รายงานผลการวิจัย
ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

เรื่อง

การหาเชื้อแบคทีเรียที่มีความไวสูงต่อยาหลายชนิด เพื่อนำมาใช้ตรวจหายาตกค้างในน้ำนม

โดย

ศุภชัย เนื้อนวลสุวรรณ
เกรียงศักดิ์ สายธนู
ธงชัย เฉลิมชัยกิจ

579.3
ศ683ก

ธันวาคม 2539

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เงินทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

การหาเชื้อแบคทีเรียที่มีความไวสูงต่อยาหลายชนิด เพื่อนำมาใช้ตรวจหายาตกค้างในน้ำนม

โดย

ศุภชัย เนื้อนวลสุวรรณ
เกรียงศักดิ์ สายธนู
ธงชัย เฉลิมชัยกิจ

ธันวาคม 2539

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17706022

ฝ่ายวิจัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
มอบให้หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
17 / ส.ค. / 41

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

519.3
ส 183ร ก

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณและขอบคุณ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนเงินทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช ประจำปีงบประมาณ 2538 ครั้งที่ 2

น.สพ.ขวัญชาย เครือสุคนธ์ อ.น.สพ.ประมวล คิ้วสุวรรณ อ.น.สพ.ชัยเดช อินทรชัยศรี อ.สพ.ญ.ศิริพร ขุมทรัพย์ อ.น.สพ.ภาวิน ผดุงทศ รวมถึงบุคลากร คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อำนวยความสะดวกอย่างยิ่งในการเก็บตัวอย่าง

คุณวลาศินี รักขาว คุณไฉไล คูวัฒนานุกูล รวมทั้งบุคลากรภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข ช่วยเหลือในห้องปฏิบัติการวิจัยที่ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คุณเยาวภา เจิงกลิ่นจันทน์ คุณกฤติกา ชินพันธ์ คุณวิโรจน์ คงเกลี้ยง และบุคลากรหน่วยจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา ช่วยเหลือในห้องปฏิบัติการวิจัยที่หน่วยจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย : การหาเชื้อแบคทีเรียที่มีความไวสูงต่อยาหลายชนิดเพื่อนำมาใช้ตรวจหายาตกค้างในน้ำนม

ชื่อผู้วิจัย : ศุภชัย เนื้อนวลสุวรรณ เกรียงศักดิ์ สายธนู และ ธงชัย เฉลิมชัยกิจ

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ : ธันวาคม พ.ศ. 2539

สำนักวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

แยกเชื้อแบคทีเรียจากน้ำพุร้อน 16 แห่งเพื่อใช้ตรวจหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนม พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้และเจริญเติบโตที่ 37 องศาเซลเซียส จำนวน 2 สายพันธุ์จาก 145 สายพันธุ์ และที่เจริญเติบโตที่ 64 องศาเซลเซียส จำนวน 4 สายพันธุ์จาก 61 สายพันธุ์ สามารถตรวจหายาปฏิชีวนะได้หลายชนิดในระดับใกล้เคียงกับค่าปริมาณยาปฏิชีวนะสูงสุดที่ยอมให้มีได้ในน้ำนม (Maximum Residue Limit) ตามที่องค์การอนามัยโลกกำหนด หรือ ใกล้เคียงกับความไวของเชื้อมาตรฐาน *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C593 จากการตรวจหายาปฏิชีวนะโดยวิธี disk assay พบว่าสายพันธุ์ "4.2/64" ซึ่งแยกได้จากน้ำพุร้อนในจังหวัดเชียงรายสามารถใช้ในการตรวจหายาแอมพิซิลิน สเตร็ปโตมัยซิน กานามัยซิน เจนต้ามัยซิน อีริโทรมัยซิน คลอแรมเฟนิคอล และซัลฟาเม็ททอกซาโซล ได้ 0.02 , 3.2 , 4.8 , 0.048 , 0.32 , 25.0 , 3.125 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

คำสำคัญ : น้ำพุร้อน ยาตกค้าง น้ำนมโค

Project Title : Isolation of Bacteria Highly Sensitive to Various Antibiotics for Using in Detection of Antibiotic Residues in Milk

Name of the Investigators :
Suphachai Nuanualsuwan, Kriengsag Saitanu and Thongchai Chalermchaikit

Year : December 1996

Abstract

Bacteria from 16 hot springs were isolated and used for detecting antibiotic residues. It was found that 2 isolates out of 145 cultures grown at 37 °C and 4 isolates out of 61 cultures grown at 64 °C could detect various kinds of antibiotic residues closed to the Maximum Residue Limit(MRL) set by WHO or almost sensitive as the standard strain, *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C593. Using disk assay method, strain "4.2/64" isolated from Chiangrai province can detect ampicillin, streptomycin, kanamycin, gentamycin, erythromycin, chloramphenicol and sulfamethoxazole at 0.02 , 3.2 , 4.8 , 0.048 , 0.32 , 25.0 , 3.125 μg/ml, respectively.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Keywords : Hot spring, Residues and Milk

สารบัญ (Table of Centents)

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgment)	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ (Abstract)	iv
รายการตารางประกอบ (List of Tables)	vi
บทนำ (Introduction)	1
การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Survey of Related Literatures)	3
วิธีการวิจัย (Procedure)	4
ผลการวิจัย (Result)	7
การอภิปรายผล (Discussion)	12
ข้อสรุป (Conclusion)	13
ข้อเสนอแนะ (Suggestion for Further Work)	13
ส่วนอ้างอิง (References)	14

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ

หน้า

ตารางที่ 1 สถานที่และจำนวนตัวอย่างดินและน้ำที่เก็บได้จากแหล่งน้ำพุร้อน 7

ตารางที่ 2 จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างดินและน้ำจากแหล่งน้ำพุร้อน รวม 207 เชื้อ 7

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบระดับ MRL ของยาชนิดต่าง ๆ และระดับยาที่น้อยที่สุดที่วิธีมาตรฐานปัจจุบันสามารถตรวจหาได้ และค่า MIC ของเชื้อที่ได้จากการเก็บตัวอย่าง (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) 8

ตารางที่ 4 ค่า MIC ของเชื้อที่เจริญเติบโตที่ 37 ^{0}C และมีความไวต่อยาต่ำกว่า 4xMRL เมื่อทดสอบกับยาปฏิชีวนะในสารละลายที่เหมาะสม (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) 9

ตารางที่ 5 ค่า MIC ของเชื้อที่เจริญเติบโตที่ 64 ^{0}C และมีความไวต่อยาต่ำกว่า 4xMRL เมื่อทดสอบกับยาปฏิชีวนะในสารละลายที่เหมาะสม (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) 10

ตารางที่ 6 ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ของยาที่ต่ำที่สุดที่เชื้อสามารถตรวจหาได้ (Detectable concentration) เมื่อทดสอบกับยาปฏิชีวนะในน้ำนม 10

ตารางที่ 7 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพความไว sensitivity) ของแบคทีเรีย " 2/37" กับ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (gold standard) ในการตรวจหาสารต้านจุลชีพในน้ำนมดิบ 11

ตารางที่ 8 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพความไว (sensitivity) ของแบคทีเรีย "4.2/64" กับ *Bacillus stearothermophilus var carlidolactis* NIZO (gold standard) ในการตรวจหาสารต้านจุลชีพในน้ำนมดิบ 11

การหาเชื้อแบคทีเรียที่มีความไวสูงต่อยาหลายชนิด เพื่อนำมาใช้ตรวจหายาตกค้างในน้ำนม

บทนำ (Introduction)

ในช่วงระยะทศวรรษที่ผ่านมานั้น ประเทศไทยได้มีการส่งเสริมให้เกษตรกรประกอบอาชีพการเลี้ยงโคนมเพื่อผลิตน้ำนมดิบทดแทนการนำเข้าและเป็นการลดพื้นที่ในการเพาะปลูกพืช เนื่องจากประสบกับปัญหาราคาผลผลิตตกต่ำ ดังนั้น รัฐบาลจึงได้บรรจุนโยบายส่งเสริมการเลี้ยงโคนมในแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติฉบับที่ 4 และ ฉบับที่ 5 นอกจากนี้รัฐบาลยังได้มีการริเริ่มโครงการรณรงค์การบริโภคน้ำนม ทำให้ประชาชนมีความตื่นตัวในการบริโภคน้ำนมมากยิ่งขึ้น ส่งผลให้เกิดความต้องการบริโภคน้ำนมพร้อมดื่มเพิ่มขึ้นอย่างมาก เช่นเดียวกับเรื่องความปลอดภัยของผู้บริโภคก็ได้รับความสนใจมากยิ่งขึ้นด้วย (สมาคมมาตรฐานไทย, 2533)

ในการควบคุมคุณภาพน้ำนมนั้น เป็นหน้าที่ที่ทุกฝ่ายที่อยู่ในอุตสาหกรรมน้ำนมทุกท่านจักต้องให้ความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง ทั้งนี้เนื่องจาก ปัจจุบันผู้บริโภคเป็นจำนวนมากหันมาให้ความสำคัญกับคุณภาพอาหารมากขึ้น ดังตัวอย่างผลกระทบซึ่งเคยเกิดขึ้นกลางปี พ.ศ. 2537 จากการที่ผู้บริโภคเกิดความตื่นกลัวถึงอันตรายจากการตกค้างของยาปฏิชีวนะในน้ำนม เป็นผลให้ประชาชนส่วนหนึ่งเลิกดื่มน้ำนม เพราะเกรงจะเกิดอันตรายต่อตนเองและลูกหลาน ก่อให้เกิดผลกระทบเป็นลูกโซ่ กล่าวคือ การบริโภคน้ำนมพร้อมดื่มลดลง ราคาน้ำนมดิบตกลง เกษตรกรประสบความเดือดร้อนเพราะการระงับการซื้อน้ำนมดิบ

การดื่มน้ำนมที่มียาปฏิชีวนะตกค้างอาจจะเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ถึงแม้จะได้รับในปริมาณน้อยมากก็ตาม หากแต่ว่าได้รับเป็นระยะเวลานานก็อาจจะก่อให้เกิดผลกระทบอย่างใดอย่างหนึ่ง คือ

1. Pharmacological-toxicological risk ยาปฏิชีวนะบางชนิดที่ตกค้างอยู่ในน้ำนมอาจจะก่อให้เกิดมะเร็ง เช่น chloramphenicol และ sulfamethazine เป็นต้น ดังนั้น เกือบทุกประเทศทั่วโลกได้มีประกาศห้ามใช้ chloramphenicol ในสัตว์ที่ใช้เป็นอาหารตั้งแต่ พ.ศ. 2533 เป็นต้นมา เนื่องจากมีรายงานว่า ผู้ป่วยที่รับการรักษาด้วย chloramphenicol จำนวน 20,000-50,000 ราย จะมี 1 รายที่เกิดโลหิตจาง (aplastic anemia) ซึ่งมีอัตราการเสียชีวิตสูงถึง 70 %. สำหรับผู้รอดชีวิต ก็พบว่ามีโอกาสสูงที่จะเกิดมะเร็งของเม็ดโลหิตขาว ในระยะเวลาที่ใกล้เคียงกันนั้นก็มีการห้ามใช้ sulfamethazine ในโคนมที่อยู่ในระยะให้น้ำนมเช่นกัน เนื่องจากองค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกา ได้ประกาศว่า sulfamethazine สามารถก่อให้เกิดมะเร็งของต่อมไทรอยด์ในหนูทดลอง ทั้งนี้เนื่องจากข้อมูลและผลการวิจัยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2525-2531 ของศูนย์วิจัยพิษวิทยาแห่งชาติ (The FDAs National Center for Toxicological Research หรือ NCTR) (Bodyfelt, 1992; Heeschen, 1993)

2. Microbiological risk การดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียจะไม่ถูกทำลายเมื่อได้รับยาในปริมาณที่ต่ำกว่าขนาดที่ใช้รักษา นอกจากนี้ยังสร้างสารพันธุกรรมที่ดื้อต่อยาชนิดนั้น ๆ เรียกว่า R-plasmid ถ่ายทอดไปยังลูกหลานต่อไปด้วย (Heeschen, 1993)

3. Immunopathological risk การแพ้ยา (allergic reaction) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ยาปฏิชีวนะเพนนิซิลิน (penicillin) ซึ่งเชื่อว่าประชากร 1-10 % ทั่วโลกแพ้ยาปฏิชีวนะชนิดนี้ อาการแพ้ที่พบส่วนมาก คือ ผิวหนังมีอาการผื่นแดงซึ่งอาจจะเป็นเฉพาะที่หรือทั่วร่างกาย มีน้อยรายที่จะมีอาการบวมน้ำ ต่อมน้ำเหลืองโตและปวดศีรษะ อาการแพ้ที่รุนแรงที่สุด คือ การเสียชีวิตอย่างเฉียบพลัน ซึ่งเกิดจากการตอบสนองของระบบภูมิต้านทานของร่างกายชนิดที่ 1 (Type I immune response) ตามด้วยสภาวะ anaphylactic shock ยาปฏิชีวนะอื่น ๆ ที่มีรายงานของลักษณะอาการแพ้คล้ายคลึงกับ penicillin ได้แก่ streptomycin, sulfonamides และ ยาปฏิชีวนะในกลุ่ม aminoglycosides สำหรับยาที่มีการรายงานแต่มีอาการแพ้น้อยกว่า ได้แก่ novobiocin และ tetracycline (Bodyfelt, 1992 ; Heeschen, 1993)

โดยเหตุผลข้างต้น องค์การอนามัยโลกจึงได้กำหนดระดับยาปฏิชีวนะตกค้างสูงสุดที่ยอมให้มีได้ (Maximum Residue Limit หรือ MRL) ในน้ำนม (WHO, 1969; Heeschen, 1993) เช่น ปริมาณตกค้างของ penicillin, streptomycin และ oxytetracycline ต้องไม่เกิน 0.006, 0.2 และ 0.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ เป็นต้น ในขณะที่กลุ่มประเทศยุโรป (EEC) ได้กำหนดระดับยาตกค้างของเพนนิซิลลินในน้ำนมต้องไม่เกิน 0.004 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และยาตกค้างชนิดอื่นต้องตรวจไม่พบ (undetectable) ส่วนประเทศไทยมีข้อกำหนดว่านมสดต้องไม่มีสารปฏิชีวนะในระดับที่จะเป็นอันตรายต่อสุขภาพ (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข, 2522) และนมผงดัดแปลงสำหรับทารกต้องไม่มีสารปฏิชีวนะ (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข,2528) แต่มิได้มีการกำหนดค่า MRL ที่แน่นอนซึ่งถือว่าเป็นจุดอ่อนในการคุ้มครองสุขภาพความปลอดภัยของผู้บริโภค

มาตรการที่จะเป็นการประกันคุณภาพและความปลอดภัยของน้ำนมและผลิตภัณฑ์นม จำเป็นจะต้องมีวิธีการตรวจสอบที่ถูกต้องซึ่งมีอยู่หลายวิธี เช่น การทดสอบเบื้องต้น (Screening Test) ซึ่งเป็นวิธี bioassay ที่นิยมใช้กันทั่วไป (IDF, 1987) และการทดสอบยืนยัน (Confirmation Test) ซึ่งจะต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงและเทคโนโลยีสูง เช่น High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), High Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC) หรือ Gas Chromatography (GC) เป็นต้น ด้วยเหตุผลดังกล่าวนี้เกือบทุกประเทศจึงนิยมใช้วิธี bioassay ในการตรวจสอบหายาตกค้างในน้ำนม (IDF, 1993)

เชื้อแบคทีเรียมาตรฐานที่ใช้สำหรับตรวจหายาตกค้างโดยวิธี bioassay ในปัจจุบันมีหลายชนิด เช่น *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ BGA, *B. stearothermophilus* var. *carlidolactis* C953, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *B. cereus* var. *mycoides* ATCC 9634, *Escherichia coli* ATCC 27166 หรือ *Streptococcus thermophilus* strain T.J. เป็นต้น (IDF, 1987) เชื้อมาตรฐานที่กล่าวมานี้ไม่สามารถตรวจหายาตกค้างบางชนิดในน้ำนมได้ถึงระดับ MRL (WHO, 1969; Booth and Harding, 1986) ไม่ว่าจะเป็น streptomycin (MRL = 0.2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) chloramphenicol (MRL = 0) หรือ erythromycin (MRL = 0.04 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ยกเว้นเชื้อมาตรฐานบาง

สายพันธุ์เท่านั้นที่จะสามารถตรวจพบยาตกค้างดังกล่าวได้ แต่จะต้องมีปริมาณของยาตกค้างสูงกว่า 0.3, 3 และ 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (IDF, 1987) ตามลำดับ ปริมาณยาตกค้างที่เชื้อมาตรฐานสามารถตรวจพบได้นั้นเป็นปริมาณที่สูงกว่าค่ากำหนดขององค์การอนามัยโลก ดังนั้น การใช้เชื้อแบคทีเรียมาตรฐานจึงเป็นการทดสอบเบื้องต้นที่ยอมรับในระดับหนึ่งเท่านั้น แต่ไม่ได้หมายความว่าตัวอย่างน้ำนมที่ผ่านการตรวจด้วยวิธี bioassay ด้วยเชื้อมาตรฐานเหล่านี้แล้วจะไม่มียาตกค้างอยู่ ดังเช่น ที่ประเทศยุโรปได้กำหนดว่าน้ำนมต้องมีปริมาณของ penicillin ไม่เกิน 0.004 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และยาตกค้างชนิดอื่นต้องตรวจไม่พบ (undetectable) โดยวิธีการ bioassay โดยใช้เชื้อ *B. stearothermophilus* var. *carlidolactis* C953 ในแต่ละประเทศอาจจะมีมาตรฐานการตรวจหายาตกค้างที่ไม่เท่ากัน ทำให้คุณภาพน้ำนมที่แม้ผ่านการตรวจด้วยวิธีเดียวกันก็อาจจะไม่เท่ากัน

การใช้ยาเพื่อการรักษาในอุตสาหกรรมโคนมในหลาย ๆประเทศมีการควบคุมอย่างเข้มงวด แต่ในบ้านเรายังขาดการควบคุมการใช้ยาในการรักษาโรคในโคนม จึงทำให้มีการใช้ยาหลายชนิดในหลาย ๆกลุ่มยาอย่างกว้างขวาง (โดยที่ยาบางชนิดทางองค์การอนามัยโลกยังไม่ได้มีการกำหนดค่า MRL ขึ้นมา เช่น kanamycin และ gentamicin เป็นต้น) ซึ่งวิธีการตรวจหายาตกค้างโดยวิธี bioassay โดยเฉพาะการใช้วิธีการตรวจต่าง ๆ ที่ใช้เชื้อ *B. stearothermophilus* var. *carlidolactis* เช่น Delvotest^{R} (Bishop et al., 1991; Jone et al., 1991) เป็นต้น ไม่มีความไวพอที่จะตรวจหายาตกค้างในระดับ MRL ได้ และจะตรวจพบยา streptomycin, chloramphenicol และ erythromycin ได้เมื่อมีปริมาณยาตกค้างสูงถึง 6, 8 และ 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงจนอาจจะเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้

ด้วยเหตุผลดังกล่าวข้างต้น คณะผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์ที่จะหาเชื้อแบคทีเรียที่มีความไวสูงต่อยาชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อแบคทีเรียชนิดที่สามารถตรวจพบยาได้ในระดับต่ำกว่าที่เชื้อมาตรฐานปัจจุบันสามารถตรวจพบได้หรืออาจตรวจพบได้ต่ำถึงระดับ MRL ของ WHO(1969)

การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Survey of Related Literatures)

จากข้อมูลของคณะผู้วิจัยพบว่า เชื้อ *E. coli* (เกรียงศักดิ์และนิทัศน์, 2536) และ *Salmonella spp.* (เกรียงศักดิ์, 2536) ที่แยกได้จากคนและสัตว์บางสายพันธุ์จะมีค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ต่อยาหลายชนิดต่ำกว่าเชื้อมาตรฐานที่ใช้ตรวจหายาตกค้าง และมีโอกาสที่จะมีค่า MIC ของเชื้อต่อยาตกค้างต่ำกว่าระดับ Minimum Residue Limit (MRL) ดังนั้น จึงเชื่อได้ว่าเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากธรรมชาติจะต้องมีความไวสูงเพียงพอที่จะนำมาเป็นเชื้อมาตรฐานสำหรับใช้ในการตรวจหายาตกค้างในน้ำนม โดยการแยกหาเชื้อดังกล่าวจากน้ำและดินในธรรมชาติที่ไม่เคยสัมผัสกับยาชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะจากแหล่งน้ำพุร้อน เนื่องจากว่า เชื้อแบคทีเรียมาตรฐานที่ใช้กันอยู่นั้นเป็นแบคทีเรียกลุ่ม thermophilic ซึ่งเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูงประมาณ 55 หรือ 64 ^{0}C (IDF,1987) นอกจากนี้ แหล่งน้ำพุร้อนที่ห่างไกลชุมชนควรจะมีเชื้อแบคทีเรียที่ไม่เคยสัมผัสกับมนุษย์ สัตว์ หรือยาปฏิชีวนะมาก่อน ดังนั้น ย่อมมีโอกาสจะได้เชื้อแบคทีเรียที่มีความไวสูงสามารถตรวจหายาปฏิชีวนะได้ในระดับที่ต่ำมาก ๆได้

วิธีการวิจัย (Procedure) *ดูแผนภูมิประกอบ*

1. การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างดินและน้ำจากแหล่งน้ำพุร้อน โดยเลือกเก็บจากแหล่งน้ำพุร้อนทั่วประเทศไทยให้ได้จำนวนมากแห่งที่สุด ดังนี้

1.1 ธารน้ำบ่อคลึง อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี
1.2 น้ำพุร้อนหินดาด(น้ำพุร้อนกุยมั่ง) อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี
1.3 บ่อน้ำร้อน อ.เมือง จ.ระนอง
1.4 น้ำพุร้อนสันกำแพง อ.สันกำแพง จ.เชียงใหม่
1.5 รุ่งอรุณน้ำพุร้อน อ.สันกำแพง จ.เชียงใหม่
1.6 โป่งเดือด ต.ป่าแป๋ อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่
1.7 บ่อน้ำร้อนฝาง อ.ฝาง จ.เชียงใหม่
1.8 บ่อน้ำร้อนเทพพนม อ.ฮอด จ.เชียงใหม่
1.9 โป่งน้ำร้อนแม่ขะจาน อ.เวียงป่าเป้า จ.เชียงราย
1.10 น้ำพุร้อนทุ่งเทวี อ.เวียงป่าเป้า จ.เชียงราย
1.11 บ่อน้ำร้อนแม่เจดีย์ใหม่ ต.แม่เจดีย์ใหม่ อ.เวียงป่าเป้า จ.เชียงราย
1.12 บ่อน้ำร้อนทรายขาว ต.ทรายขาว อ.พาน จ.เชียงราย
1.13 บ่อน้ำร้อนหนองแห้ง ต.เมืองปอน อ.ขุนยวม จ.แม่ฮ่องสอน
1.14 บ่อน้ำร้อนผาบ่อง ต.ผาบ่อง อ.เมือง จ.แม่ฮ่องสอน
1.15 โป่งน้ำร้อนท่าปาย ต.แม่ฮี้ อ.ปาย จ.แม่ฮ่องสอน
1.16 โป่งน้ำร้อนเมืองแปง อ.ปาย จ.แม่ฮ่องสอน

เก็บตัวอย่างทุกขั้นตอนมีเทคนิคที่สำคัญ คือ การเก็บตัวอย่างโดยปลอดเชื้อ (aseptic technique) โดยใช้อุปกรณ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน (autoclave) เช่น ภาชนะเก็บตัวอย่าง (ขวดแก้วหรือถุงพลาสติก) กระบวยตัก เป็นต้น โดยทำการเก็บน้ำจากกลางบ่อน้ำพุร้อนและริมบ่อน้ำพุร้อน รวมทั้งเก็บตัวอย่างดินหรือโคลนบริเวณที่น้ำพุร้อนล้นผ่านออกเป็นทาง ได้ตัวอย่างทั้งหมด 4 ตัวอย่างต่อ 1 บ่อน้ำพุร้อน เนื่องจาก ตัวอย่างที่เก็บได้มีอุณหภูมิค่อนข้างสูง จึงควรทิ้งให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้องแล้วเก็บแช่ในที่เย็นตลอดเวลาก่อนจะนำตัวอย่างไปเพาะเชื้อในขั้นตอนต่อ ๆไป

โดยทั่วไปแล้ว จะพบบ่อน้ำพุร้อนมากกว่า 1 บ่อในบริเวณเดียวกัน และในบางแห่งอาจจะมีการพัฒนาเป็นแหล่งท่องเที่ยว จึงมีการก่ออิฐถือปูนรอบ ๆบ่อน้ำพุร้อน ทำให้ไม่สามารถเก็บตัวอย่างดินหรือโคลนได้

2. การแยกเชื้อและทำเชื้อให้บริสุทธิ์ (Isolation & Purification)

นำตัวอย่างดินและน้ำ ที่ได้จากขั้นตอนแรก มาเพาะเชื้อลงใน Brain Heart Infusion (BHI) โดยตัวอย่างน้ำปริมาตรประมาณ 50 มิลลิลิตร (มล) ผสมกับ BHI (double strength) 50 มล ตัวอย่างดินหรือโคลนน้ำหนักประมาณ 10 กรัม (ก) ผสมกับ BHI 100 มล ขั้นตอนทั้งหมดจะต้องทำอย่างระมัดระวังป้องกันการเกิด contamination หรือ ใช้วิธีปลอดเชื้อ (aseptic technique) ตัวอย่างทั้ง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2 ชนิด แยกภาชนะ เพื่อแยกเข้าตู้อบ (incubator) ที่สองอุณหภูมิ คือ ที่ 37 °C และ 64 °C จากนั้นแต่ละอุณหภูมินำไปเพาะเชื้อต่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Assay medium (AM) และ/หรือ Mueller Hinton Agar (MHA) เลือกเชื้อแบคทีเรียจากโคโลนี (Colony) ที่แตกต่างกัน นำมาทำเชื้อให้บริสุทธิ์และเก็บไว้เพื่อทดสอบหาค่า MIC ต่อไป

3. การทดสอบหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

เลือกยาปฏิชีวนะที่เป็นตัวแทนของยาที่มีการใช้ในการดูแลโคนม จำนวน 12 ชนิด ดังนี้

1. กลุ่ม Beta-Lactam เลือก penicillin , ampicillin และ cloxacillin
2. กลุ่ม Aminoglycoside เลือก streptomycin, gentamicin และ kanamycin
3. กลุ่ม Macrolide เลือก erythromycin
4. กลุ่ม Chloramphenicol
5. กลุ่ม Tetracycline เลือก oxytetracycline และ chlortetracycline
6. กลุ่ม Sulfonamide เลือก sulfamethoxazole
7. กลุ่ม Quinolone เลือก oxolinic acid

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ในขั้นตอนที่ 2 นำมาหาค่า MIC ด้วยวิธี agar dilution technique (เกรียงศักดิ์, 2536; Barry, 1976) ต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 12 ชนิด โดยกำหนดความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะอ้างอิงจากค่า MRL และ ความสามารถในการตรวจหายา (*detectable concentration* หรือ detection limit) โดยเชื้อมาตรฐาน ดังนี้คือ ใช้ความเข้มข้นของยาสูงกว่าและต่ำกว่าค่า MRL ของยาชนิดนั้น 5 two-fold dilution (รวมทั้งสิ้น 11 dilutions) และเลือกเก็บเชื้อแบคทีเรียที่มีค่า MIC ใกล้เคียงกับค่า MRL ที่กำหนดโดย WHO (1969) หรือใกล้เคียงกับ detectable concentration ของยาปฏิชีวนะที่เชื้อแบคทีเรียมาตรฐานสามารถตัวหาได้

4. การทดสอบหาค่า Detectable concentration โดยใช้ยาปฏิชีวนะ

นำเชื้อแบคทีเรียจากขั้นตอนที่ 3 มาหา detectable concentration ต่อยาปฏิชีวนะโดย disk assay plate method หรือ bioassay ที่ pH 6, 7.2 และ 8 (IDF, 1987) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพความไวของเชื้อในการตรวจหายาปฏิชีวนะ (Barry, 1967) โดยเตรียมสารละลายยาปฏิชีวนะตั้งต้น (stock solutions) แต่ละชนิดให้มีความเข้มข้นของยาเท่ากับ 10,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย (diluent) ยกเว้น erythromycin ใช้ ethyl alcohol เป็นตัวทำละลายและ oxolinic acid ใช้ 0.003 M sodium hydroxide เป็นตัวทำละลาย แล้วเตรียมสารละลายยาปฏิชีวนะใช้งาน (working solutions) โดยการเจือจางสารละลายยาปฏิชีวนะตั้งต้นของแต่ละชนิดด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาณของยาปฏิชีวนะในระดับต่าง ๆ ที่จะใช้ทดสอบ 11 dilutions ตามที่กำหนดในขั้นตอนที่ 3 ในขั้นตอน disk assay plate method นี้จะต้องมีการควบคุมปริมาตรของยาที่จะหยอดลงใน filter papers หรือ disks (membrane filter, cellulose acetate, *Adventec Toyo Kaisha Ltd.*) ในปริมาตร 80 ไมโครลิตรต่อ disk โดยการใช้ automatic micropipette

5. การทดสอบหาค่า Detectable concentration โดยใช้ยาปฏิชีวนะร่วมกับน้ำนม

นำเชื้อแบคทีเรียจากขั้นตอนที่ 4 มาหา detectable concentration ต่อยาปฏิชีวนะโดย disk assay plate method หรือ bioassay ที่ pH 6, 7.2 และ 8 (IDF, 1987) โดยใช้ยาปฏิชีวนะในน้ำนมที่ปลอดยาปฏิชีวนะและสารห้ามการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่มีอยู่แล้วในน้ำนมตามธรรมชาติ (natural inhibitors) เช่น lysozyme ในขั้นตอนนี้จะต้องมีการควบคุมปริมาตรของยาที่จะหยอดลงใน Disks เช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 4 นอกจากนี้ ยังได้มีการทำการทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง เพื่อให้ได้ค่าที่เชื่อถือได้มากขึ้น (reliable) และรายงานผลการทดสอบที่มีความสอดคล้องกัน (more compatible and conservative) ในการทดสอบซ้ำนั้น ๆ

6. การทดสอบหายาตกค้างในน้ำนมดิบ

เลือกเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากขั้นตอนที่ 5 ที่มีค่า MIC ต่ำสุด ในการทดลองตรวจหาสารต้านจุลชีพในตัวอย่างน้ำนมดิบซึ่งสุ่มจากโรงงานรับซื้อน้ำนมดิบแห่งหนึ่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 152 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับการใช้เชื้อมาตรฐาน *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Bacillus stearothermophilus* var *calidolactis* NIZO โดย disk assay plate method (IDF, 1987)

แผนภูมิแสดงวิธีดำเนินการวิจัย

ผลของการวิจัย (Result)

เชื้อแบคทีเรียจากทั้ง 2 อุณหภูมิ คือ 37 ^{0}C และ 64 ^{0}C ได้ทั้งสิ้น 206 เชื้อ เมื่อนำมาหาค่า MIC ปรากฏว่า เหลือเพียง 24 เชื้อ ที่มีค่า MIC ใกล้กับค่า MRL หรือ detectable concentration ของยาชนิดต่าง ๆ เมื่อนำมาทดสอบหาค่า detectable concentration ด้วยยาปฏิชีวนะอย่างเดียวโดยวิธี bioassay ได้แบคทีเรียที่ครบคุณสมบัติ 6 เชื้อ ทดสอบหาค่า detectable concentration ด้วยยาปฏิชีวนะในน้ำนมโดยวิธี bioassay ได้แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติดีที่สุด 1 เชื้อ ผลการวิจัยอื่น ๆสรุปผลเป็นตารางจำนวน 8 ตารางดังนี้

ตารางที่ 1 สถานที่และจำนวนตัวอย่างดินและน้ำที่เก็บได้จากแหล่งน้ำพุร้อน

สถานที่	ตัวอย่างดิน		ตัวอย่างน้ำ	
	จำนวน	อุณหภูมิ (^{0}C)	จำนวน	อุณหภูมิ (^{0}C)
ราชบุรี	4	47,49,50,55	2	49,55
กาญจนบุรี	2	28,41	2	28,41
ระนอง	1	54	4	56,58,60,64
เชียงใหม่	16	38-90	16	40-92
เชียงราย	8	30-75	9	35-85
แม่อ่องสอน	15	41-86	15	41-91
รวม	46	-	48	-

ตารางที่ 2 จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างดินและน้ำจากแหล่งน้ำพุร้อนรวม 206 เชื้อ

สถานที่	จำนวนเชื้อจากตัวอย่างดิน		จำนวนเชื้อจากตัวอย่างน้ำ	
	อุณหภูมิ 37 ^{0}C	อุณหภูมิ 64 ^{0}C	อุณหภูมิ 37 ^{0}C	อุณหภูมิ 64 ^{0}C
ราชบุรี	18	9	8	1
กาญจนบุรี	14	4	9	6
ระนอง	2	3	11	3
เชียงใหม่	21	11	17	5
เชียงราย	5	4	8	4
แม่ฮ่องสอน	14	9	18	2
รวม	74	40	71	21

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบระดับ MRL ของยาชนิดต่าง ๆ และระดับยาที่น้อยที่สุดที่วิธีมาตรฐานปัจจุบันสามารถตรวจได้* และ ค่า MIC ของเชื้อที่ได้จากการเก็บตัวอย่าง (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

ชนิดยาปฏิชีวนะ	MRL	วิธีมาตรฐานปัจจุบัน*
Penicillin-G (PCG)	.006(0.01 IU)	.002-.006
Ampicillin (AC)	.010	.002-.005
Cloxacillin (CC)	0.02	.015-.035
Streptomycin (SM)	0.2	3
Kanamycin (KM)	NA	9-28
Gentamicin (GM)	NA	0.5-3.12
Erythromycin (EM)	0.04	0.5-2.25
Chloramphenicol (CP)	0	15
Sulfamethoxazole (SMX)	0.1	50-100
Oxytetracycline (OTC)	0.02	0.15-0.50
Chlortetracycline (CTC)	0.1	0.2-0.45
Oxolinic Acid (OA)	0.2	25

* Disk Assay Plate Method และ Tube Diffusion Method โดยใช้เชื้อ *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C953 (IDF, 1987; Heeschen, 1993)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 ค่า MIC ของเชื้อที่เจริญเติบโตที่ 37 ^{0}C และมีความไวต่อยาต่ำกว่า 4xMRL เมื่อทดสอบกับยาปฏิชีวนะในสารละลายที่เหมาะสม (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

เชื้อ	PCG	AC	CC	SM	KM	EM	CP	SMX	OTC	CTC	OA
1/37	.015	.01	-	-	-	.08	.01	.1	.4	-	-
2/37	.0156	.312	.25	-	.78	.031	-	-	.37	.04	*
3/37	-	-	-	.937	1.56	.031	-	-	.75	-	*
4/37	-	-	-	.937	-	.031	-	-	-	-	*
5/37	-	.0312	-	-	-	-	-	-	.09	-	*
6/37	-	.0625	-	-	.78	-	-	-	.09	.02	*
7/37	-	-	-	1.87	1.56	-	-	-	-	-	*
8/37	-	-	-	1.87	1.56	-	-	-	.75	-	*
9/37	-	-	-	-	-	.031	-	-	-	-	*
10/37	.0156	-	-	.468	-	.031	-	.08	-	-	*
11/37	-	-	-	-	-	.031	-	-	.75	-	*
12/37	-	-	-	-	-	.04	-	-	-	-	*
13/37	.024	.01	-	-	-	.08	-	-	-	-	*
14/37	.0015	.04	-	-	-	.16	-	.4	-	-	.8
15/37	.003	.02	-	-	-	-	-	-	-	-	.8
16/37	.003	.01	-	-	-	-	-	-	-	-	.4
17/37	.024	.04	-	.8	.15	-	-	-	-	-	.4
18/37	.003	.01	-	.8	.15	.01	-	.1	.4	.08	.05

หมายเหตุ - = ค่า MIC สูงกว่า 4 เท่าของค่า MRL

* = ไม่ได้หาค่า MIC

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 ค่า MIC ของเชื้อที่เจริญเติบโตที่ 64 ^{0}C และมีความไวต่อยาต่ำกว่า 4xMRL เมื่อทดสอบกับยาปฏิชีวนะในสารละลายที่เหมาะสม (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

เชื้อ	PCG	AC	CC	SM	KM	EM	CP	SMX	OTC	CTC	OA
1.1/64	.0015	-	.04	.4	.6	.16	-	.2	-	-	*
1.2/64	.0015	-	.04	-	.6	-	-	.1	-	-	*
2/64	.0015	.0025	.04	.4	.6	.16	-	-	-	-	*
3.1/64	.0015	.0025	.08	-	-	.04	-	.1	-	-	*
3.2/64	.0015	.0025	.04	-	.6	-	-	.4	-	-	*
4.2/64	.0015	.0025	.04	.4	-	.08	-	.05	.1	-	-
5/64	.0015	.0025	.02	.8	.075	.08	-	.1	-	-	-
6/64	.0015	.0025	.04	-	.15	.08	-	.1	-	-	-

หมายเหตุ - = ค่า MIC สูงกว่า 4 เท่าของค่า MRL
* = ไม่ได้หาค่า MIC

ตารางที่ 6 ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ของยาที่ต่ำที่สุดที่เชื้อสามารถจะตรวจหาได้ (*Detectable concentration*) เมื่อทดสอบกับยาปฏิชีวนะในน้ำนม

ยาต้านจุลชีพ	4.2/64	Standard	MRL
PCG	0.025	.002-.006	.006(0.01 IU)
AC	.02	.002-.005	.010
CC	2.56	.015-.035	0.02
SM	3.2	3	0.2
KM	4.8	9-28	NA
GM	0.48	0.5-3.12	NA
EM	.32	0.5-2.25	0.04
CP	25	15	0
SMX	3.125	50-100	0.1
OTC	1.56	0.15-0.50	0.02
CTC	1.56	0.2-0.45	0.1
OA	100	25	0.2

ตารางที่ 7 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพความไว (sensitivity) ของเชื้อแบคทีเรีย "2/37" กับเชื้อมาตรฐาน *Bacillus sublilis* ATCC 6633 (gold standard) ในการตรวจหาสารต้านจุลชีพในน้ำนมดิบ

		การทดสอบโดย *B. subtilis* ที่ 37°C	
		ผลบวก	*ผลลบ*
การทดสอบโดยแบคทีเรีย	*ผลบวก*	16	17
"2/37"	*ผลลบ*	56	63

แบคทีเรีย "2/37" ให้ผลบวก (sensitivity) = 22.22 % (16/72)

ตารางที่ 8 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพความไว (sensitivity) ของเชื้อแบคทีเรีย "4.2/64" กับเชื้อมาตรฐาน *Bacillus stearothermophilus var carlidolactis* NIZO (gold standard) ในการตรวจหาสารต้านจุลชีพในน้ำนมดิบ

		การทดสอบโดย *B. stearothermophilus* ที่ 64°C	
		ผลบวก	*ผลลบ*
การทดสอบโดยแบคทีเรีย	*ผลบวก*	91	21
"4.2/64"	*ผลลบ*	21	19

แบคทีเรีย "4.2/64" ให้ผลบวก (sensitivity) = 81.25 % (91/112)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การอภิปรายผล (Discussion)

1. จากผลการวิจัย ชี้ให้เห็นว่า เชื้อแบคทีเรีย "4.2/64" ที่แยกได้นั้น มีความสามารถในการตรวจหายาปฏิชีวนะได้ในกลุ่มยา aminoglycoside เป็นส่วนใหญ่ รวมถึงยา sulfamethoxazole ได้ในระดับที่ดีกว่าเชื้อมาตรฐาน แต่ยังไม่ถึงค่า MRL ถึงแม้ว่า เชื้อแบคทีเรียที่ได้จะไม่มี detectable concentration ต่อยาทุกชนิดที่ทดสอบ แต่ยาที่ตรวจสอบได้ก็เป็นยาที่นิยมใช้แพร่หลายในอุตสาหกรรมนมการเลี้ยงโคนมในประเทศไทย (สมาคมมาตรฐานไทย, 2533) อย่างไรก็ตาม เราสามารถนำเชื้อนี้ซึ่งประสิทธิภาพความไว (sensitivity) ในการตรวจหายาปฏิชีวนะใกล้เคียงกับเชื้อมาตรฐาน (ตารางที่ 8) ไปตรวจหายาปฏิชีวนะร่วมกับเชื้อมาตรฐาน (gold standard) เพื่อให้สามารถเสริมประสิทธิภาพในการตรวจหายาปฏิชีวนะได้หลายชนิดขึ้น

2. เชื้อแบคทีเรีย "4.2/64" เป็นเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม thermophilic ซึ่งมีความเหมาะสมกว่าในการใช้ตรวจสอบยาปฏิชีวนะในน้ำนมจะดี เนื่องจาก เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่เจริญเติบโตที่ 37 ^{0}C อาจจะเกิดปัญหามีเชื้อแบคทีเรียในน้ำนมที่เจริญเติบโตที่อุณหภูมิเดียวกันนี้ (37 ^{0}C ซึ่งมีอยู่มาก) ทำให้เกิดปัญหาการอ่านผลได้

3. หลังจากที่ได้เชื้อแบคทีเรียที่มีค่า MIC ใกล้เคียงกับค่า MRL แล้ว เมื่อนำไปทดสอบหา detectable concentration โดยวิธี bioassay พบว่า จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่มี detectable concentration ในระดับที่ใกล้เคียงกับค่า MRL ลดลงไปมาก อาจมาจากเหตุผลที่ยาปฏิชีวนะไปจับกับโมเลกุลของ disk ซึ่งทำจาก cellulose acetate

4. สารละลายยาปฏิชีวนะตั้งต้น (stock solutions) ซึ่งใช้ ethyl alcohol และ 0.003 M sodium hydroxide เป็นตัวทำละลาย erythromycin และ oxolinic acid ตามลำดับ จะถูกเจือจางลงกว่า 15,625 และ 3,125 เท่า ตามลำดับ ในการเตรียมสารละลายยาปฏิชีวนะใช้งาน (working solutions) ด้วยน้ำกลั่นในวิธีการวิจัยขั้นตอนที่ 4 และด้วยน้ำนมในวิธีการวิจัยขั้นตอนที่ 5 ดังนั้น ethyl alcohol หรือ 0.003 M sodium hydroxide ในสารละลายยาปฏิชีวนะใช้งานจึงไม่มีผลต่อการแบ่งตัวของแบคทีเรียในการทดสอบ disk assay plate method ซึ่งสามารถพิสูจน์ได้ด้วยการทดสอบสารละลายทั้งสองชนิดในระดับความเข้มข้นที่ถูกเจือจางลงดังกล่าวโดยไม่มียาปฏิชีวนะผสมอยู่

5. ขั้นตอนการทดสอบหา detectable concentration ของยาปฏิชีวนะในน้ำนมนั้น ถึงแม้ว่าเชื้อแบคทีเรียจำนวน 6 เชื้อ จะมีค่า detectable concentration ที่ดีมากเมื่อใช้ทดสอบกับยาปฏิชีวนะอย่างเดียว แต่เมื่อนำมาทดสอบหาค่า detectable concentration กับยาที่ผสมในน้ำนม กลับพบว่าความสามารถในการตรวจหายานั้นลดลงไปอย่างมาก ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากเหตุผลหลักอันหนึ่งก็คือในน้ำนมมีส่วนประกอบของสารอาหารหลายชนิด เช่น ไขมัน (triglycerides, phospholipids) โปรตีน (casein, serum albumin, immunoglobulin) น้ำตาล (glucose) เกลือแร่ (calcium) เป็นต้น ซึ่งสารดังกล่าวอาจจะไปรวมตัวเข้ากับยาปฏิชีวนะ ทำให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ได้เต็มที่ กรณีของโปรตีนสามารถรวมตัวเข้ากับยา (drug-protein binding) ได้ด้วยพันธะ 4 ชนิด คือ ionic (electrostatic),

hydrophobic, hydrogen และ Van der Waals ตัวอย่างของยาบางชนิดสามารถจับกับโปรตีน เช่น erythromycin จับกับ alpha-,beta-, และ gamma-globulins ส่วน tetracycline จะจับกับ lipoprotein นอกจากนี้ pH ที่ลดลง อาจจะช่วยลดการจับกันของยาและโปรตีนอีกด้วย (Craig, 1991)

6. ในการศึกษาครั้งนี้ เลือกยาปฏิชีวนะบางตัวที่เป็นตัวแทนของยาปฏิชีวนะกลุ่มต่าง ๆ และเป็นยาที่มีการใช้อย่างแพร่หลาย อย่างไรก็ตาม จากผลการวิจัย พบว่า เชื้อแบคทีเรีย "4.2/64" สามารถตรวจหายา sulfamethoxazole ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม sulfonamide ที่มี detectable concentration ค่อนข้างต่ำ ดังนั้น จึงอาจจะสามารถคาดหมายได้ว่า เชื้อนี้จะสามารถตรวจหายาชนิดอื่นในกลุ่มนี้ได้ไวด้วย

ข้อสรุป (Conclusion)

1. เชื้อแบคทีเรียที่ "4.2/64" เป็นเชื้อแบคทีเรียที่เจริญได้ที่อุณหภูมิสูง หรือ เรียกว่า thermophilic bacteria มี detectable concentration ที่ดีกว่าเชื้อมาตรฐาน ต่อยาในกลุ่ม aminoglycosides (kanamycin และ gentamicin ยกเว้น streptomycin ซึ่งมีผลใกล้เคียงกัน) ยา erythromycin และ ยา sulfamethoxazole

2. ผลการวิจัยครั้งนี้ถือประสบความสำเร็จในระดับหนึ่งเท่านั้น เนื่องจากว่า มีแนวโน้มว่าเชื้อบางตัวที่แยกได้นั้น มีค่า MIC ที่ค่อนข้างต่ำ หรือ มีค่าใกล้เคียงกับค่า MRL ต่อยาหลาย ๆชนิด แต่เมื่อนำไปทดสอบจริงโดยวิธี bioassay กลับได้ผลไม่เป็นที่น่าพอใจ

ข้อเสนอแนะ (Suggestion for further work)

1. ในขั้นตอนการถ่ายเชื้อจากตัวอย่างน้ำพุร้อน อาจจะใช้วิธีการกรองเพียงเพิ่มความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียก่อนจะนำไปเพาะเชื้อลงใน BHI และยังสามารถประหยัดปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI ได้ด้วย

2. เนื่องด้วย ข้อสังเกตอันอาจจะเป็นสาเหตุหลักสาเหตุหนึ่งที่ทำให้งานวิจัยไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร ก็คือ การที่ยาปฏิชีวนะไปรวมตัวกับโปรตีนหรือส่วนประกอบอื่นในน้ำนม ดังนั้น ทางออกที่อาจจะเป็นการแก้ไขอุปสรรคนี้ คือ การแยกส่วนประกอบบางอย่างในน้ำนมออกก่อน โดยอาจจะใช้วิธีการปั่นแยก (Centrifugation) เพื่อมิให้ยาไปรวมตัวกับส่วนประกอบบางอย่างในน้ำนม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ส่วนอ้างอิง (References)

เกรียงศักดิ์ สายธนู. 2536. รายงานผลการวิจัยทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช เรื่อง การต้านยาและการถ่ายทอดการต้านยาของซาลโมเนลล่า.

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข. 2522. กำหนดนมโคเป็นอาหารควบคุมเฉพาะและกำหนดมาตรฐานและวิธีการผลิต ประกาศในราชกิจจานุเบกษา ฉบับพิเศษ ฉบับที่ 26 เล่มที่ 96 ตอนที่ 163 วันที่ 21 กันยายน 2522.

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข. 2528. นมผงดัดแปลงสำหรับทารก ประกาศในราชกิจจานุเบกษา ฉบับพิเศษ ฉบับที่ 85 เล่ม 102 ตอนที่ 24 วันที่ 21 กุมภาพันธ์ 2528.

สมาคมมาตรฐานไทย. 2533. สารตกค้างจากยาสัตว์และเคมีภัณฑ์ในน้ำนมและผลิตภัณฑ์นม. สรุปการสัมมนาที่จัดโดยสมาคมมาตรฐานไทย, สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมและบริษัทเนสท์เล่(ประเทศไทย) จำกัด, โรงแรมเอเชีย, 5 ตุลาคม 2533 242 หน้า

Barry, A.L. 1976. Agar Dilution Techniques. In *The antimicrobic susceptibility test : Principles and practices*. Lea & Febiger, Philadelphia. pp. 76-89.

Barry, A.L. 1976. Antimicrobic dilution tests: quality control and troubleshooting. In *The antimicrobic susceptibility test : Principles and practices*. Lea & Febiger, Philadelphia. pp. 76-89.

Bishop, J.R., Duncan, S.E., Jones, G.M., and Whittier,W.D. 1991. Evaluation of Animal Drug Residue Detection Methods. Virginia Polytechnic Institute and State University, VA. : 45 pages.

Bodyfelt, F.W. 1992. Human Health Aspects of Drug Residues in Milk Handout from Milk Dairy Beef Quality Assurance Center, IA, USA. 5 pages.

Booth, J.M. and Harding, F.. 1986. Testing for antibiotic residues in milk. Vet. Rec. 119 : 565-569.

Craig, W.A. and Suh, B. 1991. Protein binding and the antimicrobial effects: Methods for the determination of protein binding. In *Antibiotics in laboratory medicine*, edited by V. Lorian Williams & Wilkins, Baltimore. pp. 367-390.

Heeschen, W.H. 1993. Residues of antibiotics and sulfonamides in milk : Significance and toxicological evaluation, legal situation within the European Community (EC) and method-related activities of the International Dairy Federation(IDF).

IDF.1987. Milk and Milk Products-Detection of Inhibitor. Bulletin of the International Dairy Federation, No.220. 78 pages.

International Dairy Federation. 1993. Inhibitory substances in milk-Current Analytical Practice. Bull. Int. Dairy Fed. No. 283/1993. 76 pages.

Jones, G.M., Bishop, S.R., and Whitter, W.D.. 1991. On-farm tests for drug residues in milk and dairy beef. Dairy Guidelines 1991. Virginia Co-operative Extension, VA. : 6 pages.

Tilton R. C.. 1991. Automation and mechanization in antimicrobial susceptibility testing. In *Antibiotics in laboratory medicine*, edited by V. Lorian Williams & Wilkins, Baltimore. pp. 106-117.

WHO.(World Health Organization). 1969. WHO Technical Report Series No.430. Geneva. Cited by : Booth, J.M. and Harding, F. 1986. Testing for antibiotic residues in milk. The Vet.Record. December 6, 1986. 565-569.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย