ำนมไม่มีสารใด ๆที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (50)

1.4 Acidification method

Acidification test เป็นการทดสอบการสร้างกรด (การเจริญ) ของเชื้อ *S. thermophilus* ภายหลังการเติมเชื้อลงในตัวอย่างน้ำนมที่ต้องการทดสอบและบ่มที่ 45° เซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที โดยเติม Yeast extract และ Bromcresol purple ลงในตัวอย่างน้ำนมพร้อมกับการเติมเชื้อ โดยที่ Yeast extract เป็นตัวเร่งการเจริญและ Bromcresol purple เป็นอินดิเคเตอร์วัดการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างที่เกิดขึ้น ถ้า Bromcresol purple ไม่เปลี่ยนเป็นสีเหลืองหลังการบ่ม แสดงว่าการเจริญของเชื้อถูกยับยั้งโดยสารต้านจุลชีพในน้ำนม (50) ชุดทดสอบ Charm AIM 96® และ Charm Farm Test® (Charm Sciences Inc., USA) เป็นชุดทดสอบที่พัฒนามาจากหลักการดังกล่าว โดยเปลี่ยนสารเร่งการเจริญเติบโต เปลี่ยนชนิดอินดิเคเตอร์ และใช้เชื้อ *B. stearothermophilus* แทนการใช้ *S. thermophilus* ชุดทดสอบทั้งสองถูกพัฒนาขึ้นเพื่อให้มีความสะดวกในการใช้งานภาคสนามและสามารถอ่านผลได้ในเวลาสั้น รวมทั้งมีความไวในการตรวจหายาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพได้หลายชนิด (48) Charm AIM 96® เป็นวิธีที่สะดวกในกรณีมีตัวอย่างน้ำนมที่ต้องการทดสอบจำนวนมากเพราะทดสอบใน 96-well microtiter plate สามารถตรวจได้ถึงครั้งละ 94 ตัวอย่าง

1.5 Yogurt Test

เป็นการทดสอบหายาปฏิชีวนะหรือสารต้านจุลชีพในน้ำนมโดยวัดการสร้างกรด (การเจริญ) ของเชื้ออีกวิธีหนึ่ง แต่วัดระดับความเป็นกรด-ด่างโดยการทำไตเตรชั่น (titration) ด้วย phenolphthalein และ sodium hydroxide แทนการใช้อินดิเคเตอร์ เชื้อที่ใช้ทดสอบเป็นเชื้อผสมระหว่าง *S. thermophilus* และ *L. bulgaricus* (Yogurt Culture) หลังจากใส่เชื้อลงในตัวอย่างน้ำนมที่ต้องการทดสอบและบ่มที่ 45° เซลเซียส เป็นเวลา 2-2.5 ชั่วโมง นำตัวอย่างน้ำนมดังกล่าวมาทำ titration เพื่อวัดระดับ pH เปรียบเทียบกับระดับ pH จากการทำ titration ก่อนการบ่มเชื้อ และคำนวณหาระดับความเป็นกรดที่เพิ่มขึ้น ตัวอย่างน้ำนมที่ทดสอบมียาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพเมื่อการเพิ่มความเป็นกรดหลังการบ่มเชื้อน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของการเพิ่มความเป็นกรดของ Negative control (50)

1.7 Bioluminescent (ATP) method

การทดสอบวิธีนี้วัดการเจริญของเชื้อโดยวัดปริมาณพลังงาน (ATP) ที่ได้จาก Metabolic activity ของเชื้อ *S. thermophilus* strain TJ. ซึ่งจะปลดปล่อยแสง (Bioluminescense) เมื่อทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ลูซิเฟอร์ริน-ลูซิเฟอร์เรส (Luciferin-Luciferase) และสามารถตรวจวัดได้ด้วยเครื่องวัดแสง (photometer) เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณ ATP ที่ได้จากการทดสอบ negative control ก็จะสามารถบอกได้ว่าตัวอย่างน้ำนมที่ทดสอบมียาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพตกค้างอยู่หรือไม่ (50)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดสอบโดยอาศัยหลักการยับยั้งการแบ่งตัวของจุลินทรีย์หรือไบโอเอสเส (Bioassay) วิธีต่าง ๆเหล่านี้ เป็นที่นิยมใช้ทั่วไปในการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหายาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพในน้ำนม โดยเฉพาะอย่างยิ่งชุดตรวจสอบทางการค้าต่าง ๆ เนื่องจากสามารถให้ผลการตรวจสอบได้รวดเร็ว วิธีการไม่ยุ่งยาก และสามารถนำไปใช้ในภาคสนามได้ อย่างไรก็ตามการตรวจสอบเหล่านี้ไม่สามารถระบุชนิดของยาปฏิชีวนะหรือ ยาต้านจุลชีพที่ตกค้างและอาจให้ผลบวกเท็จได้ รวมทั้งความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะหรือต้านจุลชีพที่ตรวจพบ 100 เปอร์เซ็นต์โดยวิธีการตรวจแต่ละวิธียังมีค่าต่างกันดังแสดงในตารางที่ 2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 ปริมาณต่ำสุดของยาต้านจุลชีพบางชนิดที่ตรวจพบโดยวิธีการตรวจต่าง ๆ (ppb)

ยาต้านจุลชีพ	วิธีการตรวจ									
	Disk assay*	BRT*	Delvotest -P*	Charm Farm*	AIM 96**	ADM***	Tube assay†	Accu-phearett	Yogurt - test†	Bioluml-nescence†
ACtt	10	10	10	5	4	5	5	40	-	3
CX	50	100	50	50	20	35	35	200	500	100
PG	5	10	2.5	2.5	3	4	2.5	10	2	-
CEP	10	10	10	20	5	8	-	-	-	-
SM	> 1,000	> 1,000	> 1,000	> 1,000	600	13,000	-	5,000	1,000	3,000
GM	500	> 500	150	150	100	150	-	-	-	-
KM	-	-	-	-	-	28,000	28,000	5,000	-	-
EM	1,000	1,000	400	1,000	400	2,250	2,250	100	100	20
OTC	1,000	1,000	200	80	100	50	50	500	300	40
SMZ	> 1,000	1,000	> 1,000	20	100	1,000	-	200	-	-
STZ	> 1,000	1,000	> 1,000	100	50	-	-	200	-	-
CP	15,000	-	-	8,000	5,000	15,000	15,000	500	2,000	500

* Charm, SE. and Ruth, GP 1993 (68), ความเข้มข้นที่รายงานเป็นความเข้มข้นที่ตรวจได้อย่างน้อย 13 ครั้งในการตรวจ 15 ครั้ง

** Zomer, E., et al. 1993 (69)

*** ตามที่บริษัทผู้ผลิตได้อ้างไว้ (COPAN, Italy)

† IDF (50)

tt อักษรย่อดูหน้าอักษรย่อ

- ไม่มีข้อมูล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การให้ผลบวกเท็จของการตรวจหายาต้านจุลชีพในน้ำนมด้วยวิธี Bioassay พบมากเมื่อใช้ตรวจสอบน้ำนมจากเต้าอักเสบของโค โคลอสตรัม (Colostrum) และน้ำนมจากเต้านมอักเสบที่เกิดจากเอนโดทอกซินของแบคทีเรีย (Endotoxin-induced mastitis) เนื่องจากร่างกายโคเหล่านี้มีการสร้างสารต้านจุลชีพตามธรรมชาติ (Immune-mediating factors; Natural inhibitors) เพิ่มขึ้น (12, 53-59) สารต้านจุลชีพตามธรรมชาติที่พบมากในน้ำนมจากโคที่มีอาการเต้านมอักเสบได้แก่ Lactoferrin, Lysozyme, และ Polymorphonuclear leukocytes จากการศึกษาของ Korhoner ในปี 1977 พบว่า น้ำนมจากเต้าอักเสบของโคมีปริมาณ Lysozyme 0.5-3 μg/ml และ Lactoferrin อาจสูงถึง 8,000 μg/ml จากค่าในน้ำนมปกติ 0.1-0.2 μg/ml และ 20-350 μg/ml ตามลำดับ (60) นอกจากนี้อัตราการบวกเท็จยังเพิ่มขึ้นในน้ำนมจากเต้าอักเสบที่มีปริมาณ Somatic cell count (SCC) เพิ่มขึ้น (58, 59, 61, 62) ซึ่งอัตราการบวกเท็จเหล่านี้สามารถลดลงได้โดยการอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ 82° เซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำลาย Natural inhibitors ก่อนการตรวจสอบ (63) อย่างไรก็ตาม Halbert และคณะ (1996) พบว่าอัตราการเกิดผลบวกเท็จต่ำมากเมื่อทดสอบน้ำนมจากโคที่ไม่มีอาการเต้านมอักเสบ และไม่เคยได้รับยาปฏิชีวนะในระยะเวลาอย่างน้อย 30 วันก่อนการทดสอบ และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการเพิ่ม Somatic cell count กับอัตราการเกิดผลบวกเท็จ (64)

กรดไขมันอิสระ (Free fatty acid) ในน้ำนมซึ่งเกิดจากการสลายไขมัน (Lipolysis) มีคุณสมบัติการต้านจุลชีพ (65) และอาจเพิ่มอัตราการบวกเท็จของการตรวจหายาต้านจุลชีพในน้ำนมโดยวิธี Bioassays ได้ (53, 66) จากการศึกษาของ Carlson ในปี 1993 พบว่ากรดไขมันอิสระในน้ำนมทำให้อัตราการบวกเท็จของการทดสอบวิธี Arla microtest และ T101 Test เพิ่มขึ้น รวมทั้งเพิ่มอัตราการบวกเท็จของการตรวจหา

Tetracyclines และ Macrolides ด้วยการการตรวจวิธี Microbial Receptor Test (Charm II Test®) (67)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.การทดสอบทางอิมมิวโน (Immuno assays)

คือวิธีการตรวจโดยอาศัยหลักการให้โมเลกุลของยาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพจับกับโมเลกุลของตัวรับ (Receptor) ซึ่งถูกสร้างให้มีส่วนเชื่อมรับ หรือมีแขนที่สามารถต่อกับโมเลกุลของยาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดโดยเฉพาะ แล้วอ่านผลจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเช่น วิธีลาเท็ค แอคกลูติเนชั่น (Latex agglutination) และวิธีเอ็นซายม์-ลิงค์อิมมิวโนซอร์ปเบนท์ (Enzyme-linked immunosorbent assay หรือ ELISA) ตัวอย่างชุดตรวจซึ่งใช้วิธีการเหล่านี้ในการตรวจหายาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพในน้ำนมแสดงในตารางที่ 3

การทดสอบทางอิมมิวโนมีข้อดีที่สามารถบอกชนิดของยาได้จึงอาจใช้เป็นการตรวจสอบยืนยัน (Confirmation test) และบางวิธีการสามารถทำการตรวจสอบนอกห้องปฏิบัติการได้ แต่ข้อด้อยก็คือถ้าตัวอย่างน้ำนมที่ตรวจสอบมียาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพชนิดอื่น ๆที่ไม่จำเพาะกับชุดตรวจสอบก็จะให้ผลการตรวจเป็นลบได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 ชุดตรวจหายาต้านจุลชีพในน้ำนมโดยวิธีอิมมิวโนเอสเส

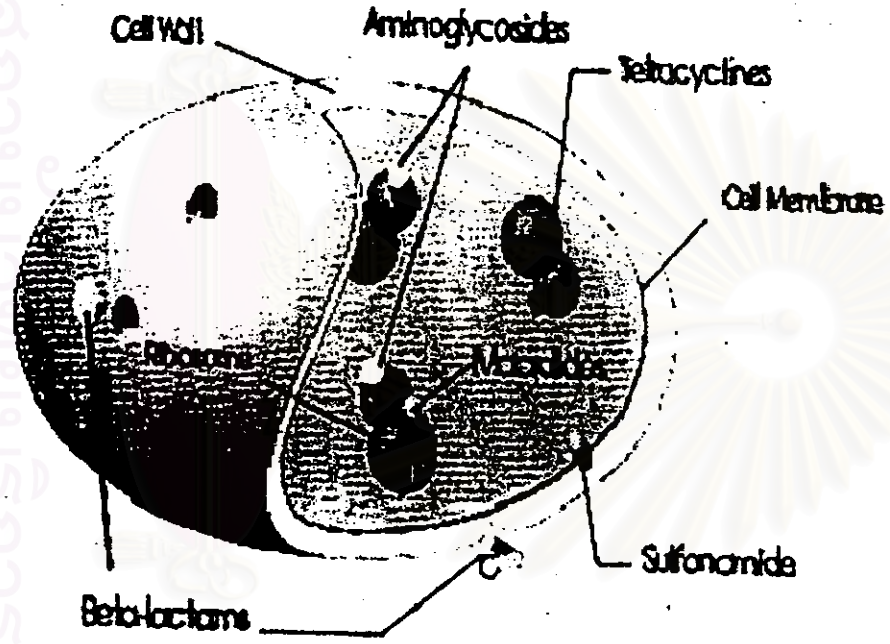
(Immuno assays) (70)

(บริษัทผู้ผลิต) ชื่อทางการค้า	วิธีที่ใช้ในการตรวจ	ยาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพที่ตรวจได้	ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจได้(ppb)
(Argenics) Spot Test	Latex agglutination	Penicilin	5
		Cephapirin	25
		Cloxacillin	75
(Environmental Diagnostics, Inc.)			
EZ-Screen Sulfadimethoxine in Milk	ELISA-card	Sulfadimethoxine	10
EZ-Screen Sulfamethazine in Milk	ELISA-card	Sulfamethazine	10
(IDEXX Corp.)			
Cite Sulfamethazine Test Kit	ELISA-cup	Sulfamethazine	10
Cite Probe Gentamicin Test Kit	ELISA-probe	Gentamicin	30
Cite Probe Beta-Lactam Test Kit	ELISA-probe	Penicillin	3
(Idetek, Inc.)			
Lactek Beta-Lactam-Milk Screening Kit	ELISA-tube test	Beta-Lactams	4-10
Lactek Sulfamethazine-Milk Screening Kit	ELISA-tube test	Sulfamethazine	10
Lactek Gentamicin-Milk Screening Kit	ELISA-tube test	Gentamicin	10
(Neogen Corp.)			
Agri-Screen Sulfamethazine Field Kit	ELISA-wells	Sulfamethazine	10
(Smith-Kline Animal Health Product)			
Signal Neomycin Detection Test	ELISA-wells	Neomycin	10
Signal Sulfamethazine Detection Test	ELISA-wells	Sulfamethazine	10
Signal Gentamicin Detection Test	ELISA-wells	Gentamicin	10

3. การทดสอบโดยวิธีไมโครเบียลรีเซฟเตอร์

(Microbial receptor assays)

เป็นการทดสอบการแย่งจับ (Competitive binding) ระหว่างยาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพที่มีอยู่ในตัวอย่างน้ำนม กับยาที่ติดฉลากกัมมันตภาพรังสีชนิดคาร์บอน 14 (^{14}C) หรือทริเทียม (^{3}H) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารกัมมันตภาพรังสีที่วัดได้จากการทดสอบตัวอย่างน้ำนม กับปริมาณสารกัมมันตภาพรังสีที่วัดได้จากการทดสอบ negative control ก็จะสามารถบอกได้ว่าในตัวอย่างน้ำนมที่ทดสอบมียาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพที่ต้องการตรวจหาหรือไม่ การทดสอบอาศัยหลักการให้โมเลกุลของยาตกค้างในน้ำนมจับกับส่วนรับ (receptor site) ของแบคทีเรีย (microbial binder) ซึ่งมีความจำเพาะกับยาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพที่ต้องการตรวจหา (ภาพที่ 2) ปั่นผสมให้เข้ากัน นำไปบ่ม (incubate) ในอุณหภูมิและเวลาตามที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำสำหรับการตรวจหายาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพชนิดนั้น เติมยาติดฉลากสารกัมมันตภาพรังสี (Antibiotic tracer reagent) ปั่นผสมให้เข้ากันและนำไป incubate ในอุณหภูมิและเวลาเช่นเดิม จากนั้นค่อย ๆรินน้ำนมทิ้งจนเหลือแต่ตะกอนด้านล่าง เช็ดข้างหลอดให้สะอาด เติมน้ำและ Scintillation fluid ผสมให้เข้ากัน วัดหาปริมาณ ^{14}C หรือ ^{3}H ด้วยเครื่องวัดรังสี ถ้าปริมาณกัมมันตภาพรังสีของตัวอย่างน้ำนมมีน้อย แสดงว่าในตัวอย่างน้ำนมมียาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพชนิดที่ต้องการตรวจหาตกค้างอยู่ การทดสอบโดยใช้หลักการดังกล่าวได้แก่วิธี Microbial Receptor Test (Charm II Test®) การตรวจวิธีนี้มีความไวสูง (High sensitivity) สามารถตรวจหายาต้านจุลชีพตกค้างในระดับต่ำได้หลายกลุ่มยา (Broad spectrum) (69) ดังแสดงในตารางที่ 4



Charm Test Recepter Binding-Antimicrobial drugs in sample compete with ^{14}C or ^{3}H labeled antimicrobials for specific sites in microbial cell.

<u>ภาพที่ 2</u> หลักการทดสอบโดยวิธีไมโครเบี่ยลรีเซพเตอร์ (Charm Sciences, Inc., USA.)

ตารางที่ 4 ปริมาณต่ำสุดของยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดในน้ำนมที่ตรวจพบ 100 เปอร์เซ็นต์โดยวิธี Charm II Test® (69)

ยาต้านจุลชีพ	ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (ppb)
AC*	8
CX	10
PG	4.8
CEP	4.5
SM	30
GM	20
KM	-
EM	30
OTC	30
SMZ	10
STZ	6
CP	1

- ไม่มีข้อมูล

* อักษรย่อดูหน้าอักษรย่อ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. วิธีการทางเคมี-ฟิสิกส์ (Physicochemical Methods)

เป็นวิธีการตรวจโดยอาศัยคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ที่จำเพาะของยาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพแต่ละชนิด ที่จะถูกแยกออกจากสารอื่น ๆเมื่อให้ตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบผ่านตัวกลางที่มีอำนาจการดูดซับ (Adsorbant) โมเลกุลของสารแต่ละชนิดไม่เท่ากัน ดังนั้นสารแต่ละชนิดจะหลุด (Elute) ออกมาจากตัวกลางในเวลาต่าง ๆกัน ซึ่งสามารถตรวจวัดได้ด้วยเครื่องตรวจวัด (Detector) เมื่อทำการตรวจสอบตัวอย่างน้ำนมและสารมาตรฐาน (ยาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพ) แล้วพบว่ามีสารในตัวอย่างน้ำนมที่ผ่านตัวกลางออกมาในเวลาเดียวกับสารมาตรฐาน ก็แสดงว่าน่าจะเป็นสารเดียวกัน จากภาพโครมาโตแกรม (Chromatogram) ที่บันทึกด้วยเครื่องตรวจรับ จะสามารถคำนวณหาปริมาณสารในตัวอย่างน้ำนมที่ทดสอบได้ด้วยการเปรียบเทียบกับภาพที่ได้จากการตรวจสอบสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณ การตรวจทางเคมี-ฟิสิกส์ที่นิยมใช้ในการตรวจหายาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพในน้ำนมคือวิธีทินเลเยอร์-โครมาโตกราฟฟี่ (Thin-layer Chromatography หรือ TLC) และวิธีเอชพีแอลซี (HPLC หรือ High-performance liquid chromatography) การตรวจทางเคมี-ฟิสิกส์เป็นวิธีที่มีความแม่นยำสูง (High specificity) สามารถระบุชนิดของยาที่มีในตัวอย่างน้ำนมและหาปริมาณยาที่ตกค้างได้ แต่เป็นวิธีที่ยุ่งยากทั้งขั้นตอนในการสกัดยาที่สงสัยจากน้ำนม และขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อทำการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งยาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพแต่ละกลุ่มหรือแต่ละชนิดจะใช้วิธีการสกัดและการเตรียมตัวอย่างที่แตกต่างกัน เป็นวิธีทดสอบที่ใช้เวลานานและต้องอาศัยเครื่องมือซึ่งมีราคาสูง จึงใช้ในกรณีที่ต้องการทราบชนิดของยาและปริมาณยาที่ตกค้างอยู่ในตัวอย่างน้ำนมเท่านั้น (Verification/ Quantification test)

การทดสอบหายาต้านจุลชีพโดยอาศัยหลักการยับยั้งการแบ่งตัวของจุลินทรีย์ หรือ Bioassays หรือ Microbial tests เป็นขั้นตอนแรกในการตรวจหายาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพตกค้างในน้ำนมตามข้อกำหนด EEC. No. 2377/90 และ 657/92 (49) ซึ่งข้อกำหนดดังกล่าวเป็นที่ยอมรับในกลุ่มประเทศผู้ผลิตน้ำนมว่า เป็นมาตรฐานในการตรวจสอบและควบคุมคุณภาพน้ำนมและผลิตภัณฑ์นม อย่างไรก็ตามวิธีการทดสอบต่าง ๆ ที่อาศัยหลักการดังกล่าวยังมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ไม่สามารถระบุชนิดและปริมาณยาที่ตกค้างได้ หรืออาจเกิดผลบวกเท็จจากสารต้านจุลชีพที่ร่างกายแม่โคขับออกมาตามธรรมชาติดังที่กล่าวมาแล้ว ปัญหาสำคัญอีกประการหนึ่งของการทดสอบโดยอาศัยหลักการยับยั้งการแบ่งตัวของจุลินทรีย์คือความสามารถ (Capability) ของวิธีการตรวจต่าง ๆในการตรวจหายาต้านจุลชีพกลุ่มอื่น ๆนอกเหนือจากกลุ่ม β-lactam เช่นการตรวจหา Aminoglycosides, Tetracyclines, Macrolides, Chloramphenicol และ Sulfonamides เป็นต้น จากตารางที่ 2 ซึ่งแสดงถึงความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะและซัลฟาแต่ละชนิดที่ตรวจพบ 100 เปอร์เซ็นต์โดยการตรวจทาง Bioassays วิธีต่าง ๆ จะเห็นได้ว่าวิธีการตรวจส่วนใหญ่สามารถสามารถตรวจหายากลุ่ม β-lactams ที่ตกค้างในน้ำนมได้ในระดับต่ำในขณะที่ตรวจพบยาปฏิชีวนะกลุ่มอื่น ๆและกลุ่มยา Sulfonamides ได้ในระดับความเข้มข้นซึ่งสูงกว่าค่า MRL ของยาชนิดนั้นมาก ยกเว้นการตรวจวิธี Accusphere, Yogurt test และ Bioluminescent ซึ่งสามารถตรวจหา Erythromycin Sulfonamide และ Oxytetracycline ในระดับต่ำได้

มีผู้ศึกษาถึงปัจจัยต่าง ๆที่มีผลต่อระดับ Detection limit ของวิธีการตรวจหายาต้านจุลชีพตกค้างในน้ำนมโดยอาศัยหลักการยับยั้งการแบ่งตัวของตัวของจุลินทรีย์ในการตรวจหายาปฏิชีวนะและซัลฟาชนิดต่าง ๆพบว่า Detection limits ของวิธีการตรวจขึ้นกับปัจจัยหลายประการ เช่น ชนิดเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐาน ปริมาณเชื้อ และวิธีการ

เตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ รวมทั้งองค์ประกอบและความระดับความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ (51, 52, 71-73) เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความไวรับต่อยาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพชนิดต่าง ๆไม่เท่ากัน ถ้าเชื้อที่ใช้ทดสอบมีความไวรับ (susceptible) ต่อยาที่ต้องการตรวจหามาก (MIC ต่ำ) จะสามารถตรวจหายาชนิดนั้นในระดับต่ำได้ และเนื่องจากการยับยั้งการเจริญของเชื้อขึ้นกับปฏิสัมพันธ์ (interaction) ระหว่างอัตราการเจริญของเชื้อและอัตราการแพร่กระจายของยาในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบ ดังนั้นปริมาณและวิธีการเตรียมเชื้อ ตลอดจนองค์ประกอบและระดับความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบจึงเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อ Detection limit ของวิธีการทดสอบนั้น ๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย