จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย
เรื่อง

ความสำคัญของสารยับยั้งแบคทีเรียในธรรมชาติ ลัยโซซัยม์และแล็คโตเฟอร์รินต่อชุดตรวจสอบยาปฏิชีวนะ "เคเอส-9"

โดย

เกรียงศักดิ์ สายธนู
ธงชัย เฉลิมชัยกิจ

615.329
ก768ค

กรกฎาคม 2543

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย
เรื่อง

ความสำคัญของสารยับยั้งแบคทีเรียในธรรมชาติ ลัยโซซัยม์และแล็คโตเฟอร์รินต่อชุดตรวจสอบยาปฏิชีวนะ "เคเอส-9"

โดย

เกรียงศักดิ์ สายธนู
ธงชัย เฉลิมชัยกิจ

กรกฎาคม 2543

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I19801610 20 ก.พ. 2545

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

โครงการวิจัยเรื่อง ความสำคัญของสารยับยั้งแบคทีเรียในธรรมชาติ ลัยโซซัยม์และแล็คโต-เฟอร์รินต่อชุดตรวจสอบหายาปฏิชีวนะ "เคเอส-9" ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่งมา ณ โอกาสนี้ นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสหกรณ์โคนมมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี และฟาร์มโคนมอำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ที่ให้ความอนุเคราะห์เก็บตัวอย่างน้ำนมโค รวมทั้ง นายสัตวแพทย์วีระศักดิ์ อ้นโยธา และอาจารย์ นายสัตวแพทย์ ชัยเดช อินทร์ชัยศรี ที่ช่วยประสานงานในการเก็บตัวอย่างน้ำนมโค นายมณฑล เลิศวรปรีชา และนายธงชัย เขียนแก้ว เพื่อนร่วมงานในห้องปฏิบัติการพัฒนาชุดตรวจสอบยาตกค้าง "เคเอส-9" และศูนย์ติดตามการดื้อยาของเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ (โดยความร่วมมือขององค์การอนามัยโลก) ที่ช่วยเหลือในการเตรียมชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" และในการวิจัย

การวิจัยโครงการนี้ มีความจำเป็นต้องขยายเวลาในการส่งรายงานฉบับสมบูรณ์ เนื่องจากรองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. เกรียงศักดิ์ สายธนู ซึ่งเป็นผู้รับทุนวิจัยได้ถึงแก่กรรมก่อนการโครงการวิจัยนี้จะเสร็จสมบูรณ์ ดังนั้นคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยจึงได้มอบหมายให้ รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ธงชัย เฉลิมชัยกิจ เป็นผู้ดำเนินการวิจัยต่อในส่วนที่เหลือ เนื่องจากการวิจัยนี้มีส่วนเกี่ยวข้องกับการศึกษาและพัฒนาผลงานสิ่งประดิษฐ์ "เคเอส-9 " ซึ่งเป็นชุดตรวจสอบเบื้องต้น (Sreening Test Kit) ในการหายาปฏิชีวนะและยาซัลฟาตกค้างในน้ำนมโคที่พัฒนาโดย รศ. น.สพ. ดร. เกรียงศักดิ์ สายธนู และ รศ. น.สพ. ดร. ธงชัย เฉลิมชัยกิจ

คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าผลงานที่เกิดขึ้นจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนามาตรฐานอุตสาหกรรมการเลี้ยงโคนมและการผลิตน้ำนมพร้อมดื่มได้ไม่มากก็น้อย รวมทั้งสามารถช่วยลดการพึ่งพาเทคโนโลยีจากต่างประเทศในการใช้ชุดตรวจสอบหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมโค หากมีผลกรรมดีที่เกิดจากคุณประโยชน์ของงานวิจัย ผู้ร่วมงานวิจัยขออุทิศให้ รศ. น.สพ. ดร. เกรียงศักดิ์ สายธนู ผู้ซึ่งเป็นนักวิจัยและพัฒนาเพื่อมุ่งหวังแก้ไขปัญหาของสังคมตลอดมา

ชื่อโครงการ : **ความสำคัญของสารยับยั้งแบคทีเรียในธรรมชาติ ลัยโซซัยม์และแล็คโตเฟอร์ริน ต่อชุดตรวจสอบยาปฏิชีวนะ "เคเอส-9"**

ชื่อผู้วิจัย : เกรียงศักดิ์ สายธนู และ ธงชัย เฉลิมชัยกิจ

เดือนและปีที่ทำวิจัยสำเร็จ : กรกฎาคม 2543

บทคัดย่อ

การศึกษาอิทธิพลของลัยโซซัยม์และแล็คโตเฟอร์รินโดยการเติมลงในน้ำนมโคต่อการเกิดผลบวกเท็จของชุดตรวจสอบยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมโคที่พัฒนาขึ้นใหม่ "เคเอส-9" พบว่าจะต้องมีปริมาณอย่างน้อยที่สุดเท่ากับหรือมากกว่า 2.38-4.75 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 9.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงกว่าลัยโซซัยม์และแล็คโตเฟอร์รินในน้ำนมโคที่พบในธรรมชาติมาก นอกจากนี้ไม่พบว่าลัยโซซัยม์และแล็คโตเฟอร์รินมีการเสริมฤทธิ์ซึ่งกันและกันเมื่อทดสอบด้วยชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" แสดงว่าชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" มีความไวรับต่ำต่อสารทั้ง 2 ชนิดนี้ ทั้งนี้ การทำลายคุณสมบัติสารต้านจุลชีพของลัยโซซัยม์ต้องใช้ความร้อนที่สูงกว่าแล็คโตเฟอร์ริน และพบว่าการอุ่นตัวอย่างที่อุณหภูมิ 98±2 ^{o}เซลเซียส จะให้ผลดีกว่าที่อุณหภูมิ 83±1 ^{o}เซลเซียส

ตัวอย่างน้ำนมโคในวันที่ 1 ถึงวันที่ 3 หลังคลอดสามารถทำให้เกิดผลบวกเท็จในชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ได้สูงถึง 100 % จากนั้นจะลดลงตามลำดับคือ 72, 60, 44, 16, 12, 4 และ 0 % ในวันที่ 4 ถึงวันที่ 10 หลังคลอด ตามลำดับ การอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ 83±1 ^{o}เซลเซียส และ 98±2 ^{o}เซลเซียส ก่อนการทดสอบด้วยชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" จะสามารถลดเปอร์เซ็นต์การเกิดผลบวกเท็จได้น้อยมากในตัวอย่างน้ำนมหลังคลอดวันที่ 1 และวันที่ 2 แต่การอุ่นตัวอย่างน้ำนมจะมีประสิทธิภาพดีขึ้นในการลดการเกิดผลบวกเท็จเมื่อทำการทดสอบตัวอย่างน้ำนมโคในวันที่ 3 หลังคลอดเป็นต้นไป โดยเปอร์เซ็นต์การเกิดผลบวกเท็จจะลดลงตามลำดับ และเหลือ 0 % ในวันที่ 7 หลังคลอดเมื่อทำการอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ 98±2 ^{o}เซลเซียส นาน 5 นาที ดังนั้นการเกิดผลบวกเท็จของชุดตรวจสอบยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมโค "เคเอส-9" หลังจากการอุ่นตัวอย่างน้ำนมโคหลังคลอดแล้วก็ดีจึงอาจเกิดจากสารต้านจุลชีพตามธรรมชาติชนิดอื่นๆ ที่ทนต่อความร้อนได้ดีกว่าลัยโซซัยม์และแล็คโตเฟอร์ริน

Project Title : The Significance of Natural Bacterial Inhibitors, Lysozyme and Lactoferrin on Antibiotic Residue Screening Test Kit "KS-9"

Name of the Investigators : Kriengsag Saitanu and Thongchai Chalermchaikit

Year : July 2000

Abstract

The new developed antibiotic residue screening test kit in dairy milk "KS-9" had been found to be influenced by spiked lysozyme and lactoferrin in dairy milk. The false positive of "KS-9" occurred when milk samples contained lysozyme equal or higher than 2.38-4.75 μg/mL or lactoferrin equal or higher than 9.0 mg/mL which were the higher concentrations than those found in natural dairy milk. Besides, lysozyme and lactoferrin in milk sample had not shown any synergistic effect when testing with "KS-9". This revealed that "KS-9" was not susceptible to lysozyme and lactoferrin. Heating milk samples could reduce antimicrobial properties of lysozyme and lactoferrin. However, lysozyme was more heat resistant than lactoferrin. Therefore, heating milk samples at 98±2 ^{O}C was found more effective than at 83±1 ^{O}C for destroying natural inhibitors in dairy milk.

Colostrum from Day-1 to Day-3 post-calving could cause 100 % false-positive on "KS-9". The percentages of false-positive were declining to 72, 60, 44, 16, 12, 4, and 0 % on Day-4 to Day-10 post-partum, respectively. Heating the Day-1 and Day-2 post-partum milk samples at 83±1 ^{O}C or 98±2 ^{O}C could not significantly reduce the false-positive of "KS-9". However, the heating process were able to dramatically decrease the false-positive of "KS-9" when treating Day-3 post-partum samples and beyond. The Day-7 post-partum samples were not cause false-positive after heating at 98±2 ^{O}C for 5 minute before testing with "KS-9". The false-positive results of "KS-9" after heating the post-partum milk samples suggested that there were other natural inhibitors which were able to resist heating process better than lysozyme and lactoferrin.

สารบัญ (Table of Contents)

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)	i
บทคัดย่อภาษาไทย และภาษาอังกฤษ (Abstracts)	ii
สารบัญ (Table of Contents)	vi
รายการตารางประกอบ (List of Tables)	v
รายการภาพประกอบ (List of Figures)	vi
รายการสัญญลักษณ์ (List of Symbols)	vii
บทนำ (Introduction)	1
การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Survey of Related Literature)	3
วิธีการวิจัย (Procedures)	5
ผลการวิจัย (Results)	9
การอภิปรายผล (Discussion)	14
ข้อสรุป (Conclusion)	18
ข้อเสนอแนะ (Sugestion for Further Work)	20
ส่วนอ้างอิง (References)	26
ภาคผนวก (Appendixs)	
ชุดตรวจสอบยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมโค "เคเอส-9"	29

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ (List of Tables)

หน้า

ตารางที่ 1 ผลของ Lysozyme ต่อการให้ผลบวกของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" (คิดเป็นเปอร์เซนต์ที่ให้ผลบวก) ก่อนและหลังการอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ $83 \pm 1\,^{o}C$ และ $98 \pm 2\,^{o}C$ ที่ระยะเวลาต่างๆ 21

ตารางที่ 2 ผลของ Lactoferrin ต่อการให้ผลบวกของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" (คิดเป็นเปอร์เซนต์ที่ให้ผลบวก) ก่อนและหลังอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ $83 \pm 1\,^{o}C$ และ $93 \pm 2\,^{o}C$ ที่ระยะเวลาต่างๆ 22

ตารางที่ 3 ผลของ Lysozyme ร่วมกับ Lactoferrin ต่อการให้ผลบวกของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" (คิดเป็นเปอร์เซนต์ที่ให้ผลบวก) ก่อนและหลังการอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ $83 \pm 1\,^{o}C$ และ $98 \pm 2\,^{o}C$ ที่ระยะเวลาต่างๆ 23

ตารางที่ 4 การเกิดผลบวกเท็จจากการตรวจตัวอย่างน้ำนมโคหลังคลอดวันที่ 1-10 ของโคนม จำนวน 25 ตัว ด้วยชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" และอิทธิพลของความร้อนต่อตัวอย่างน้ำนมโคหลังคลอดซึ่งมีผลต่อชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" 24

ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบปริมาณของเอ็นซัยม์ lysozyme (μg/ml) และสาร lactoferrin (mg/ml) ในการทำให้ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9", Delvotest-P^{R} และวิธีการ Microbial Inhibition Disk Assay (MIDA) เกิดผลบวกเท็จ 25

ตารางที่ ๑ ปริมาณยาปฏิชีวนะและยาซัลฟาที่น้อยที่สุด (μg/ ml; Detection Limits) ในตัวอย่างน้ำนมโคที่ชุดตรวจสอบ "เค เอส-9" , Delvotest-P^{R} และ ADM^{R} สามารถให้ผลบวก 34

ตารางที่ ๒ แสดงเปอร์เซ็นต์ค่าความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) และความแม่นยำ (Accuracy) ของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" เมื่อใช้ตรวจสอบตัวอย่างน้ำนมโคที่ไม่เคยได้รับยา และที่กำลังได้รับยาจากฟาร์ม 2 แห่ง และจากโคของเกษตรกรทั่วไปที่กำลังได้รับการรักษาโรคเต้านมอักเสบ 35

รายการภาพประกอบ (List of Figures)

หน้า

ภาพที่ ๑ หลอดพลาสติค(5 x 5 แถว) สำหรับเตรียมชุดตรวจสอบหายาปฏิชีวนะและยาซัลฟาตกค้างในน้ำนมโค "เคเอส-9" ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 มิลิเมตร และสูง 39 มิลลิเมตร 29

ภาพที่ ๒ แผนภูมิแสดงหลักการของชุดตรวจสอบยาปฏิชีวนะและยาซัลฟาตกค้างในน้ำนมโค "เคเอส-9" 30

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการสัญญลักษณ์ (List of Symbols)

%	percentage
LF	lactoferrin
LZ	lysozyme
mg/mL	miligram per millilitre
mL	millilitre
mm	milimetre
^{o}C	degree Celcius
ppb	part per billion
ppm	part per million
µg/mL	microgram per millilitre

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความสำคัญของสารยับยั้งแบคทีเรียในธรรมชาติ ลัยโซซัยม์และแล็คโตเฟอร์รินต่อชุดตรวจสอบยาปฏิชีวนะ "เคเอส-9"

บทนำ (Introduction)

ปัญหาการตกค้างของยาปฏิชีวนะในน้ำนมโคเป็นเรื่องที่ได้รับความสนใจจากนักวิชาการและประชาชนมากที่สุดเรื่องหนึ่ง เนื่องจากความวิตกถึงผลข้างเคียงต่อสุขภาพของผู้บริโภค เช่น อาจทำให้เกิดอาการแพ้ (allergic reactions) การดื้อยาของจุลินทรีย์ (antimicrobial drug resistance) สาเหตุของมะเร็ง (carcinogenic effect) และความเป็นพิษต่อทารกในครรภ์ (teratogenic effcets) (Coleman, 1986; Huber, 1986; Gustafson, 1991) นอกจากนี้ ยังมีผลกระทบต่ออุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์นมแปรรูป เช่น การผลิตนมเปรี้ยว และเนยแข็ง เป็นต้น (Mol, 1975) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการตรวจยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมซึ่งส่วนใหญ่จะนิยมใช้ชุดตรวจสอบเบื้องต้น (screening test kits) ซึ่งสามารถทราบผลการตรวจได้ภายในเวลา 3-4 ชั่วโมง เช่น Delvotest-P^{R} (DSM., The Netherlands), Charm Farm Test^{R} (Charm Sciences Inc., The USA) และ ADM^{R} (Copan Italia Inc., Italy) เป็นต้น ทั้งนี้ราคาของชุดตรวจสอบดังกล่าวเป็นค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างสูงสำหรับเกษตรกร และโรงงานที่รับซื้อน้ำนมดิบ ดังนั้นโดยความสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติจึงได้สนับสนุนให้ดำเนินการพัฒนาชุดตรวจสอบยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมโคขึ้นในประเทศไทย และให้ชื่อชุดตรวจสอบนี้ว่า "เคเอส-9" (เกรียงศักดิ์และธงชัย, 2541) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการตรวจหายาปฏิชีวนะและยาในกลุ่มซัลโฟนามายส์ได้ดีทัดเทียมกับชุดตรวจสอบที่นำเข้าจากต่างประเทศ แต่มีราคาค่าใช้จ่ายที่ถูกกว่า 2-3 เท่า

ทั้งนี้ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" และชุดตรวจสอบที่ผลิตในต่างประเทศส่วนใหญ่ เช่น Delvotest-P^{R}, ADM^{R}, Charm AIM-96^{R} และ Charm Farm Test^{R} ใช้หลักการ Microbial inhibition assay โดยมีแบคทีเรีย *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* เป็นตัวบ่งชี้ว่ามียาปฏิชีวนะตกค้างอยู่ในตัวอย่างน้ำนมหรือไม่ ดังนั้นจึงอาจให้ผลบวกเท็จได้ถ้าตัวอย่างน้ำนมดิบนั้นได้จากโคที่สุขภาพไม่สมบูรณ์ หรือเป็นน้ำนมเหลืองหลังคลอด (colostrum) หรือจากโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ เนื่องจากตัวอย่างน้ำนมดังกล่าวจะมีสารยับยั้งแบคทีเรียในธรรมชาติหรือสารต้านจุลชีพตามธรรมชาติ (natural inhibitory substances) เช่น lysozyme, lactoferrin และ lactoperoxidase ใน

ปริมาณที่ค่อนข้างสูงซึ่งจะมีผลรบกวนต่อการแบ่งตัวของ *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ในชุดตรวจสอบ (Beukers 1993; Halbert *et al.*, 1996)

Carlsson *et al.* (1989) ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของเอ็นซัยม์ lysozyme และสาร lactoferrin รวมทั้ง somatic cells ต่อชุดตรวจสอบ Delvotest-P^{R} และพบว่าการเกิดผลบวกเท็จของชุดตรวจสอบ Delvotest-P^{R} มีความสัมพันธ์กับปริมาณของ lysozyme และ lactoferrin เพิ่มขึ้นในน้ำนม นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Carlsson และ Bjorck (1987) ซึ่งทดลองผลของ lysozyme ที่แยกจากน้ำนมของมนุษย์ (เนื่องจากหา lysozyme ที่แยกจากน้ำนมโคไม่ได้) และ lactoferrin ที่แยกจากน้ำนมของโคก็พบว่าสารทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวสามารถเสริมฤทธิ์กันในการทำให้ Delvotest-P^{R} ให้ผลบวกเท็จ นอกจากนี้ มีรายงานหลายฉบับที่ศึกษาผลของการตรวจตัวอย่างน้ำนมโคดิบที่ได้จากเต้านมอักเสบด้วยวิธีและชุดตรวจสอบที่ใช้แบคทีเรียเป็นตัวบ่งชี้ว่ามียาปฏิชีวนะตกค้างในตัวอย่างน้ำนม อาทิเช่น Cullor *et al.* (1992) ได้รายงานว่าตัวอย่างน้ำนมจากเต้านมอักเสบสามารถทำให้ชุดตรวจสอบ Charm Farm Test และ Delvotest-P^{R} รวมทั้งวิธีการ Disk assay ให้ผลบวกเท็จ นอกจากนี้การทดลองผสมเซรุ่มลงไปในตัวอย่างน้ำนมปกติเพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณของเม็ดเลือดขาวหรือ somatic cells ก็พบว่าสามารถทำให้เกิดผลเท็จของชุดตรวจสอบและวิธีการตรวจดังกล่าวด้วย

เนื่องจากคุณสมบัติของสารต้านจุลชีพตามธรรมชาติดังกล่าวไม่ทนต่อความร้อนได้ดีนัก (Weaver and Kroger, 1978) ดังนั้นการใช้ชุดตรวจสอบหายาปฏิชีวนะตกค้างในตัวอย่างน้ำนมดิบจึงมีคำแนะนำว่าควรทำการอุ่นตัวอย่างน้ำนมดิบที่อุณหภูมิ 82 ^{o}C นาน 3 นาที ก่อนทำการทดสอบเพื่อเป็นการทำลายสารต้านจุลชีพตามธรรมชาติในน้ำนมซึ่งจะลดปัญหาการเกิดผลบวกเท็จได้อย่างมีประสิทธิภาพ (IDF, 1987; Oliver *et al.*, 1990) ในปัจจุบันผู้ผลิตชุดตรวจสอบ Delvotest-P^{R} ได้แนะนำให้ใช้อุณหภูมิและเวลาที่สูงขึ้นในการอุ่นตัวอย่างน้ำนมดิบก่อนทำการทดสอบ คือ 98$\pm$2 ^{o}C เป็นเวลานาน 5 นาที (ใบกำกับสินค้า Delvotest-P^{R}/ Delvotest-P Mini^{R}, DSM, The Netherlands) รวมทั้งเกรียงศักดิ์และธงชัย (2541) ก็ได้รายงานในทำนองเดียวกันว่าการอุ่นตัวอย่างน้ำนมดิบก่อนทำการทดสอบด้วยชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ที่อุณหภูมิ 98$\pm$2 ^{o}C นาน 5 นาที จะลดอัตราการเกิดผลบวกเท็จได้ดีกว่าการอุ่นตัวอย่างน้ำนมดิบที่ 83$\pm$1 ^{o}C นาน 3 นาที

ดังนั้น เพื่อให้เกิดความเข้าใจในเรื่องอิทธิพลของเอ็นซัยม์ lysozyme และสาร lactoferrin ในน้ำนมดิบ รวมทั้งน้ำนมเหลืองหลังคลอด (colostrum) ต่อประสิทธิภาพและความน่าเชื่อถือของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ซึ่งเป็นชุดตรวจสอบหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมโคที่พัฒนาขึ้นใหม่และกำลังผลิตในเชิงพาณิชย์โดยคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จึงจำเป็นที่จะต้องทำการวิจัยเพื่อหาความสัมพันธ์ของปริมาณ lysozyme, lactoferrin และระยะเวลาของน้ำนมหลัง

คลอดกับการเกิดผลบวกเท็จของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" รวมทั้งผลของความร้อนและระยะเวลาที่ใช้ในการอุ่นตัวอย่างน้ำนมโคดิบต่อ lysozyme. lactoferrin และน้ำนมหลังคลอดที่สามารถแก้ไขปัญหาการเกิดผลบวกเท็จเมื่อทดสอบตัวอย่างน้ำนมโคดิบด้วยชุดตรวจสอบ "เคเอส-9"

การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Survey of Related Literature)

แหล่งกำเนิดของเอ็นซัยม์ lysozyme ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่ก็มีหลายทฤษฎีที่กล่าวอ้างว่า lysozyme ถูกขับออกมาจากเซลล์เยื่อบุของผนังเต้านม หรือสร้างขึ้นโดยเม็ดเลือดแดง และ/หรือ เม็ดเลือดขาว อย่างไรก็ดี นักวิชาการทุกท่านต่างยอมรับว่าปริมาณของ lysozyme เพิ่มขึ้นมากกว่าปกติในน้ำนมเหลืองหลังคลอดและในขณะที่มีการอักเสบในเต้านม ส่วนสาร lactoferrin เชื่อว่าขับออกมาจากเยื่อบุของผนังเต้านมด้านใน (Persson *et al.*, 1992) โดยฮอร์โมน ACTH และ oxytocin อาจมีส่วนช่วยในการเร่งให้มีการขับ lactoferrin เพิ่มขึ้น (Thomas and Fell, 1985) เช่นเดียวกันกับใน lysozyme นักวิชาการพบว่าระดับของ lactoferrin จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นในน้ำนมเหลืองหลังคลอด และน้ำนมจากเต้านมอักเสบ (Beukers 1993) ทั้ง lysozyme และ lactoferrin มีคุณสมบัติสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของแบคทีเรีย (Elliot *et al.*, 1984) หรือทำให้แบคทีเรียอ่อนกำลังลงเพื่อให้ plasma cells สามารถกำจัดแบคทีเรียได้ง่ายขึ้น (Rainard, 1987) ปริมาณของ lysozyme ในน้ำนมโคปกติจะมีประมาณ 0.13 µg/mL ส่วน lactoferrin จะมีปริมาณมากกว่าคือ 0.02-0.35 mg/mL (Korhonen, 1977) Harmon *et al.* (1975) ได้ทำการตรวจวัดระดับของ lactoferrin ในตัวอย่างน้ำนมจากแม่โคที่มีสุขภาพปกติจำนวน 20 ตัว ด้วยวิธี Electro-immuno diffusion (EID) พบว่ามีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.35 mg/mL แต่ระดับของ lactoferrin ในตัวอย่างน้ำนมจากแม่โค 11 ตัวที่มีอาการเต้านมอักเสบจะมีค่าเฉลี่ยในวันแรกที่มีพบอาการเต้านมอักเสบเท่ากับ 0.55 mg/mL และจะเพิ่มสูงขึ้นเป็น 1.89 mg/mL ในวันที่ 3 หลังจากเริ่มแสดงอาการ สำหรับรายงานการตรวจวัดระดับของ lactoferrin ในตัวอย่างน้ำนมหลังคลอดโดย Sanchez *et al.* (1988) พบว่าจะมีค่าสูงประมาณ 0.83 mg/mL แล้วจะลดลงอย่างรวดเร็วภายใน 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงจะลดลงอย่างช้าๆ และเริ่มคงที่ในระดับปกติในวันที่ 21 หลังคลอด

ตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากโคนมที่มีสุขภาพสมบูรณ์ ไม่ใช่น้ำนมเหลืองหลังคลอด และไม่เป็นโรคเต้านมอักเสบจะเป็นน้ำนมที่มีสารต้านจุลชีพตามธรรมชาติในปริมาณที่น้อยมากซึ่งจะไม่มีผลรบกวนต่อชุดตรวจสอบยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมโคและทำให้เกิดผลบวกเท็จ (Beukers 1993; Halbert *et al.*, 1996) ทั้งนี้สารต้านจุลชีพตามธรรมชาติในน้ำนมโคดิบของโคนมในบางประเทศมีระดับที่ค่อนข้างต่ำ ดังมีรายงานของ Beukers (1993) ซึ่งกล่าวว่าสารต้านจุลชีพตามธรรมชาติใน

น้ำนมโคดิบในประเทศเนเธอร์แลนด์พบว่ามีมากกว่าค่าปกติเพียง 0.02 % และในประเทศสหรัฐอเมริกา Halbert *et al* (1996) ก็พบว่าสารต้านจุลชีพตามธรรมชาติในน้ำนมโคดิบมีมากกว่าค่าปกติเพียง 0.01 % เท่านั้น คุณสมบัติของน้ำนมโคดิบที่ได้กล่าวถึงอาจจะต่างกับน้ำนมโคดิบในประเทศไทยมาก ดังรายงานของ Amonsin *et al.* (1996) ที่ตรวจพบว่าวิธีการ Microbial inhibition disk assay ซึ่งใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และ *Micrococcus luteus* ในการตรวจหายาปฏิชีวนะตกค้างในตัวอย่างน้ำนมโคดิบในประเทศไทยโดยไม่ได้ทำการอุ่นตัวอย่างก่อนการทดสอบพบว่าให้ผลบวกเท็จ 7.5 % ส่วนธงชัยและคณะ (2537) ใช้ชุดตรวจสอบ Delvotest-P^{R} ในการตรวจตัวอย่างน้ำนมโคดิบโดยไม่ได้ทำการอุ่นตัวอย่างก่อนการทดสอบพบว่าจะมีผลบวกเท็จสูงถึง 18 % นอกจากนี้ เกรียงศักดิ์และธงชัย (2541) พบว่าตัวอย่างน้ำนมดิบที่ได้จากโคนมปกติและไม่ได้รับยาปฏิชีวนะใดๆ เป็นระยะเวลา 21 วัน สามารถทำให้ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" เกิดผลบวกเท็จได้สูงถึง 67.1 % (198 ตัวอย่าง จาก 259 ตัวอย่าง) แสดงว่าตัวอย่างน้ำนมโคดังกล่าวมีปริมาณสารต้านจุลชีพตามธรรมชาติค่อนข้างสูง

จากการทดลองเปรียบเทียบการอุ่นตัวอย่างน้ำนมดิบที่อุณหภูมิ 83$\pm$1 ^{o}C นาน 3 นาที กับการอุ่นตัวอย่างน้ำนมดิบที่อุณหภูมิ 98$\pm$2 ^{o}C นาน 5 นาที เพื่อทำลายสารต้านจุลชีพตามธรรมชาติก่อนที่จะนำไปตรวจหายาปฏิชีวนะตกค้างด้วยชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" พบว่าการอุ่นตัวอย่างน้ำนมโคดิบที่อุณหภูมิ 98$\pm$2 ^{o}C นาน 5 นาทีสามารถลดการเกิดผลบวกเท็จได้ 100 % แต่ก็จะทำให้เกิดผลลบเท็จ (ตัวอย่างน้ำนมดิบมียาปฏิชีวนะตกค้างแต่ให้ผลลบกับชุดตรวจสอบ "เคเอส-9") เพิ่มขึ้นประมาณ 3 % (เกรียงศักดิ์และธงชัย, 2541) การใช้อุณหภูมิ 98$\pm$2 ^{o}C อุ่นตัวอย่างน้ำนมโคดิบสอดคล้องกับการศึกษาของ Allison (1985) ที่แนะนำให้ทำการอุ่นตัวอย่างน้ำนมดิบให้ถึงอุณหภูมิ 95 ^{o}C อย่างรวดเร็วก่อนทำการตรวจหายาปฏิชีวนะตกค้าง และสนับสนุนข้อเสนอแนะของบริษัทผู้ผลิตชุดตรวจสอบ Delvotest-P^{R} ที่ให้ทำการอุ่นตัวอย่างน้ำนมดิบที่อุณหภูมิ 98$\pm$2 ^{o}C เป็นเวลานาน 5 นาที ก่อนนำไปทดสอบด้วยชุดตรวจสอบ Delvotest-P^{R} ในกรณีถ้าสงสัยว่าตัวอย่างน้ำนมดิบมีลักษณะผิดปกติ เช่น อาจมีน้ำนมเหลืองหลังคลอดปนเปื้อน หรือได้มาจากโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ (ใบกำกับสินค้า DSM, The Netherlands) ดังนั้น การทำลายสารต้านจุลชีพตามธรรมชาติในน้ำนมดิบด้วยการอุ่นที่อุณหภูมิ 83$\pm$1 ^{o}C นาน 3 นาที ก่อนทำการตรวจหายาปฏิชีวนะตกค้างด้วยวิธีการ Microbial inhibition assay ซึ่งเป็นข้อเสนอแนะของ International Dairy Federation (IDF) ประเทศสหรัฐอเมริกา (1987) ก็ยังคงสามารถใช้ได้ซึ่งจะมีประสิทธิภาพในการลดผลบวกเท็จได้น้อยกว่าการอุ่นที่อุณหภูมิ 98$\pm$2 ^{o}C นาน 5 นาที แต่ก็จะทำให้เกิดผลลบเท็จน้อยกว่าด้วยเช่นกัน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุดประสงค์ของการวิจัยในเรื่องนี้เพื่อทำการศึกษาผลของเอ็นซัมย์ lysozyme และสาร lactoferrin ในตัวอย่างน้ำนมโคที่มีต่อชุดตรวจสอบเบื้องต้นในการหายาปฏิชีวนะตกค้าง "เคเอส-9" ในประเด็นต่อไปนี้

(1) ปริมาณของ lysozyme และ lactoferrin ในตัวอย่างน้ำนมโคที่สามารถทำให้เกิดผลบวกเท็จ (false positive) ต่อชุดตรวจสอบ "เคเอส-9"

(2) อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการอุ่นตัวอย่างน้ำนมโคซึ่งจะสามารถทำลายคุณสมบัติของ lysozyme และ lactoferrin เพื่อป้องกันการเกิดผลบวกเท็จของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9"

(3) ระยะเวลาของตัวอย่างน้ำนมโคหลังคลอด (colostrum) ที่มีผลต่อชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ในการทำให้เกิดผลบวกเท็จ

(4) อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการอุ่นตัวอย่างน้ำนมโคหลังคลอดซึ่งจะสามารถทำลายคุณสมบัติของ lysozyme และ lactoferrin รวมทั้งสารต้านจุลชีพตามธรรมชาติอื่นๆ ในน้ำนมโคหลังคลอดเพื่อป้องกันการเกิดผลบวกเท็จของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9"

วิธีการวิจัย (Procedures)

วัสดุที่ใช้ในการวิจัย (Materials)

(1) เอ็นซัมย์ Lysozyme และสาร Lactoferrin

เนื่องจากไม่สามารถหา lysozyme ที่สกัดจากน้ำนมโคได้ ผู้วิจัยจึงใช้ lysozyme ที่สกัดจากไข่ขาวของไข่ไก่แทน (Chicken Egg White-Lysozyme (95 %), Sigma Lot 57 H 745) สำหรับสาร lactoferrin เป็นสารที่สกัดได้จากน้ำนมโค (Bovine milk-Lactoferrin (90 %), Sigma Lot 75 H 38173)

(2) ตัวอย่างน้ำนมโคหลังคลอด (Colostrum)

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำนมโคหลังคลอด (colostrum) จากแม่โค 25 ตัวที่ทราบประวัติแน่นอนว่าไม่ได้รับยาปฏิชีวนะใดๆ ในระยะเวลาอย่างน้อย 21 วัน ก่อนการเก็บตัวอย่าง โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำนมตั้งแต่วันแรกที่ลูกโคคลอดถึงวันที่ 10 หลังคลอด จากฟาร์มโคนมของเกษตรกรในเขตอำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี และจากเขตอำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม โดยเก็บตัวอย่างละ 20 mLจากถังนมรวมของทั้ง 4 เต้าของแม่โคแต่ละตัว แล้วใส่ในหลอดแก้วฝา

เกลียวขนาด 20 x 150 mm ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว ตัวอย่างน้ำนมจะถูกเก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำกว่า –10 °C. และทำการทดสอบด้วยชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ภายใน 7 วันหลังจากการเก็บตัวอย่าง

(3) ชุดตรวจสอบยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมโค "เคเอส-9"

ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" เป็นชุดตรวจสอบเบื้องต้น (screening test kit) ในการตรวจหายาปฏิชีวนะและยาซัลฟาตกค้างในตัวอย่างน้ำนมโค ผลิตโดยคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ส่วนประกอบหลักของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" คือ สปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus stearothermophilus var. calidolactis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม และสาร Bromcresol purple blue บรรจุอยู่ในหลอดพลาสติค (โพลี่โพรไพลีน) ขนาด 10 x 39 mm ปริมาณหลอดละ 0.3 mL และปิดฝาหลอดด้วยแผ่นอะลูมินั่มฟอยล์

ดำเนินการทดสอบตัวอย่างน้ำนมด้วยชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" โดยหยอดตัวอย่างน้ำนม 0.1 mL ลงไปในชุดตรวจสอบ แล้วนำไปอบเพาะที่อุณหภูมิ 65±1 °C ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) หรือแท่นให้ความร้อน (heater block) หลังจากการอบเพาะนาน 2 ชั่วโมง 30 นาที ให้ทำการอ่านสังเกตหลอดควบคุม (negative control) ที่ใส่ตัวอย่างน้ำนมไร้สารต้านจุลชีพก่อน ถ้าสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลืองให้ทำการอ่านผลของตัวอย่างที่ทดสอบทั้งหมดได้ แต่ถ้าของหลอดควบคุมยังเปลี่ยนเป็นสีเหลืองไม่หมด ให้อบเพาะต่อและสังเกตทุกๆ 10 นาที หลอดทดสอบที่สีของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองแสดงว่า ตัวอย่างน้ำนมที่ตรวจไม่มียาปฏิชีวนะตกค้าง ส่วนหลอดทดสอบที่ยังมีสีม่วงไม่เปลี่ยนแปลง หรือสีม่วงอาจจะจางลงไปแสดงว่าตัวอย่างน้ำนมมียาปฏิชีวนะ สำหรับหลอดทดสอบที่มีสีม่วงครึ่งบนและ สีเหลืองครึ่งล่าง แสดงว่าตัวอย่างน้ำนมมียาปฏิชีวนะปริมาณใกล้เคียงกับค่าต่ำสุดที่ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" สามารถตรวจพบ (รายละเอียดเพิ่มเติมของ ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" มีอยู่ในภาคผนวก)

ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย (Methods)

(1) การทดลองเรื่อง ปริมาณของเอ็นซัมย์ Lysozyme ในตัวอย่างน้ำนมโคที่มีผลต่อชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" และผลของความร้อนต่อเอ็นซัมย์ Lysozyme

การทดลองเรื่อง ปริมาณของ lysozyme ในตัวอย่างน้ำนมโคที่มีผลต่อการเกิดผลบวกเท็จชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" และผลของความร้อนต่อ lysozyme ซึ่งทำให้ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ไม่เกิดผลบวกเท็จ ให้ทำการเตรียมสารละลายตั้งต้น (working solution) ของ lysozyme ในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 50 mg/mL โดยใช้ volumetric flask ขนาด 25 mL จากนั้นเติม

สารละลายตั้งต้นลงไปในน้ำนมโค (เตรียมจากนมผงที่ไม่มียาปฏิชีวนะตกค้างและสารต้านจุลชีพใดๆ โดยทำการผสมนมผง 1 ส่วนน้ำหนัก ในน้ำกลั่น 6 ส่วนปริมาตร) ให้มีปริมาณของ lysozyme ในตัวอย่างน้ำนมโคเท่ากับ 0.59, 1.19, 2.38, 4.75, 9.5, 47.5, 95.0, 237.5. 475.0, 950.0 และ 4,750.0 μg/mL โดยใช้ volumetric flask ขนาด 25 mL

ทำการแบ่งตัวอย่างน้ำนมโคที่ทราบปริมาณของ lysozyme ทั้ง 11 ความเข้มข้นลงในหลอดแก้วขนาด 13 x 100 mm จำนวน 8 หลอด หลอดแก้วละ 2 mL แล้วทำการอุ่นตัวอย่างน้ำนมโคในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ดังนี้

(1.1) ทำการอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ 83±1 °C เป็นเวลานาน 1 นาที
(1.2) ทำการอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ 83±1 °C เป็นเวลานาน 3 นาที
(1.3) ทำการอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ 83±1 °C เป็นเวลานาน 5 นาที
(1.4) ทำการอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ 83±1 °C เป็นเวลานาน 10 นาที
(1.5) ทำการอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ 98±2 °C เป็นเวลานาน 1 นาที
(1.6) ทำการอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ 98±2 °C เป็นเวลานาน 3 นาที
(1.7) ทำการอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ 98±2 °C เป็นเวลานาน 5 นาที
(1.8) ทำการอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ 98±2 °C เป็นเวลานาน 10 นาที

เริ่มจับเวลาในการอุ่นตัวอย่างน้ำนมโคเมื่ออุณหภูมิของน้ำนมถึง 83 °C หรือ 98 °C ตามที่กำหนด หลังจากอุ่นตัวอย่างน้ำนมตามอุณหภูมิและเวลาที่กำหนดแล้ว ทำให้ตัวอย่างน้ำนมเย็นลงทันทีโดยแช่หลอดทดสอบลงในน้ำผสมน้ำแข็ง จากนั้นทำการทดสอบตัวอย่างน้ำนมที่ผสม lysozyme ที่ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งไม่ได้ผ่านความร้อน และที่ผ่านความร้อนดังใน (1.1) ถึง (1.8) ด้วยชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ทันทีโดยใช้ชุดตรวจสอบจำนวน 10 หลอดต่อแต่ละตัวอย่างน้ำนม และทำการทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง

(2) การทดลองเรื่อง ปริมาณของสาร Lactoferrin ในตัวอย่างน้ำนมโคที่มีผลต่อชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" และผลของความร้อนต่อสาร Lactoferrin

การทดลองเรื่อง ปริมาณของ lactoferrin ในตัวอย่างน้ำนมโคที่มีผลต่อการเกิดผลบวกเท็จชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" และผลของความร้อนต่อสาร lactoferrin ซึ่งทำให้ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ไม่เกิดผลบวกเท็จ ให้ทำการเตรียมสารละลายตั้งต้น (working solution) ของ lactoferrin ในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 50 mg/mL โดยใช้ volumetric flask ขนาด 25 mL จากนั้นเติมสารละลายตั้งต้นลงไปในน้ำนมโค (เตรียมจากนมผงที่ไม่มียาปฏิชีวนะและไม่มีสารต้านจุลชีพใดๆ

โดยทำการผสมนมผง 1 ส่วนน้ำหนัก ในน้ำกลั่น 6 ส่วนปริมาตร) ให้มีปริมาณของ lactoferrin ในน้ำนมโคเท่ากับ 3.6, 7.2, 9.0, 10.8 และ 14.4 mg/mL โดยใช้ volumetric flask ขนาด 25 mL

ทำการแบ่งตัวอย่างน้ำนมโคที่ทราบปริมาณของ lactoferrin ทั้ง 5 ความเข้มข้น ลงในหลอดแก้วขนาด 13 x 100 mm จำนวน 8 หลอด หลอดแก้วละ 2 mL แล้วทำการอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ 83±1 ^{o}C และ 98±2 ^{o}C เป็นเวลานาน 1, 3, 5 และ 10 นาที เช่นเดียวกับวิธีการดำเนินงานวิจัยในข้อ (1) ทำการทดสอบตัวอย่างน้ำนมที่ผสม lactoferrin ที่ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งไม่ได้ผ่านความร้อน และที่ผ่านความร้อนด้วยชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" โดยใช้ชุดตรวจสอบจำนวน 10 หลอดต่อแต่ละตัวอย่างน้ำนม และทำการทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง เช่นเดียวกับวิธีการดำเนินการวิจัยในข้อ (1)

(3) การทดลองเรื่อง อิทธิพลของเอ็นซัยม์ Lysozyme ร่วมกับสาร Lactoferrin ในตัวอย่างน้ำนมโคที่มีผลต่อชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" และผลของความร้อนต่อสารผสมทั้งสองชนิด

การทดลองเรื่อง อิทธิพลของเอ็นซัยม์ lysozyme ร่วมกับสาร lactoferrin ในตัวอย่างน้ำนมโคที่มีผลต่อการเกิดผลบวกเท็จของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" และผลของความร้อนต่อสารทั้งสองชนิดที่ผสมร่วมกันในตัวอย่างน้ำนมซึ่งทำให้ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ไม่เกิดผลบวกเท็จ ให้ทำการเติมสารละลายตั้งต้นของ lysozyme และ lactoferrin ซึ่งเตรียมไว้แล้วในวิธีการดำเนินงานวิจัย ข้อ (1) และ ข้อ (2) ลงไปในน้ำนมโค (เตรียมจากนมผงที่ไม่มียาปฏิชีวนะตกค้างและไม่มีสารต้านจุลชีพใดๆ โดยทำการผสมนมผง 1 ส่วนน้ำหนัก ในน้ำกลั่น 6 ส่วนปริมาตร) โดยใช้ volumetric flask ขนาด 25 mL ให้ปริมาณของ lysozyme และ lactoferrin มีความเข้มข้นในตัวอย่างน้ำนมดังต่อไปนี้

(3.1) เอ็นซัยม์ lysozyme 2.5 µg/mL + สาร lactoferrin 5.4 mg/mL
(3.2) เอ็นซัยม์ lysozyme 2.5 µg/mL + สาร lactoferrin 7.2 mg/mL
(3.3) เอ็นซัยม์ lysozyme 2.5 µg/mL + สาร lactoferrin 9.0 mg/mL
(3.4) เอ็นซัยม์ lysozyme 5.0 µg/mL + สาร lactoferrin 5.4 mg/mL
(3.5) เอ็นซัยม์ lysozyme 5.0 µg/mL + สาร lactoferrin 7.2 mg/mL
(3.6) เอ็นซัยม์ lysozyme 5.0 µg/mL + สาร lactoferrin 9.0 mg/mL

(ค่าของ lysozyme และ lactoferrin ใช้ในการทดลองนี้ เป็นค่าต่ำสุดที่ทำให้ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ให้ผลบวกเท็จ ซึ่งได้มาจากผลการทดลองจาก การดำเนินการวิจัยในข้อ 1 และข้อ 2)

ทำการแบ่งตัวอย่างน้ำนมที่ทราบปริมาณของ lysozyme และ lactoferrin ทั้ง 6 ชุด ลงในหลอดแก้วขนาด 13 x 100 mm จำนวน 8 หลอด หลอดแก้วละ 2 mL แล้วทำการอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ 83±1 ^{o}C และ 98±2 ^{o}C เป็นเวลานาน 1, 3, 5 และ 10 นาที เช่นเดียวกับในการวิธีดำเนินงานวิจัยในข้อ (1) ทำการทดสอบตัวอย่างน้ำนมที่ผสม lactoferrin ที่ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งไม่ได้ผ่านความร้อน และที่ผ่านความร้อนด้วยชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" เช่นเดียวกับการดำเนินการวิจัยในข้อ (1) แต่ใช้ชุดตรวจสอบจำนวน 5 หลอดต่อแต่ละตัวอย่างน้ำนม และทำการทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง

(4) การทดลองเรื่อง ระยะเวลาของตัวอย่างน้ำนมโคหลังคลอด (Colostrum) ที่มีผลต่อชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" และผลของความร้อนต่อตัวอย่างน้ำนมโคหลังคลอด

การทดลองเรื่อง ระยะเวลาของตัวอย่างน้ำนมโคหลังคลอด (colostrum) ที่มีผลต่อการเกิดผลบวกเท็จของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" และผลของความร้อนต่อตัวอย่างน้ำนมโคหลังคลอดซึ่งทำให้ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ไม่เกิดผลบวกเท็จ ให้ทำการแบ่งตัวอย่างน้ำนมโคหลังคลอดลงในหลอดแก้วขนาด 13 x 100 mm จำนวน 8 หลอด หลอดแก้วละ 2 mL แล้วทำการอุ่นตัวอย่างน้ำนมโคที่อุณหภูมิ 83±1 ^{o}C และ 98±2 ^{o}C เป็นเวลานาน 1, 3, 5 และ 10 นาที เช่นเดียวกับการดำเนินงานวิจัยในข้อ (1) ทำการทดสอบตัวอย่างน้ำนมโคหลังคลอดซึ่งไม่ได้ผ่านความร้อน และที่ผ่านความร้อนด้วยชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" เช่นเดียวกับการดำเนินการวิจัยในข้อ (1) แต่ใช้ชุดตรวจสอบจำนวน 5 หลอดต่อแต่ละตัวอย่างน้ำนม และทำการทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง

ผลการวิจัย (Results)

(1) ผลการทดลองหาปริมาณของเอ็นซัมย์ Lysozyme ในตัวอย่างน้ำนมโคที่มีผลต่อการเกิดผลบวกเท็จชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" และผลของความร้อนต่อเอ็นซัมย์ Lysozyme ซึ่งทำให้ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ไม่เกิดผลบวกเท็จ

ตารางที่ 1 แสดงผลของเอ็นซัยม์ lysozyme ที่มีต่อการเกิดผลบวกของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ก่อนและหลังการอุ่นตัวอย่างน้ำนมโคที่อุณหภูมิ 83±1 ^{o}C และ 98±2 ^{o}C เป็นเวลานาน 1, 3, 5 และ 10 นาที ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

ก่อนการอุ่นตัวอย่างน้ำนมโค ปริมาณของ lysozyme ที่เท่ากับหรือมากกว่า 4.75 μg/mL ในตัวอย่างน้ำนมจะทำให้ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" เกิดผลบวกได้ 100 % ส่วนความเข้มข้นของ lysozyme ที่ต่ำกว่า 4.75 μg/mL ในตัวอย่างน้ำนมที่ทดสอบคือ 2.38 μg/mL สามารถทำให้ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" แสดงผลบวกเพียง 20 % (เกิดผลบวกใน 4 หลอดทดสอบจากจำนวน 20 หลอด

ทดสอบที่ใช้ทดสอบ) และความเข้มข้นต่ำกว่านี้ที่ทดสอบคือ เท่ากับหรือน้อยกว่า 1.19 μg/mL ในตัวอย่างน้ำนมจะไม่มีผลทำให้ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" เกิดผลบวกได้

การอุ่นตัวอย่างน้ำนมโคด้วยอุณหภูมิ 83±1 °C ปรากฏว่าการอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ 83±1 °C เป็นเวลานาน 1 นาที จะสามารถทำลายปริมาณของ lysozyme ในตัวอย่างน้ำนมที่ความเข้มข้นเท่ากับ 9.5 μg/mL และต่ำกว่าได้โดยไม่สามารถทำให้ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" เกิดผลบวกได้เลย เมื่อทำการอุ่นตัวอย่างน้ำนมเป็นเวลานาน 3 นาที พบว่าจะสามารถทำลายปริมาณของ lysozyme ในตัวอย่างน้ำนมที่ความเข้มข้นเท่ากับ 47.5 μg/mL และต่ำกว่าได้โดยไม่สามารถทำให้ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" เกิดผลบวกได้เลย ส่วนตัวอย่างน้ำนมที่ความเข้มข้นของ lysozyme เท่ากับ 95.0 μg/mL หรือมากกว่านี้ พบว่าชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ยังคงให้ผลบวกได้ 100 %

เมื่อทำการอุ่นตัวอย่างน้ำนมนานขึ้นเป็น 5 นาที พบว่าตัวอย่างน้ำนมที่ความเข้มข้นของ lysozyme เท่ากับ 237.5 μg/mL หรือมากกว่านี้ ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ยังคงให้ผลบวกได้ 100 % แต่จะทำลายปริมาณของ lysozyme ในตัวอย่างน้ำนมที่มีความเข้มข้น 95.0 μg/mL ได้บางส่วน โดยชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" จะให้ผลบวกเหลือ 40 % และจะสามารถทำลาย lysozyme 47.5 μg/mL และที่ต่ำกว่าได้หมด เมื่อเพิ่มเวลาการอุ่นตัวอย่างน้ำนมเป็น 10 นาที พบว่าจะสามารถทำลายปริมาณของ lysozyme ในตัวอย่างน้ำนมที่ความเข้มข้น 950.0 μg/mL ได้เป็นบางส่วนโดยชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" จะให้ผลบวกเหลือ 50 % สำหรับตัวอย่างน้ำนมที่มีปริมาณของ lysozyme 475.0 μg/mL และต่ำกว่าพบว่าการอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่ 83±1 °C เป็นเวลานาน 10 นาที จะไม่สามารถทำให้ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" เกิดผลบวกได้เลย

การอุ่นตัวอย่างน้ำนมโคด้วยอุณหภูมิ 98±2 °C พบว่าจะสามารถทำลายปริมาณของ lysozyme ได้มากกว่าการอุ่นตัวอย่างน้ำนมด้วยอุณหภูมิ 83±1 °C จากตารางที่ 1 จะเห็นการอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ 98±2 °C เป็นเวลานาน 1, 3, 5 และ 10 นาที จะสามารถทำให้ตัวอย่างน้ำนมที่มีความเข้มข้นของ lysozyme 47.5, 237.5, 475.0 และ 4,750.0 μg/mL ตามลำดับ ไม่สามารถทำให้ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" เกิดผลบวกได้เลย

(2) การทดลองหาปริมาณของสาร Lactoferrin ในตัวอย่างน้ำนมโคที่มีผลต่อการเกิดผลบวกเท็จชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" และผลของความร้อนต่อสาร Lactoferrin ซึ่งทำให้ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ไม่เกิดผลบวกเท็จ

ตารางที่ 2 แสดงผลของ lactoferrin ที่มีต่อการเกิดผลบวกของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ก่อนและหลังการอุ่นตัวอย่างน้ำนมโคที่อุณหภูมิ 83±1 ^{o}C และ 98±2 ^{o}C เป็นเวลานาน 1, 3, 5 และ 10 นาที ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

ก่อนการอุ่นตัวอย่างน้ำนมโค ปริมาณของ lactoferrin ที่เท่ากับหรือมากกว่า 9.0 mg/mL ในตัวอย่างน้ำนมจะทำให้ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" เกิดผลบวกได้ 100 % และความเข้มข้นต่ำกว่านี้ที่ทดสอบ คือ เท่ากับหรือน้อยกว่า 7.2 mg/mL ในตัวอย่างน้ำนมจะไม่มีผลทำให้ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" เกิดผลบวกได้

การอุ่นตัวอย่างน้ำนมโคด้วยอุณหภูมิ 83±1 และ 98±2 ^{o}C ปรากฏว่าการอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ 83±1 ^{o}C หรือที่อุณหภูมิ 98±2 ^{o}C เป็นเวลานานเพียง 1 นาที ก็จะสามารถทำลายปริมาณของ lactoferrin ในตัวอย่างน้ำนมที่ความเข้มข้น 9.0, 10.8 และ 14.4 mg/mL ซึ่งให้ผลบวกในชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ก่อนการอุ่นตัวอย่างกลับเป็นให้ผลลบ 100 %

(3) การทดลองเรื่อง อิทธิพลของเอ็นซัยม์ Lysozyme ร่วมกับสาร Lactoferrin ในตัวอย่างน้ำนมโคที่มีผลต่อการเกิดผลบวกเท็จของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" และผลของความร้อนต่อสารทั้งสองชนิดที่ผสมร่วมกันในตัวอย่างน้ำนมโคซึ่งทำให้ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ไม่เกิดผลบวกเท็จ

ตารางที่ 3 แสดงผลของ lysozyme ร่วมกับ lactoferrin ต่อการให้ผลบวกของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ก่อนและหลังอุ่นตัวอย่างน้ำนมโคที่ 83±1 ^{o}C และ 98±2 ^{o}C นาน 1, 3, 5 และ 10 นาที ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

ก่อนการอุ่นตัวอย่างน้ำนมโค ปริมาณของ lysozyme 2.5 µg/mL ร่วมกับปริมาณของ lactoferrin 7.2 mg/mL ในตัวอย่างน้ำนม และที่ความเข้มข้นต่ำกว่านี้ จะไม่สามารถทำให้เกิดผลบวกต่อชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" แต่ในตัวอย่างน้ำนมที่ยังคงปริมาณของ lysozyme เท่ากับ 2.5 µg/mL ร่วมกับการเพิ่มปริมาณของ lactoferrin เป็น 9.0 mg/mL พบว่าจะทำให้ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" เกิดผลบวก 100 %

เมื่อทำการเพิ่มปริมาณของ lysozyme ในตัวอย่างน้ำนมจาก 2.5 µg/mL เป็น 5.0 µg/mL โดยมีปริมาณของ lactoferrin เป็นตัวแปร 3 ความเข้มข้นคือ 5.4, 7.2 และ 9.0 mg/mL ผลปรากฏว่าทุกตัวอย่างน้ำนมสามารถทำให้ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" เกิดผลบวก 100 %

การอุ่นตัวอย่างน้ำนมโคด้วยอุณหภูมิ 83±1 และ 98±2 °C ปรากฏว่าการอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ 83±1 °C หรือที่อุณหภูมิ 98±2 °C เป็นเวลานานเพียง 1 นาที ก็จะสามารถทำลายปริมาณของ lysozyme 2.5 µg/mL และปริมาณของ lactoferrin 9.0 mg/mL ในตัวอย่างน้ำนมซึ่งให้ผลบวกในชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ก่อนการอุ่นตัวอย่างกลับเป็นให้ผลลบ 100 %

ส่วนตัวอย่างน้ำนมที่มีปริมาณของ lysozyme เพิ่มขึ้นจาก 2.5 µg/mL เป็น 5.0 µg/mL โดยมีปริมาณของ lactoferrin เป็นตัวแปร 3 ความเข้มข้นคือ 5.4, 7.2 และ 9.0 mg/mL ผลปรากฏว่าทุกตัวอย่างน้ำนมสามารถยังคงสามารถทำให้ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" เกิดผลบวก 100 % หลังจากการอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ 83±1 °C เป็นเวลานาน 1 นาที แต่จะสามารถให้ผลลบทั้งหมดเมื่อทำการอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่ 83±1 °C เป็นเวลานาน 3 นาที หรือทำการอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่ 98±2 °C เป็นเวลานานอย่างน้อย 1 นาที

(4) การทดลองเรื่อง ระยะเวลาของตัวอย่างน้ำนมโคหลังคลอด (Colostrum) ที่มีผลต่อการเกิดผลบวกเท็จของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" และผลของความร้อนต่อตัวอย่างน้ำนมโคหลังคลอดซึ่งทำให้ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ไม่เกิดผลบวกเท็จ

ตารางที่ 4 แสดงผลการเกิดผลบวกเท็จของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" จากการตรวจตัวอย่างน้ำนมโคซึ่งเก็บในวันที่ 1 ถึงวันที่ 10 หลังคลอด จำนวน 25 ตัว และผลของความร้อนต่อตัวอย่างน้ำนมโคดังกล่าวซึ่งทำให้ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ไม่เกิดผลบวกเท็จ โดยมีรายละเอียดดังนี้

ก่อนการอุ่นตัวอย่างน้ำนมโคหลังคลอด พบว่าตัวอย่างน้ำนมจากแม่โคทุกตัวซึ่งทำการเก็บในวันที่ 1 ถึงวันที่ 3 หลังคลอด จะทำให้ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" เกิดผลบวก 100 % ทุกตัวอย่าง หลังจากนั้นตัวอย่างน้ำนมในวันที่ 4 ถึงวันที่ 9 หลังคลอดจะให้ผลบวกต่อชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ลดลงเหลือ 18 ตัวอย่าง (72 %), 15 ตัวอย่าง (60 %), 11 ตัวอย่าง (44 %), 4 ตัวอย่าง (16 %), 3 ตัวอย่าง (12 %) และ 1 ตัวอย่าง (4 %) ตามลำดับ โดยในวันสุดท้ายที่ทำการเก็บตัวอย่างคือตัวอย่างน้ำนมโควันที่ 10 หลังคลอด พบว่าชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" จะให้ผลลบ 100 %

การอุ่นตัวอย่างน้ำนมโคหลังคลอดด้วยอุณหภูมิ 83±1 และ 98±2 °C ผลปรากฏว่า หลังจากทำการอุ่นตัวอย่างน้ำนมโคในวันที่ 1 หลังคลอดด้วยอุณหภูมิ 83 ±1 °C หรือ 96 ± 2 °C เป็นเวลานาน 1, 3, 5 และ 10 นาที ตัวอย่างน้ำนมโค 22 ตัวอย่างยังคงสามารถทำให้ชุดตรวจสอบ"เคเอส-9" เกิดผลบวกได้ ซึ่งเท่ากับ 88 % โดยไม่มีความแตกต่างระหว่างการอุ่นตัวอย่างของทั้งสองอุณหภูมิที่เวลา 1, 3, 5 และ 10 นาที ตัวอย่างน้ำนมโคในวันที่ 2 หลังคลอด หลังจากการอุ่นพบว่า ยังคงสามารถทำให้ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ให้ผลบวก 20–21 ตัวอย่าง (80-84 %) โดยการอุ่นตัวอย่าง

น้ำนมที่ 98±2 °C อาจมีประสิทธิภาพในการลดเปอร์เซนต์ผลบวกของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ดีกว่าการอุ่นตัวอย่างน้ำนมโคที่อุณหภูมิ 83 ± °C เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ทั้งนี้มีจำนวนตัวอย่างน้ำนมโคหลังคลอดในวันที่ 1 และ 2 ประมาณ 50 % จะเกิดสภาพแข็งตัว (coagulation) หลังจากการอุ่นตัวอย่างน้ำนม ซึ่งผู้วิจัยจัดตัวอย่างเหล่านี้อยู่ในกลุ่มที่ทำให้ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ให้ผลการทดสอบเป็นบวก

ตัวอย่างน้ำนมโคในวันที่ 3 หลังคลอด พบว่าการอุ่นตัวอย่างน้ำนมจะสามารถลดการเกิดผลบวกของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ลงได้มาก คือ เหลือเพียง 32-36 % และ 24-36 % เมื่อทำการอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ 83 ±1 °C และ 98 ±2 °C ตามลำดับ

ตัวอย่างน้ำนมโคในวันที่ 4 และวันที่ 5 หลังคลอด พบว่าการอุ่นตัวอย่างน้ำนมจะสามารถลดการเกิดผลบวกของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ลงได้มากกว่าตัวอย่างน้ำนมโคในวันที่ 3 หลังคลอด ทั้งโดยการคำนวนจากจำนวนโคนม 25 ตัว ที่เก็บตัวอย่างหรือตัวอย่างน้ำนมโคที่ให้ผลบวกก่อนการอุ่นตัวอย่างของวันที่ 4 จำนวน 18 ตัวอย่างและวันที่ 5 จำนวน 15 ตัวอย่างก็ตาม กล่าวคือ ถ้าคำนวนเปอร์เซนต์การทำให้ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" จากจำนวน 25 ตัวอย่างตั้งต้น การอุ่นตัวอย่างน้ำนมในวันที่ 4 และ 5 หลังคลอด จะลดการเกิดผลบวกของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" เหลือเพียง 16 –20 % และ 4-16 % เมื่อทำการอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ 83±1 °C และ 98±2 °C ตามลำดับ แต่ถ้าคำนวนจากจำนวนตัวอย่างน้ำนมที่ให้ผลบวกต่อชุดตรวจสอบก่อนการอุ่นตัวอย่างน้ำนม 18 และ 15 ตัวอย่าง ของตัวอย่างน้ำนมในวันที่ 4 และวันที่ 5 ตามลำดับ หลังการอุ่นตัวอย่างน้ำนมด้วยทั้งสองอุณหภูมิที่เวลา 1, 3, 5 และ 10 นาที จะลดการเกิดผลบวกของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ลงเหลือ 22-28 % และ 6-27 % ของตัวอย่างน้ำนมในวันที่ 4 และ 5 หลังคลอด ตามลำดับ

ตัวอย่างน้ำนมโคในวันที่ 6 และ วันที่ 7 หลังคลอด พบว่าการอุ่นตัวอย่างน้ำนมจะสามารถลดการเกิดผลบวกของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ลงเหลือ 0-4 % เมื่อคำนวนจากตัวอย่างตั้งต้น 25 ตัวอย่าง แต่ถ้าคำนวนจากตัวอย่างน้ำนมโคที่ให้ผลบวกก่อนการอุ่นตัวอย่างของวันที่ 6 จำนวน 11 ตัวอย่าง และของวันที่ 7 จำนวน 4 ตัวอย่าง ก็กล่าวได้ว่า การอุ่นตัวอย่างน้ำนมด้วยทั้งสองอุณหภูมิ ที่เวลา 1, 3, 5 และ 10 นาที จะสามารถลดการเกิดผลบวกของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ลงเหลือ 0-9 % และ 0-25 % ของตัวอย่างน้ำนมในวันที่ 6 และวันที่ 7 หลังคลอดตามลำดับ

ตัวอย่างน้ำนมโคในวันที่ 8 และ 9 หลังคลอด พบว่าการอุ่นตัวอย่างน้ำนมดังกล่าวที่อุณหภูมิ 83±1 °C และ 98±2 °C เพียง 1 นาที ก็สามารถทำให้ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ให้ผลการทดสอบเป็นลบ ดังนั้น ผลการศึกษาวิจัยในส่วนนี้อาจกล่าวสรุปได้ว่า การอุ่นตัวอย่างน้ำนมโคหลังคลอดที่อุณหภูมิ 98 ±2 °C สามารถลดอัตราการเกิดผลบวกของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ได้ดี

กว่าการอุ่นตัวอย่างน้ำนมโคหลังคลอดที่อุณหภูมิ 83±1 ^{o}C เพียงเล็กน้อยเท่านั้น และการอุ่นตัวอย่างน้ำนมโคในวันที่ 1 และวันที่ 2 หลังคลอดจะมีโอกาสเกิดสภาพแข็งตัวได้สูงเมื่อได้รับความร้อน

การอภิปรายผล (Discussion)

อิทธิพลของเอ็นซัยม์ Lysozyme และสาร Latoferrin ในตัวอย่างน้ำนมโคต่อชุดตรวจสอบ "เคเอส-9"

Beukers (1993) รายงานว่าปริมาณของเอ็นซัยม์ lysozyme จะต้องสูงถึง 250–1,000 µg/mL ในตัวอย่างน้ำนมโค จึงจะสามารถทำให้ชุดตรวจสอบ Delvotest-P^{R} เกิดผลบวกได้ เมื่อเปรียบเทียบกับการวิจัยในครั้งนี้พบว่า ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" จะให้ผลบวกถ้าตัวอย่างน้ำนมมี lysozyme ในปริมาณ 2.38 –4.57 µg/mL ดังนั้น ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" จึงมีความไวรับต่อ lysozyme มากกว่าชุดตรวจสอบ Delvotest-P^{R} ค่อนข้างมาก (ตารางที่ 5) แต่มีข้อสังเกตุว่า lysozyme ที่ใช้ในการทดสอบกับชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ในการวิจัยนี้เป็น lysozyme จากไข่ขาวของไข่ไก่ซึ่งอาจมีคุณสมบัติในการยับยั้งการแบ่งตัวของแบคทีเรียแตกต่างจาก lysozyme ในน้ำนมโค ดังที่ Dobson et al. (1984) พบว่า lysozyme ที่แยกได้จากเซรุ่มของมนุษย์ จากน้ำนมโค และจากไข่ขาวของไข่ไก่นั้นมีความแตกต่างในคุณสมบัติของการต้านจุลชีพ (immunochemical) ที่แตกต่างกัน

สำหรับปริมาณของ lactoferrin ในตัวอย่างน้ำนม ซึ่งสามารถทำให้ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ให้ผลบวก คือ 9.0 mg/mL นั้นอาจกล่าวว่า lactoferrin มีอิทธิพลต่อชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" น้อยกว่าชุดตรวจสอบ Delvotest–P^{R} ดังรายงานของ Beukers (1993) ซึ่งพบว่าชุดตรวจสอบ Delvotest–P^{R} จะเกิดผลบวก ถ้าตัวอย่างน้ำนมมี lactoferrin ในปริมาณ 1.2–10.0 mg/mL

อย่างไรก็ดี ทั้งชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" และ Delvotest–P^{R} มีความไวรับต่อ lysozyme และ lactoferrin ในการเกิดผลบวกได้น้อยกว่าวิธี Microbial inhibition disk assay มาก และกล่าวได้ว่าปริมาณของ lysozyme และ lactoferrin ในน้ำนมโคปกติซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.13 µg/mL และ 0.02–0.35 mg/mL (Korhonen, 1977) ซึ่งเป็นปริมาณที่น้อยมากและไม่น่ามีอิทธิพลต่อการเกิดผลบวกของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9"

จากผลการทดลอง การเสริมฤทธิ์ซึ่งกันและกัน (synergistism) ของ lysozyme และ lactoferrin ในการยับยั้งการแบ่งตัวของแบคทีเรีย ในการศึกษาวิจัยนี้พบว่า ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" จะเกิดผลบวกในตัวอย่างน้ำนมที่มีปริมาณของ lysozyme 2.5 µg/mL และ lactoferrin 9.0 mg/mL หรือในตัวอย่างน้ำนมที่มีปริมาณ lysozyme 5.0 µg/mL และ lactoferrin 5.4 mg/mL ซึ่งแสดงว่าการ

เสริมฤทธิ์ซึ่งกันและกันของ lysozyme และ lactoferrin ตามลำพัง ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Beukers (1995) ซึ่งพบว่าปริมาณของ lysozyme 0.7 μg/mL ร่วมกับ lactoferrin 1.0 mg/mL ในตัวอย่างน้ำนมทำให้ชุดตรวจสอบ Delvotest–P^R เกิดผลบวกได้ ซึ่งปริมาณของสารทั้งสองชนิดดังกล่าวตามลำพัง ไม่สามารถทำให้ชุดตรวจสอบ Delvotest–P^R เกิดผลบวกได้

สำหรับการตรวจตัวอย่างน้ำนมโคหลังคลอดด้วยชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" พบว่า ตัวอย่างน้ำนมโคในวันที่ 1 และวันที่ 3 หลังคลอด ก่อนการอุ่นตัวอย่างสามารถทำให้ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ให้ผลบวก 100 % แล้วลดลงตามลำดับ จนกระทั่งถึงวันที่ 10 หลังคลอด จึงไม่สามารถทำให้ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" เกิดผลบวกได้ ซึ่งแสดงว่า ตังอย่างน้ำนมโคใน 3 วันแรกหลังคลอดจะมีสารต้านจุลชีพในธรรมชาติในปริมาณที่สูงมาก แล้วจึงลดลงอย่างรวดเร็วตามลำดับในวันที่ 4 ถึงวันที่ 10 หลังคลอด Sanchez et al. (1988) รายงานการศึกษาในประเทศสเปนพบว่า ตัวอย่างน้ำนมโคในวันที่ 1 หลังคลอด จะมีปริมาณของ lactoferrin 0.83 mg/mL และปริมาณ lactoferrin จะลดลงอย่างรวดเร็วภายใน 24 ชั่วโมง จากนั้นจะลดลงอย่างช้าๆจนอยู่ในระดับคงที่ 0.09 mg/mL ในสัปดาห์ที่ 3 หลังคลอด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Korhonen (1977) ในประเทศฟินแลนด์แต่พบว่าปริมาณของ lactoferrin ในตัวอย่างน้ำนมในวันแรกหลังคลอดอาจมีปริมาณสูงถึง 5 mg/mL แล้วจะลดลงอย่างรวดเร็วภายใน 24 ชั่วโมงหลังคลอด ในขณะที่ปริมาณของ lysosyme ในตัวอย่างน้ำนมในวันแรกคลอดจะมีปริมาณ 0.4 μg/mL แล้วจะเพิ่มขึ้นเป็น 0.7–0.8 μg/mL ในระหว่างวันที่ 3 ถึงวันที่ 9 หลังคลอด จากนั้นจึงค่อยๆ ลดลง จากข้อมูลปริมาณของ lysozyme และ lactoferrin ในตัวอย่างน้ำนมโคหลังคลอดซึ่งรายงายโดย Sanchez et al. (1988) และ Korhonen (1977) จะต่ำกว่าปริมาณที่น้อยที่สุดของ lysozyme (2.38–4.75 μg/mL) และ lactoferrin (9.0 mg/mL) ในตัวอย่างน้ำนมที่สามารถทำให้ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" เกิดผลบวกได้ ดังนั้นการที่ตัวอย่างน้ำนมโคหลังคลอดในการวิจัยนี้ สามารถทำให้ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9"ให้ผลบวกสูงมาก จึงอาจตั้งข้อสังเกตได้ดังต่อไปนี้

(1) ปริมาณของเอ็นซัยม์ lysozyme และสาร lactoferrin ในตัวอย่างน้ำนมจากโคนมไทย อาจมีสูงกว่าโคนมต่างประเทศ ซึ่งเป็นเรื่องน่าเสียดายที่การวิจัยนี้ ไม่สามารถทำการตรวจหาปริมาณของ lysozyme ในตัวอย่างน้ำนมโคหลังคลอด

(2) อาจมีองค์ประกอบของสารต้านจุลชีพตามธรรมชาติอื่นๆ เช่น lactoperoxidase และ xanthine oxidase (IDF, 1985) รวมทั้งสาร immunoglobulins โดยเฉพาะ IgA และ IgM ซึ่งจะมีปริมาณสูงมากในตัวอย่างน้ำนมหลังคลอด (Pearce, 1989)

(3) ปริมาณของ somatic cell count (SCC) ซึ่งคือ เซลล์เยื่อบุของ epithelial cells และเม็ดโลหิตขาวชนิดต่างๆ เช่น polymorphonuclear leukocytes, macrophages รวมทั้ง

lymphocytes ที่พบอยู่ในตัวอย่างน้ำนมจากโคนมไทยอาจสูงกว่าโคนมต่างประเทศ ทั้งนี้ มาตรฐานคุณภาพน้ำนมดิบในประเทศไทยซึ่งกำหนดโดยสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมระบุว่าปริมาณ SCC ไม่ควรเกิน $500x10^3$ cells/mL (สมอ., 2543) แต่จากการศึกษาระดับของ SCC ในตัวอย่างน้ำนมดิบ 29,577 ตัวอย่างจากฟาร์มโคนมเขตราชบุรี โดยอุษุมาและคณะ (2532) พบว่าระดับของ SCC มากกว่า $500x10^3$ cells/mL ซึ่งบ่งชี้ว่ามีอุบัติการของโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (sub-clinical mastitis) สูงถึง 42.9 % นอกจากนี้ วาสนาและคณะ (2538) ได้รายงานว่าจากการตรวจตัวอย่างน้ำนมดิบ 2,035 ตัวอย่าง ของโคนมในภาคใต้ 9 จังหวัด ด้วยวิธี California Mastitis Test (CMT) พบว่าเป็นโรคเต้านมอักเสบ 1.4 % และเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการสูงถึง 29 % ทั้งนี้ปริมาณของ SCC พบว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิดผลบวกเท็จของชุดตรวจสอบ Delvotest–P^R, *Balcillus stearothermophilus* Disk Assay (BsDA) และ Charm Farm Test^R โดย Cullor et al. (1994) ได้รายงานว่า ในตัวอย่างน้ำนมซึ่งมี SCC ต่ำกว่า $600x10^3$ cells/mL จะมีโอกาสเกิดผลบวกเท็จจากการตรวจด้วย Delvotest–P^R, BsDA และ Charm Farm Test^R เท่ากับ 17.0, 3.8 และ 70.6 % ตามลำดับ และถ้าปริมาณของ SCC มีมากกว่า $600x10^3$ cells/mL โอกาสการเกิดผลบวกเท็จจะเพิ่มเป็น 32.1, 7.1 และ 71.4 % ตามลำดับ ซึ่งปริมาณของ SCC อาจมีผลโดยตรงต่อแบคทีเรีย *Bacillus stearothermophilus* ในชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" หรืออาจมีผลโดยอ้อม เนื่องจากเชื่อว่า lactoferrin ส่วนใหญ่ในน้ำนมโคสร้างจากเม็ดโลหิตขาว polymophonuclear neutrophilic granulocytes (PMN) (Leffel and Spitznagel, 1975 ; Harmon et al., 1976) สำหรับปริมาณของ lysozyme ในตัวอย่างน้ำนม ก็พบว่ามีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณของ SCC (Senft et al., 1980)

ผลความร้อนต่อเอ็นซัยม์ lysozyme และสาร lactoferrin ในตัวอย่างน้ำนมโคในการลดผลบวกเท็จของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9"

การอุ่นตัวอย่างน้ำนมโคที่อุณหภูมิ 98±2 ^{o}C จะมีประสิทธิภาพดีกว่าที่อุณหภูมิ 83±1 ^{o}C ในการลดอัตราการเกิดผลบวกของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" จาก lysozyme ในตัวอย่างน้ำนม (ตารางที่ 1) แต่สำหรับ lactoferrin ในตัวอย่างน้ำนมพบว่า การอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ 83±1 ^{o}C หรือ 98±2 ^{o}C จะให้ผลลัพธ์เหมือนกัน คือ ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ให้ผลการตรวจสอบเป็นลบ 100% หลังจากการทำการอุ่นตัวอย่างน้ำนมเพียง 1 นาที ด้วยอุณหภูมิ 83±1 ^{o}C หรือ 98±2 ^{o}C (ตารางที่ 2) ซึ่งแสดงว่า lysozyme มีคุณสมบัติทนต่อความร้อนได้ดีกว่า lactoferrin มาก ดังนั้น ในการอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่มี lysozyme 2.5 μg/mL และ lactoferrin 9.0 mg/mL จึงใช้อุณหภูมิหรือระยะเวลาในการอุ่นตัวอย่างน้อยกว่า ตัวอย่างน้ำนมที่มี lysozyme 5.0 μg/mL และ lactoferrin 5.4–9.0 mg/mL (ตารางที่ 3)

ปริมาณของ lysozyme ที่เติมลงไปในตัวอย่างน้ำนมเพื่อการทดลองนี้คือ 0.59–4,750 μg/mL เป็นระดับที่สูงกว่าค่าปกติ 0.1–0.2 μg/mL ในน้ำนมโคมาก หรือเมื่อเทียบกับระดับของ lysozyme ที่พบในตัวอย่างน้ำนมหลังคลอดเฉลี่ย 4 วันแรก คือ 0.4 μg/mL หรือตัวอย่างน้ำนมโคจากเต้านมที่อักเสบ (mastitis) ซึ่งมีระดับของ lysozyme ค่อนข้างสูง คือ 0.5–3.0 μg/mL (Korhonen, 1977) ปริมาณของ lysozymeที่เติมลงไปในตัวอย่างน้ำนมเพื่อการทดลองนี้ก็ยังคงสูงกว่ามาก เช่นเดียวกันกับปริมาณของ lactoferrin ที่เติมลงในตัวอย่างน้ำนมเพื่อการทดลอง คือ 3.6–14.4 μg/mL ก็จะสูงกว่าระดับ lactoferrin ที่พบในตัวอย่างน้ำนมโคปกติ ตัวอย่างน้ำนมโคหลังคลอด 4 วันแรก และตัวอย่างน้ำนมโคจากเต้านมอักเสบ ซึ่งเท่ากับ 0.02–0.35, 2.0–5.0, และ 8.0 mg/mL ตามลำดับ สาเหตุที่ต้องใช้ปริมาณของ lysozyme และ lactoferrin ที่สูงเช่นนี้ในตัวอย่างน้ำนมเพื่อการทดสอบ เนื่องจาก ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" มีความไวรับต่อ lysozyme และ lactoferrin ในการให้ผลบวกค่อนข้างต่ำ โดยปริมาณที่ต่ำที่สุดของ lysozyme คือ 4.75 μg/mL และ lactoferrin คือ 9.0 mg/mL ในตัวอย่างน้ำนมจึงจะสามารถทำให้ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" เกิดผลบวกได้ กอร์ปกับการรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ ซึ่งสันนิษฐานว่า ปริมาณของสารต้านจุลชีพตามธรรมชาติ ในน้ำนมโคในประเทศไทยอาจมีสูงกว่าโคนมต่างประเทศ (เกรียงศักดิ์และธงชัย, 2541)

ดังนั้น อุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในการอุ่นตัวอย่างน้ำนม เพื่อทำลายปริมาณของ lysozyme และ lactoferrin ในระดับที่พบในธรรมชาติของน้ำนมโคตามรายงานของต่างประเทศ สามารถใช้อุณหภูมิ 83±1 ^{o}C ในระยะเวลาเพียง 1 นาที ก็จะสามารถป้องกันการเกิดผลบวกเท็จของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" จาก lysozyme และ lactoferrin ในตัวอย่างน้ำนมได้ แต่ทั้งนี้ ถ้าหากคุณภาพของน้ำนมดิบของโคนมในประเทศไทย มี lysozyme สูงกว่าของโคนมต่างประเทศ รวมทั้งสารต้านจุลชีพตามธรรมชาติอื่นๆ และปริมาณ SCC (โดยไม่ต้องคำนึงถึง lactoferrin เนื่องจากผลการทดลองนี้พบว่า lactoferrinn ถูกทำลายได้ง่ายมากโดยความร้อน) อุณหภูมิและระยะเวลาในการอุ่นตัวอย่างที่จะต้องเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเป็นอุณหภูมิที่ 83±1 ^{o}C นาน 3 นาที (ธงชัยและคณะ, 2538) หรืออุณหภูมิ 98±2 ^{o}C นาน 5 นาที (เกรียงศักดิ์และธงชัย, 2541)

ผลของความร้อนต่อตัวอย่างน้ำนมโคหลังคลอด (Colostrum) ในการลดผลบวกเท็จของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9"

ในทางทฤษฎี เกษตรกรจะรีดน้ำนมโคหลังคลอดในวันที่ 1 และวันที่ 2 ให้ลูกโคกิน และจะเริ่มรีดน้ำนมโคหลังคลอดในวันที่ 3 เนื่องจากน้ำนมเหลืองจะจางลงมาก เพื่อส่งโรงงานหรือศูนย์รับซื้อน้ำนมดิบ ซึ่งยังมีโอกาสทำให้ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ที่อุณหภูมิ 83±1 ^{o}C หรือ 98±2 ^{o}C ก็ยังอาจเกิดผลบวกได้ 24–36 % ยกเว้นน้ำนมหลังคลอดจะถูกเจือจางด้วยน้ำนมโคปกติในถังส่งนม

การอุ่นตัวอย่างน้ำนมโคหลังคลอดสามารถ ลดอัตราการเกิดของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งตัวอย่างน้ำนมโคในวันที่ 3 หรือวันที่ 9 หลังคลอด ทั้งนี้การเกิดผลบวกของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ที่ปรากฏหลังจากการอุ่นตัวอย่างน้ำนมอาจเป็นอิทธิพลจาก lysozyme ซึ่งมีคุณสมบัติทนต่อความร้อนได้ดีกว่า lactoferrin มาก กอร์ปกับสารต้านจุลชีพตามธรรมชาติอื่นๆ และปริมาณของ SCC ซึ่งควรจะมีการศึกษาต่อไป

ผลจากการศึกษานี้ ผู้วิจัยใคร่ขอเสนอะแนะว่า เกษตรกรควรทำการรีดน้ำนมโคหลังคลอดเพื่อส่งขายในวันที่ 7 หลังคลอด โดยอาศัยข้อมูลจากการวิจัยซึ่งพบว่าการอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ 98±2 ^{o}C เป็นเวลา 5 นาที จะสามารถแก้ไขปัญหาการเกิดผลบวกเท็จจากการทดสอบด้วยชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ได้ (ตารางที่ 4) อย่างไรก็ดี ผู้วิจัยมีความเชื่อว่าอาจจะเป็นเรื่องยากในทางปฏิบัติ เนื่องจากในทางปฏิบัติเกษตรกรจะรีดนมโคเพื่อส่งขายในวันที่ 3-4 หลังคลอด และการยืดระยะเวลาในการส่งขายน้ำนมโคหลังคลอดออกไปย่อมกระทบต่อรายได้ของเกษตรกร แต่ถ้าหากเกิดผลบวกเท็จจากการตรวจหายาปฏิชีวนะตกค้างในตัวอย่างน้ำนมขึ้นอาจส่งผลเสียเนื่องจากการถูกตัดราคา เว้นแต่ว่าเกษตรกรจะยอมเสี่ยงด้วยเชื่อว่าน้ำนมโคหลังคลอดจะถูกเจือจางลงเมื่อทำการผสมกับน้ำนมโคปกติในถังนมรวม ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าจะไม่สามารถถูกตรวจพบ นอกจากนี้มองในด้านความปลอดภัยต่อผู้บริโภคก็ไม่น่าจะมีผลข้างเคียงใดๆ เกิดขึ้น เนื่องจากน้ำนมโคหลังคลอดในวันที่ 3 ส่วนใหญ่ก็มีสภาพเหมือนน้ำนมโคปกติเมื่อมองดูด้วยตาเปล่า

ข้อสรุป (Conclusion)

ชุดตรวจสอบยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมโค "เคเอส-9" สามารถให้ผลบวกเท็จได้จากการตรวจตัวอย่างน้ำนมที่ไม่มียาปฏิชีวนะตกค้าง ถ้าหากตัวอย่างน้ำนมมีเอ็นซัยม์ lysozyme เท่ากับหรือมากกว่า 2.38–4.75 μg/mL หรือมีสาร lactoferrin เท่ากับหรือมากกว่า 9.0 mg/mL ทั้งนี้ปริมาณของ lysozyme และ lactoferrin ในตัวอย่างน้ำนมที่ใช้ทดสอบกับชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" มีความเข้มข้นกว่าค่าปกติที่พบได้ในน้ำนมดิบตามธรรมชาติมาก ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" มีความไวรับต่ำ หรือเท่ากับมีความต้านทานต่อสารจุลชีพตามธรรมชาติในน้ำนมโคชนิด lysozyme และ lactoferrin สูงมาก ทั้งนี้การอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ 83±1 ^{o}C นาน 1 นาที สามารถทำลายปริมาณของ lactoferrin ได้หมด แม้ว่าจะมีความเข้มข้นในตัวอย่างน้ำนมสูงถึง 14.4 mg/mL แต่พบว่า lysozyme สามารถทนต่อความร้อนได้ดีกว่า และการอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ 98±2 ^{o}C จะมีประสิทธิผลในการทำลาย lysozyme ได้ดีกว่าการอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ 83±1 ^{o}C อย่างไรก็ดี องค์ประกอบของสารต้านจุลชีพตามธรรมชาติยังมีอีกหลายชนิด ตลอดจนปริมาณของ

somatic cell count (SCC) ในน้ำนมดิบของโคนมในประเทศไทยพบว่าอยู่ในระดับที่ค่อนข้างสูงซึ่ง การวิจัยของเกรียงศักดิ์และธงชัย (2541) พบว่าตัวอย่างน้ำนมดิบจากโคนมที่ไม่ได้รับยาปฏิชีวนะ สามารถให้ผลบวกเท็จในชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ค่อนข้างสูง แต่สามารถแก้ไขโดยการอุ่นตัวอย่าง น้ำนมดิบที่อุณหภูมิ 98 $\pm$ 2 ^{o}C นาน 5 นาที ก่อนทำการทดสอบด้วยชุดตรวจสอบ "เคเอส-9"

สำหรับน้ำนมเหลืองหลังคลอด (colostrum) จากโคนมที่ไม่ได้รับยาปฏิชีวนะภายใน 21 วัน พบว่าจะให้ผลบวกเท็จต่อชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" สูงถึง 100 % จากการตรวจตัวอย่างน้ำนมดิบใน วันที่ 1 ถึงวันที่ 3 หลังคลอด จากนั้นเปอร์เซ็นต์ที่ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ให้ผลบวกเท็จจะลดลง ตามลำดับ จนเหลือ 4 และ 0 % ในวันที่ 9 และวันที่ 10 หลังคลอด ตามลำดับ ทั้งนี้การอุ่นตัวอย่าง น้ำนมหลังคลอดก่อนการทดสอบด้วยชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" สามารถลดผลบวกเท็จได้น้อยมาก ในวันที่ 1 และวันที่ 2 หลังคลอด นอกจากนี้พบว่า การอุ่นตัวอย่างน้ำนมตัวอย่างน้ำนมในวันที่ 1 และวันที่ 2 หลังคลอดมักจะเกิดสภาพแข็งตัว (coagulation) เนื่องจากความร้อน ทั้งนี้ เกษตรกรมัก จะเริ่มรีดน้ำนมหลังคลอดในวันที่ 3 เพื่อส่งขาย ซึ่งการอุ่นตัวอย่างน้ำนมก่อนการทดสอบด้วย ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" พบว่ายังสามารถเกิดผลบวกเท็จได้ 24–36 % ดังนั้นจึงยังไม่ควรส่งน้ำนม หลังคลอดในวันที่ 3 ไปจำหน่าย ทั้งนี้ การอุ่นตัวอย่างน้ำนมหลังคลอดที่อุณหภูมิ 98$\pm$2 ^{o}C จะมี ประสิทธิภาพในการลดผลบวกเท็จได้ดีกว่าการอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ 83$\pm$1 ^{o}C ไม่มากนัก โดย เปอร์เซ็นต์ของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ที่ให้ผลบวกเท็จหลังจากการอุ่นตัวอย่างน้ำนมโคในวัน ที่ 4 ถึงวันที่ 8 หลังคลอดจะลดลงอย่างรวดเร็วจาก อย่างไรก็ดี ควรทำการอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่ อุณหภูมิ 98 $\pm$ 2 ^{o}C เป็นเวลานาน 5 นาที เนื่องจากสามารถลดผลบวกเท็จเหลือ 0 % ในตัวอย่าง น้ำนมหลังคลอดในวันที่ 7 ทั้งนี้การแนะนำให้เกษตรเริ่มทำการรีดน้ำนมโคหลังคลอดเพื่อส่งขาย ในวันที่ 7 คงจะเป็นไปได้ยากในทางปฏิบัติเพราะจะมีผลกระทบต่อรายได้ของเกษตรกร นอกจากนี้ การผสมน้ำนมโคหลังคลอดในวันที่ 3 รวมกับน้ำนมโคปกติจะเจือจางน้ำนมหลังคลอดลงไปมากจน อาจไม่มีผลต่อการเกิดผลบวกเท็จของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9"

ข้อเสนอแนะ (Sugestion for Further Work)

มาตรฐานคุณภาพของน้ำนมดิบในประเทศไทยมักถูกกำหนดโดยอาศัยตัวเลขมาตรฐานจาก ต่างประเทศซึ่งอาจจะไม่สามารถเป็นไปได้ในทางปฏิบัติ เนื่องจากสภาพที่แตกต่างกันของสายพันธุ์ โคนม อาหาร และการเลี้ยง ยกตัวอย่างเช่น ธาตุน้ำนมไม่รวมมันเนย (solid not fat) ของโคนมไทย ซึ่งเป็นโคนมลูกผสมโดยเฉลี่ยจะเท่ากับ 8.25 % ต่ำกว่าของโคนมพันธุ์แท้ในต่างประเทศซึ่งมักจะ มากกว่า 8.5 % เป็นต้น มุมมองที่เห็นความแตกต่างของคุณภาพน้ำนมดิบในประเทศไทยกับใน

ต่างประเทศ ส่วนหนึ่งเป็นผลมาจากการศึกษาวิจัยในเรื่องนี้ด้วยซึ่งพบว่าชุดตรวจสอบยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมโค "เคเอส-9" มีความไวรับต่ำกว่าเอ็นซัยม์ lysozyme และ สาร lactoferrin ที่เติมลงไปในตัวอย่างน้ำนม แต่ในทางปฏิบัติพบว่าชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ให้ผลบวกเท็จสูงมากในการทดสอบตัวอย่างน้ำนมดิบจากโคนมซึ่งไม่ได้รับยาปฏิชีวนะ ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าตัวอย่างน้ำนมดิบในประเทศไทยน่าจะมีสารต้านจุลชีพตามธรรมชาติในปริมาณที่ค่อนข้างสูง ตลอดจนอาจมีปัจจัยอื่นๆ ในตัวอย่างน้ำนมดิบอีก เช่น ปริมาณของ Somatic cell count (SCC) ซึ่งสูงกว่าปกติค่อนข้างมากเนื่องจากมีอุบัติการของโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (sub-clinical mastitis) ค่อนข้างสูง ดังนั้น จึงน่าจะมีการศึกษาหาปริมาณของสารต้านจุลชีพตามธรรมชาติในน้ำนมโคดิบในประเทศไทยซึ่งข้อมูลพื้นฐานดังกล่าวนี้สามารถใช้ประโยชน์ในการประเมินสถานภาพและสุขภาพของโคนมไทย และเป็นข้อมูลเพื่อการวางแผนพัฒนาการจัดสุขภาพของโคนมต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 ผลของ Lysozyme ต่อการให้ผลบวกของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" (คิดเป็นเปอร์เซนต์ที่ให้ผลบวก) ก่อนและหลังการอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ 83 ± 1 °C และ 98 ± 2 °C ในระยะเวลาต่างๆ *

อุณหภูมิ	เวลา	Lysozyme (µg/mL)										
(°C)	(นาที)	4,750	950	475	237.5	95	47.5	9.5	4.75	2.38	1.19	0.59
83 ± 1	0	100	100	100	100	100	100	100	100	20	0	0
	1	100	100	100	100	100	100	0	0	0	0	0
	3	100	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
	5	100	100	100	100	40	0	0	0	0	0	0
	10	100	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0
98 ± 2	0	100	100	100	100	100	100	100	100	20	0	0
	1	100	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
	3	100	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	100	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* เปอร์เซ็นต์ที่ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ให้ผลบวก คำนวนจากการทดสอบด้วยชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" จำนวน 20 หลอดทดสอบ ต่อตัวอย่าง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 ผลของ Lactoferrin ต่อการให้ผลบวกของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" (คิดเป็นเปอร์เซนต์ที่ให้ผลบวก) ก่อนและหลังอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ 83 ± 1 °C และ 93 ± 2 °C ในระยะเวลาต่างๆ *

อุณหภูมิ	เวลา	Lactoferrin (mg/mL)				
(°C)	(นาที)	14.4	10.8	9	7.2	3.6
83 ± 1	0	100	100	100	0	0
	1	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0
98 ± 2	0	100	100	100	0	0
	1	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0

* เปอร์เซ็นต์ที่ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9"ให้ผลบวก คำนวนจากการทดสอบด้วชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" จำนวน 20 หลอด ทดสอบต่อตัวอย่าง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 ผลของ Lysozyme ร่วมกับ Lactoferrin ต่อการให้ผลบวกของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" (คิดเป็นเปอร์เซนต์ที่ให้ผลบวก) ก่อนและหลัง การอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ $83 \pm 1^{\circ}C$ และ $98 \pm 2^{\circ}C$ ในระยะเวลาต่างๆ *

Lysozyme (µg/mL) + Lactoferrin (mg/mL)	Non-Heat	Heat $83 \pm 1^{\circ}C$				Heat $98 \pm 2^{\circ}C$			
		1 นาที	3 นาที	5 นาที	10 นาที	1 นาที	3 นาที	5 นาที	10 นาที
LZ 2.5 + LF 5.4	0	-	-	-	-	-	-	-	-
LZ2.5 + LF 7.2	0	-	-	-	-	-	-	-	-
LZ 2.5 + LF 9.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
LZ 5.0 + LF 5.4	100	100	0	0	0	0	0	0	0
LZ 5.0 + LF 7.2	100	100	0	0	0	0	0	0	0
LZ 5.0 + LF 9.0	100	100	0	0	0	0	0	0	0

* LZ = Lysozyme, LF = Lactoferrin

เปอร์เซ็นต์ที่ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ให้ผลบวก คำนวนจากการทดสอบด้วยชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" จำนวน 10 หลอดทดสอบ ต่อตัวอย่าง

\- = ไม่ได้ทดสอบ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 การเกิดผลบวกเท็จจากการตรวจตัวอย่างน้ำนมโคหลังคลอดวันที่ 1-10 ของโคนม จำนวน 25 ตัว ด้วยชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" และอิทธิพลของความร้อนต่อตัวอย่างน้ำนมโคหลังคลอด ซึ่งมีผลต่อชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" *

Post-Partum	Non-Heat	Heat 83 ± 1 °C				Heat 98 ± 2 °C			
		1 นาที	3 นาที	5 นาที	10 นาที	1 นาที	3 นาที	5 นาที	10 นาที
Day 1	25 (100%)	22 (88%)	22 (88%)	22 (88%)	22 (88%)	22 (88%)	22 (88%)	22 (88%)	22 (88%)
Day 2	25 (100%)	21 (84%)	21 (84%)	21 (84%)	20 (80%)	21 (84%)	20 (80%)	20 (80%)	20 (80%)
Day 3	25 (100%)	9 (36%)	9 (36%)	9 (36%)	8 (32%)	9 (36%)	9 (36%)	8 (32%)	6 (24%)
Day 4	18 (72%)	5 (20%)	5 (20%)	4 (16%)	4 (16%)	5 (20%)	4 (16%)	4 (16%)	4 (16%)
Day 5	15 (60%)	4 (16%)	3 (12%)	3 (12%)	3 (12%)	4 (16%)	4 (16%)	1 (4%)	1 (4%)
Day 6	11 (44%)	1 (4%)	1 (4%)	1 (4%)	1 (4%)	1 (4%)	1 (4%)	1 (4%)	0
Day 7	4 (16%)	1 (4%)	1 (4%)	1 (4%)	0 (4%)	1 (4%)	1 (4%)	0	0
Day 8	3 (12%)	0	0	0	0	0	0	0	0
Day 9	1 (4%)	0	0	0	0	0	0	0	0
Day 10	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* โคนมทั้ง 25 ตัวไม่ได้รับยาปฏิชีวนะหรือยาซัลฟาใดๆในระหว่าง 21 วัน ก่อนการเก็บตัวอย่าง และในระหว่างการเก็บตัวอย่าง เปอร์เซนต์ที่ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ให้ผลบวกคำนวนจากค่าเฉลี่ยโคนมทั้ง 25 ตัว ซึ่งตัวอย่างน้ำนมโคจะทำการทดสอบด้วยชุดตวจสอบ "เคเอส-9" จำนวน 10 หลอดทดสอบต่อตัวอย่าง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบปริมาณของเอ็นซัยม์ lysozyme (μg/mL) และสาร lactoferrin (mg/mL) ในการทำให้ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9", Delvotest-P^{R} และวิธีการ Microbial Inhibition Disk Assay (MIDA) เกิดผลบวกเท็จ

	KS-9	**Delvotest-P^{R}**	**MIDA**
Lysozyme (μg/mL)	2.38 – 4.75	250- 1,000	0.04 – 0.10
Lactoferrin (mg/mL)	9.0	1.2 – 10.0	0.04 – 0.10
LZ (μg/mL) + LF (mg/mL)*	2.5 + 9.0 หรือ 5.0 + 5.4	0.7 + 1.0	-

* เอ็นซัยม์ Lysozyme (LZ) และสาร Lactoferrin (LF) ผสมรวมกันในตัวอย่างน้ำนม

\- = ไม่มีรายงานการศึกษาวิจัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I19801610

ส่วนอ้างอิง (References)

เกรียงศักดิ์ สายธนู และธงชัย เฉลิมชัยกิจ. 2541. เคเอส-9 ชุดตรวจสอบยาปฏิชีวนะในน้ำนมโคชนิดใหม่. การประชุมวิชาการ เรื่องโคนมและผลิตภัณฑ์ ครั้งที่ 2 ณ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 3-5 มิถุนายน 2541: 53-63.

ธงชัย เฉลิมชัยกิจ ศุกชัย เนื้อนวลสุวรรณ และเกรียงศักดิ์ สายธนู. 2537. การเพิ่มประสิทธิภาพความน่าเชื่อถือในการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะในน้ำนมโคโดยวิธีการใช้ชุดตรวจสอบ Delvolest-P^{R}. ประมวลเรื่องประชุมวิชาการสัตวแพทยสมาคม ครั้งที่ 21, 28-30 พฤศจิกายน 2537: 1-6.

วาสนา แสงสุวรรณ์ ศุภลักษณ์ จันทร์อุดม อภัสรา วรราช และนิมิตร ไตรวนาธรรม. 2538. สภาวะโรคเต้านมอักเสบในโคนมภาคใต้. วารสารสัตวแพทย์ มข. 5(1): 1-10.

สมอ. 2543. ร่างมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม: คำแนะนำหลักการปฏิบัติสำหรับการจัดการฟาร์มโคนม. สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (กรกฎาคม 2543).

อุษมา กู้เกียรตินันท์ อรรถยา เกียรติสุนทร และสุดประเสริฐ บุญปาลิต. 2532. การศึกษาเซลโซมาติกในน้ำนมรวมมที่สหกรณ์โคนมหนองโพ. สัตวแพทยสาร. 40(1-2): 29-35.

Allison, J.R.D. 1985. Antibiotic residues in milk. Brit. Vet. J. 141: 9-16.

Amonsin, A., Saitanu, K., and Teeverapongya, S. 1996. Antibiotic residues in raw milk in Thailand. Anstralasian J. Anim. Sci. 9: 27-30.

Beukers, R. 1993. Some Special Aspects of Delvotest®. In : Inhibitory substances in milk–current analytical procedure. Bull. Int. Dairy Fed. N° 283/1993 : 20-23.

Carlsson , A. and Bjorck, A.J. 1987. The effect of some indigenous antibacterial factors in milk on the growth of *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. Milchwis-senschaft. 42: 282. Cited by: Carlsson *et al.* 1989. J. Dairy Sci. 72(12): 3166-3175.

Carlsson, A., Bjorck, A.J, and Persson, K. 1989. Lactoferrin and Lysozymes in Milk During Acute Mastitis and Their Inhibitors Effect in Delvotest-P. J. Dairy Sci. 72(12): 3166-3175.

Coleman, W.W. 1986. Antibiotic in my milk. Dairy and Food Sanitation. 5(2): 48-50.

Cullor, J.S., Eenennaan, A.V., Dellinger, J. , Perani, L., Smith, W., and Jensen. Z.. 1992. Antibiotic residue assays : Can they be used to test milk from individual cows ? Vet. Med. 87(12): 477-497.

Cullor, J.S., var Enennaam, A., Gardener, I., Perani, L., Dellinger, J., Smith, W.L., Thompson, T., Payne, M.A., Jensen, L., and Gutterbock, W.M. 1994. Performance of Various Tests Used to Screen Antibiotic Residues in Milk Samples from Individual Animals. J. of AOAC International. 77(4) : 862-869.

Dobson, D.E., Prager, E.M., and Wilson, A.C. 1984. Stomach lysozymes of ruminants. I. Distribution and catalytic properties. J. Biol. Chem. 259:11607. Cited by: Carlsson et al. 1989.

Elliot, J.I., Senft, B., Erhardt, G., and Fraser, D. 1984. Isolation of lactoferrin and its concentration in sows' colostrum and milk during a 21-day lactation. J. Anim Sci. 59(4): 1080-1084.

Gustafson, R.H. 1991. Symposium: Antibiotic residues in meat and milk-Use of antibiotics in livestock and human health concerns. Journal of Dairy Science. 74 (4): 1428-1432.

Halbert, L.W., Erskine, R.J., Bartlett, P.C., and Johnson II, G.L. 1996. Incidence of false positive results for assays used to detect antibiotics in milk. J. Food Prot. 59(8): 886-888.

Harmon, R.J., Schanbacher, F.L., Ferguson, L.C., and Smith, K.L. 1975. Concentration of lactoferrin in milk of normal lactating cows and changes occurring during mastitis. Am. J. Vet. Res. 36(7): 1001-1007.

Harmon, R.J., Schanbacher, F.L., Ferguson, L.C., and Smith, K.L. 1976. Changes in lactoferrin, immunoglobulin G, bovine serum albumin and alfa-lactalbumin during acute experimental and natural coliform mastilis in cows. Infect. Immun. 13:533. Cited by: Carlsson *et al.* 1989. J. Dairy Sci. 72(12): 3166-3175.

Huber, W.G. 1986. Allergenicity of antibacterial drug residues. In : Drug residues in animals. Academic Press Inc. P.33-50.

IDF. 1987. Milk and milk product : Detection of inhibitors. Bull. Int. Dairy Fed. N° 220/1993 : 78 pages.

Korhonen, H. 1977. Antimicrobial factors in bovine colostrum. J. Agri. Soc. Finl. 49: 434-447. Cited by: Beukers, R. 1993. Some Special Aspects of Delvotest®. In : Inhibitory substances in milk–current analytical procedure. Bull. Int. Dairy Fed. N° 283/1993 : 20-23.

Leffel, M.S. and Spitznagel, J.K. 1975. Fate of human lactoferrin and nyeloperoxidase in phagocytizing human nuetrophils : effects of immunoglobulin G subclasses and immune complexes coated on latex beads. Infect. Immun. 12:813. Cited by: Carlsson *et al.* 1989. J. Dairy Sci. 72(12): 3166-3175.

Mol, H. 1975. Antibiotics and milk. A. Balkema, Rotterdam: P. 44-54.

Oliver, S.P., Lewis, T.M., Lewis, M.J., Dowlen, H.H., and Maki, J.L.. 1990. Persistence of antibiotics in bovine mammary secretions following intramammary infusion and cessation of milking. Preventive Vet. Med. 9: 301-311.

Pearce, R.J. 1989. Thermal Denuturation of Whey Protein. Bulletin of IDF N$^{O.}$ 238/1989 :17-23.

Persson, K., Carlsson, A., Hambleton, C., and Guidry, A.J. 1992. Immunoglobulins, lysosome and lactoferin in the teat and udder of the dry cow during endotoxin-induced inflamation. Zentralbl Veterinarmed (B). 39(3): 165-174.

Rainard, P. 1987. Bacteriostatic activity of bovine lactoferrin in mastitic milk. Vet. Microbiology. 13(2): 159-166.

Sanchez, L., Aranda, P., Perez, M.D., and Calvo, M. 1988. Concentration of lactoferrin and transferrin throughout lactation in cow's colostrum and milk. Biol. Chem. Hoppe. Seyler. 369(9): 1005-1008.

Senft, B., Meyer, F., and Erhardt, G. 1980. Undersuchunger uber Zusammenhange zwischer Lactoferrin, Lysozyme, B-Lactoglobulintyper und Sekretionsstorunger des Euters. Berl. Munch. Teirarzl. Wochenschr. 93:27. Cited by: Carlsson *et al.* 1989. J. Dairy Sci. 72(12): 3166-3175.

Thomas, A.S. and Fell, L.R. 1985. Effect of ATCH and oxytocin treatment on lactoferrin and citrate in cows' milk. J. Dairy Res. 52(3): 379-389.

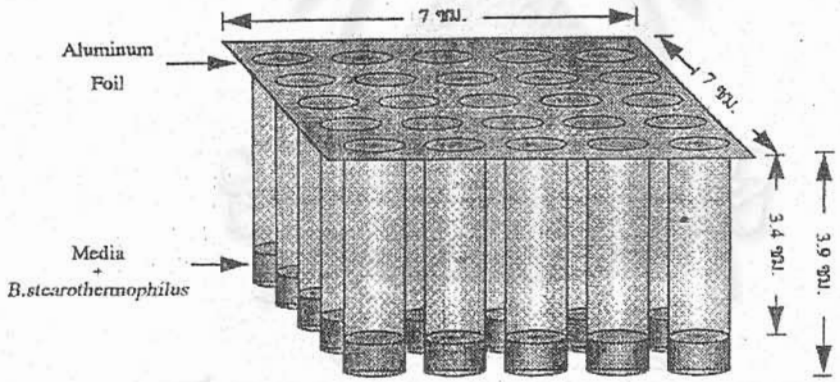
Weaver, G.L. and Kroger, M. 1978. Lysozyme activity of high-leucocyte-count milk and the effect of heat and potassium dichromate on lysozyme activity. J. Dairy Science. 61(8): 1089-1092.

ชุดตรวจสอบยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมโค "เคเอส-9"

(Antibiotic Residue Screening Test Kit in Dairy Milk "KS-9")

ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" เป็นชุดตรวจสอบเบื้องต้น (screening test kit) ในการตรวจหายาปฏิชีวนะและยาซัลฟาตกค้างในตัวอย่างน้ำนมโค ได้รับพัฒนาขึ้นโดย รศ. น.สพ. ดร. เกรียงศักดิ์ สายธนู และ รศ. น.สพ. ดร. ธงชัย เฉลิมชัยกิจ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ด้วยความสนับสนุนงบประมาณการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ส่วนประกอบของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ประกอบด้วยสปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม และสาร Bromocresol purple บรรจุอยู่ในหลอดพลาสติค (โพลี่โพรไพลีน) ขนาด 10 x 39 มิลลิเมตร ปริมาณหลอดละ 0.3 มิลลิลิตร และปิดฝาหลอดด้วยแผ่นอะลูมินั่มฟอยล์ (ภาพที่ ๑)



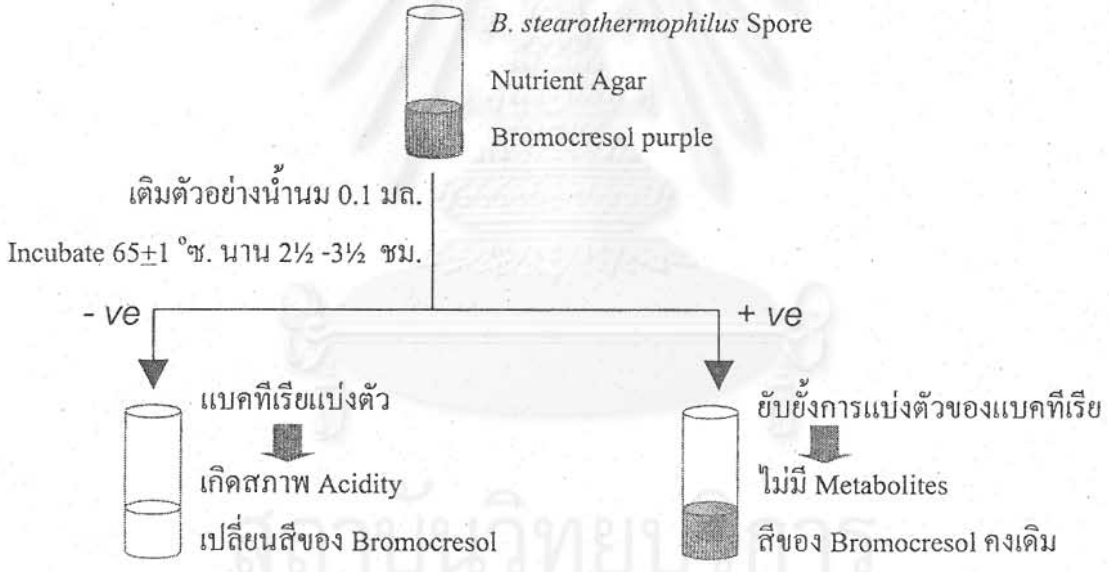
ภาพที่ ๑ หลอดพลาสติค(5 x 5 แถว) สำหรับเตรียมชุดตรวจสอบหายาปฏิชีวนะและยาซัลฟาตกค้างในน้ำนมโค "เคเอส-9" ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 มิลลิเมตร สูง 39 มิลลิเมตร

ผลจากการพัฒนาชุดตรวจสอบหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมโค "เคเอส-9" และสามารถทำการผลิตในเชิงพาณิชย์ตั้งแต่เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2541 (ซึ่งกำลังดำเนินการจดสิทธิบัตรในนามของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ) ทำให้เกษตรกรและศูนย์รับน้ำนมดิบ ตลอดจนโรงงานผลิตน้ำนมพร้อมดื่มและนักวิชาการที่เกี่ยวข้องสามารถมีโอกาสเลือกใช้ชุดตรวจสอบยาตกค้างในน้ำนมโคที่มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับชุดตรวจสอบที่สั่งซื้อหรือนำเข้า

จากต่างประเทศ (ตารางที่ ๑) แต่มีค่าใช้จ่ายที่ต่ำกว่า ("เคเอส-9" ราคา 25 บาทต่อการทดสอบ 1 ตัวอย่าง ในขณะที่ชุดตรวจสอบที่นำเข้าจากต่างประเทศราคา 60-80 บาท ต่อตัวอย่าง)

หลักการของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9"

หลักการของชุดตรวจสอบยาปฏิชีวนะ "เคเอส-9" คือ หลังจากหยอดตัวอย่างน้ำนม 0.1 มิลลิลิตรลงในชุดตรวจสอบและทำการอบเพาะที่อุณหภูมิ 65±1 °C นาน 2½ - 3½ ชั่วโมง แล้ว ถ้าตัวอย่างน้ำนมที่ทำการตรวจไม่มียาปฏิชีวนะหรือยาซัลฟาตกค้าง แบคทีเรีย *B. stearothermophilus* ก็จะสามารถแบ่งตัวเป็นผลให้มีการใช้สารอาหาร Agar medium ที่อยู่ในหลอดทดสอบ ทำให้มีสภาพกรดเกิดขึ้นซึ่งจะไปเปลี่ยนสีของสาร Bromocresol purple จากสีม่วงเป็นสีเหลือง แต่ถ้าในน้ำนมมียาตกค้างอยู่ ยาก็จะไปยับยั้งการแบ่งตัวของแบคทีเรีย ทำให้ไม่เกิดขบวนการการใช้สารอาหารในหลอดทดสอบ ดังนั้นสาร Bromocresol purple ก็ยังคงมีสีม่วงตามเดิม (ภาพที่ ๒)



ภาพที่ ๒ แผนภูมิแสดงหลักการของชุดตรวจสอบยายาปฏิชีวนะและยาซัลฟาตกค้างในน้ำนมโค "เคเอส-9"

วิธีการใช้ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9"

การใช้ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" สามารถปฏิบัติการได้โดยง่าย ดังนี้คือ

(1) ใช้กรรไกรตัดหลอดชุดตรวจสอบมาตามจำนวนที่ต้องการ แล้วเขียนหมายเลขตัวอย่างที่ข้างหลอดชุดตรวจสอบ

(2) จากนั้น ใช้ไซริงค์ดูดตัวอย่างน้ำนมที่จะตรวจสอบขึ้นมา 0.1 มิลลิลิตร แล้วแทงฝาปิดหลอดชุดตรวจสอบให้ทะลุ แล้วหยอดตัวอย่างน้ำนมลงในชุดตรวจสอบ

(3) ทุกครั้งที่ทำการตรวจสอบหายาตกค้างจะต้องมี "หลอดควบคุม" หรือ "หลอด Negative Control" โดยใช้น้ำนมที่ปราศจากสารต้านจุลชีพซึ่งอยู่ในกล่องของชุดตรวจสอบหยอดลงไปในหลอดของชุดตรวจสอบที่ทำเครื่องหมาย "-ve control" เสมอ

(4) ใช้เทปใสปิดฝาหลอดชุดตรวจสอบเพื่อป้องกันน้ำนมและความชื้นในหลอดระเหยออก แล้วนำไปอบเพาะที่อุณหภูมิ 65±1 ^{o}C

(5) หลังอบเพาะชุดตรวจสอบนาน 2 ชั่วโมง 30 นาที ทำการสังเกตุสีของหลอด –ve Control ซึ่งถ้าเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้งหมด ให้ทำการอ่านผลการตรวจของหลอดที่เหลือทั้งหมดได้ แต่ถ้าหลอด –ve Control ยังไม่เปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้งหมด ให้ทำการอบต่อและสังเกตทุก 10 นาที

(6) วิธีการอ่านผล คือ

ถ้าสีของชุดตรวจสอบเปลี่ยนเป็น**สีเหลือง** แสดงว่า ตัวอย่างน้ำนมไม่มียาปฏิชีวนะหรือยาซัลฟา หรือถ้ามีก็จะต่ำกว่าความเข้มข้นที่ชุดตรวจสอบสามารถตรวจพบ แต่ถ้าสีของชุดตรวจสอบยังคงเป็น**สีม่วง** แสดงว่า ตัวอย่างน้ำนมมียาปฏิชีวนะหรือยาซัลฟาตกค้าง สำหรับหลอดทดสอบที่ยังคงมีสีม่วงครึ่งบนและสีเหลืองครึ่งล่าง แสดงว่ามียาปฏิชีวนะปริมาณใกล้เคียงกับค่าต่ำสุดที่ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" สามารถตรวจพบ

ความน่าเชื่อถือของชุดตรวจสอบยาปฏิชีวนะตกค้าง "เคเอส-9"

(Validity Test of Antibiotic Screening Test Kit "KS-9")

ค่าความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) และความแม่นยำ (accuracy) ของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" จะต่ำมากเมื่อตรวจสอบตัวอย่างน้ำนมดิบที่ไม่ได้อุ่นตัวอย่างก่อนตรวจ แต่เมื่อตรวจตัวอย่างน้ำนมดิบหลังอุ่นที่อุณหภูมิ 98±2 ^{o}C นาน 5 นาที ค่าความไว ความจำเพาะ และความแม่นยำจะเพิ่มขึ้น โดยมีค่าดังกล่าวระหว่าง 94-100 % (ตารางที่ ๒) ดังนั้นการตรวจหายาปฏิชีวนะตกค้างในตัวอย่างน้ำนมดิบควรทำการอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ 98±2 ^{o}C เพื่อทำลายสารต้านจุลชีพในธรรมชาติ (natural inhibitors) ก่อนนำไปตรวจด้วยชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" สำหรับน้ำนมที่ผ่านความร้อนแล้ว เช่น น้ำนมพาสเจอร์ไรส์ หรือ น้ำนมยูเอชที ไม่มีความจำเป็นต้องอุ่นตัวอย่างก่อนทำการตรวจสอบ

ประสิทธิภาพของ "เคเอส-9" ในการตรวจหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมที่ผ่านความร้อน

(Detection Limits of "KS-9" on Detecting Antibiotic Residues in Heated-Milk Samples)

การใช้ชุดตรวจสอบยาปฏิชีวนะตกค้าง "เคเอส-9" ในการตรวจตัวอย่างน้ำนมที่เติมยาปฏิชีวนะดังต่อไปนี้ คือ ยาในกลุ่ม β-lactams (ampicillin, cephapirin, cephalothin, cloxacillin และ penicillin) ซึ่งมีความเข้มข้นของยา 0.002-0.024 µg/mL (ppm) ยาในกลุ่ม tetracylines (chlortetracycline, oxytetracycline และ tetracycline) ซึ่งมีความเข้มข้น 0.025-0.5 ppm ยาในกลุ่ม aminoglycosides (gentamicin, kanamycin และ streptomycin) ซึ่งมีความเข้มข้น 0.05-4.0 ppm ยาในกลุ่ม sulfonamides (sulfadiazine, sulfamethazine และ sulfathiazole) ซึ่งมีความเข้มข้น 0.1-3.0 ppm และยา erythromycin และ framycitin ซึ่งมีความเข้มข้น 0.025-0.8 ppm ส่วนยา novobiocin และ norfloxacin มีความเข้มข้น 0.15-3.0 ppm โดยทำการตรวจสอบตัวอย่างน้ำนมที่เติมยาปฏิชีวนะดังกล่าวก่อนการอุ่นตัวอย่างน้ำนม และหลังจากการอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ 83±1 ^{o}Cนาน 3 นาที และที่อุณหภูมิ 98±2 ^{o}C นาน 5 นาที ผลปรากฏว่าชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" สามารถให้ผลการตรวจหายาปฏิชีวนะในตัวอย่างน้ำนมก่อนและหลังการผ่านความร้อนได้ทุกชนิด โดยไม่มีความแตกต่างกัน ยกเว้นยา ampicillin, cephalothin, cloxacillin และ framycitin ซึ่งชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ให้ผลบวก 100 % ก่อนการอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่ความเข้มข้น 8, 8, 8 และ 100 ppb ตามลำดับ แต่หลังการอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ 83±1 ^{o}C นาน 3 นาที ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" จะสามารถให้ผลบวก 0, 90, 50 และ 10 % ตามลำดับ และเมื่ออุ่นตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ 98±2 ^{o}C นาน 5 นาที ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" จะให้ผลบวก 0, 0, 30 และ 20 % ตามลำดับ ความร้อนดังกล่าวจะไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ในการตรวจหายาปฏิชีวนะทั้ง 4 ชนิดดังกล่าว ถ้าปริมาณการตกค้างของยาทั้ง 4 ชนิดเท่ากับหรือมากกว่า 24, 20, 16 และ 200 ng/mL (ppb) ตามลำดับ นั่นคือ ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" จะสามารถให้ผลบวก 100 % ทั้งก่อนและหลังการอุ่นตัวอย่างน้ำนม

การควบคุมคุณภาพในการผลิตชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" และอายุในการเก็บรักษา (Shelf-life)

นับตั้งแต่ มิถุนายน พ.ศ. 2541 ซึ่งได้มีการผลิตชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ในเชิงพาณิชย์ สหกรณ์โคนม ศูนย์รับน้ำนมดิบ และโรงงานแปรรูปน้ำนม รวมทั้งนักวิชาการสั่งซื้อชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" เพื่อทำการตรวจหายาปฏิชีวนะและยาซัลฟาตกค้างในน้ำนมโดยเฉลี่ยประมาณเดือนละ 1,000 ชุดตรวจสอบ และจำนวนผู้ใช้ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ก็เพิ่มขึ้นตามลำดับ จนในปัจจุบันนี้จำนวนการสั่งซื้อชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" เฉลี่ยเดือนละ 2,500 ชุดตรวจสอบ ปัจจัยที่ทำให้มีผู้นิยมใช้ชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" เพิ่มขึ้นเนื่องมาจาก ราคาของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ถูกกว่าชุดตรวจ

สอบจากต่างประเทศ และได้รับการยอมรับในประสิทธิภาพว่าไม่ด้อยกว่าชุดตรวจสอบจากต่างประเทศ ทั้งนี้ ผู้วิจัยซึ่งปัจจุบันรับผิดชอบในการผลิตชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ได้ตระหนักถึงการควบคุมคุณภาพของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" โดยมีการทดสอบระยะเวลาในการอ่านผลการทดสอบทุกๆ ชุดของการผลิตก่อนจำหน่าย และทำการเก็บบางส่วนของชุดตรวจสอบจากทุกชุดการผลิตไว้เพื่อการทดสอบคุณภาพเป็นระยะเวลาอย่างน้อยเป็นเวลา 6 เดือนของอายุในการเก็บรักษา (Shelf-life) ของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" ทั้งนี้ อายุในการเก็บรักษา (Shelf-life) ของชุดตรวจสอบอาจนานกว่า 6 เดือน แต่จะต้องใช้ระยะเวลาในการอบเพาะชุดตรวจสอบเพื่ออ่านผลนานกว่าปกติ เนื่องจากจำนวนของแบคทีเรียอาจลดน้อยลงไป ทำให้ขบวนการในการสร้างกรดที่จะไปเปลี่ยนสีของ Bromocresol purple ช้าลง

ข้อมูลจาก :

เกรียงศักดิ์ สายธนู และธงชัย เฉลิมชัยกิจ. "เคเอส-9 ชุดตรวจสอบยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมโคชนิดใหม่." ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการโคนมและผลิตภัณฑ์ ครั้งที่ 2. วันที่ 3-5 มิถุนายน 2541. คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. หน้า 53-63.

เกรียงศักดิ์ สายธนู และธงชัย เฉลิมชัยกิจ. "การประเมินประสิทธิภาพของเคเอส-9 เมื่อใช้ตรวจหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมที่ผ่านความร้อน." ประมวลเรื่อง การประชุมวิชาการโคนมและผลิตภัณฑ์ ครั้งที่ 2. วันที่ 3-5 มิถุนายน 2541. คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. หน้า 65-75.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ๑ ปริมาณยาปฏิชีวนะและยาซัลฟาที่น้อยที่สุด (μg/mL; Detection Limits) ในตัวอย่างน้ำนมโคที่ชุดตรวจสอบ "เค เอส-9" , Delvotest-P[R] และ ADM[R] สามารถให้ผลบวก *

ยาปฏิชีวนะและซัลฟา	ชุดตรวจสอบ เค เอส-9	Delvotest-P	ADM
แอมพิซิลลิน	0.004-0.008	0.002-0.004	0.002-0.005
แอมม็อกซิซิลลิน	0.004-0.010	0.002-0.004	ไม่มีข้อมูล
คล็อกซาซิลลิน	0.004-0.008	0.025-0.030	0.015-0.035
เพ็นนิซิลลิน	0.001-0.003	0.001-0.003	0.002-0.004
เซฟฟาพัยริน	0.002-0.004	<0.004-0.004	0.008
สเตร็ปโตมัยซิน	0.2-0.5	4-6	4-13
เจ็นตามัยซิน	0.05-0.2	0.5-0.6	0.15
กานามัยซิน	0.1-2	9-20	9-28
อีริโทรมัยซิน	0.05-0.1	0.5-0.7	1-2.25
อ็อกซิเตตระซัยคลิน	0.025-0.1	0.3-0.8	0.15-0.5
คลอเตตระซัยคลิน	0.02-0.3	0.3-1.0	0.2-0.45
เตตระซัยคลิน	0.05-0.3	0.4-1.0	0.1-4.0
โนโวไบโอซิน	0.15-0.5	0.5-2.0	ไม่มีข้อมูล
บาซิทราซิน	0.002-0.02	ไม่มีข้อมูล	0.06-0.14
ซัลฟาทัยอาโซล	<0.1-1.0	50-100	ไม่มีข้อมูล
ซัลฟาเม็ททราซิน	0.1-1	50-100	0.5-1
ซัลฟาไดอาซีน	0.1-3	50-100	ไม่มีข้อมูล

* Delvotest-P[R] เป็นชุดตรวจสอบหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมโค ผลิตโดยบริษัท DSM. ประเทศเนเธอร์แลนด์

ADM[R] เป็นชุดตรวจสอบหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมโค ผลิตโดยบริษัท Copan Italia ประเทศอิตาลี

Detection limits (μg/mL) ที่แสดงได้มาจากใบกำกับสินค้าของบริษัทผู้ผลิต โดยตัวเลขที่แสดงค่าที่ต่ำกว่าตัวเลขด้านซ้ายจะให้ผลลบ 100 % และค่าที่สูงกว่าตัวเลขด้านขวาจะให้ผลบวก 100 %

ตารางที่ ๒ แสดงเปอร์เซ็นต์ค่าความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) และความแม่นยำ (Accuracy) ของชุดตรวจสอบ "เคเอส-9" เมื่อใช้ตรวจสอบตัวอย่างน้ำนมโคที่ไม่เคยได้รับยา และที่กำลังได้รับยาจากฟาร์ม 2 แห่ง และจากโคของเกษตรกรทั่วไปที่กำลังได้รับการรักษาโรคเต้านมอักเสบ

ที่มาของน้ำนม	การเตรียมตัวอย่าง	ความไว	ความจำเพาะ	ความแม่นยำ
ฟาร์ม ก	ไม่อุ่นตัวอย่าง	100	32	41
	83±1 °C นาน 3 นาที	100	60	65
	98±2 °C นาน 5 นาที	95	100	99
ฟาร์ม ข	ไม่อุ่นตัวอย่าง	100	34	41
	83±1 °C นาน 3 นาที	100	78	80
	98±2 °C นาน 5 นาที	94	100	99
ฟาร์ม ก+ฟาร์ม ข + ฟาร์มทั่วไป	ไม่อุ่นตัวอย่าง	100	33	43
	83±1 °C นาน 3 นาที	100	80	82
	98±2 °C นาน 5 นาที	96	100	99

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย