



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาชุดตรวจสอบยาต้านจุลชีพตกค้าง
ในน้ำนมและเนื้อสัตว์

(Development of Antimicrobial Residue Screening
Test Kit in Milk and Meat)

โดย

ธงชัย เจริญชัยกิจ และคณะ

กุมภาพันธ์ 2546

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการพัฒนาชุดตรวจสอบยาต้านจุลชีพ ตกค้างในน้ำนมและเนื้อสัตว์

(Development of Antimicrobial Residue Screening
Test Kit in Milk and Meat)

คณะผู้วิจัย	สังกัด
(1) ธงชัย เจริญชัยกิจ	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
(2) เกียรติศักดิ์ พูนสุข	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
(3) มณฑล เลิศวรปรีชา	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
(4) เกียรติศักดิ์ แดงพรหม	กองสัตวแพทย์สาธารณสุข กรมปศุสัตว์
(5) กิตติกร โชติสกุลรัตน์	บริษัท แกรนด์สยาม จำกัด

ชุดโครงการ การพัฒนาอุตสาหกรรมเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์

สนับสนุนโดย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) เป็นอย่างยิ่งที่เห็นความสำคัญของการพัฒนาชุดตรวจสอบยาต้านจุลชีพตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากสัตว์ซึ่งไม่เฉพาะเพียงการสนับสนุนงบประมาณในการดำเนินงานวิจัยเท่านั้น แต่ยังช่วยแก้ไขปัญหาและอุปสรรคที่เกิดขึ้นโดยไม่คาดคิดของผู้วิจัยในระหว่างการศึกษาตลอดมา โดยเฉพาะอย่างยิ่ง รองศาสตราจารย์ ดร. พีรเดช ทองอำไพ (รองผู้อำนวยการสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย) และรองศาสตราจารย์ ดร. ชัยณรงค์ คันทพนิต (ผู้ประสานงานชุดโครงการพัฒนาอุตสาหกรรม เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ สกว.)

ผู้วิจัยขอขอบคุณคุณอาจารย์สมจิตร กันทาพรหม และนักศึกษาสถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตกาฬสินธุ์ ที่ช่วยดำเนินการทดลองในสุกรและไก่ทดลองเพื่อหาค่าความน่าเชื่อถือของชุดตรวจสอบ ตลอดจนนายวิรัช ปลั่งไหม ที่กรุณาจัดทำแท่นให้ความร้อน (Heater block) สำหรับใช้ในภาคสนาม และนายส่งศักดิ์ ศรีสง่า น.ส. นภาพร สีโย น.ส. ทิพย์จักร อัมพุนันท์ และนายวิโรจน์ ตรียุปต์ที่ช่วยงานในห้องปฏิบัติการและในการเตรียมชุดตรวจสอบ รวมทั้งนิสิตชั้นปีที่ 6 คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ช่วยงานเก็บตัวอย่างเนื้อไก่และสุกรจากตลาดและทดสอบชุดตรวจสอบ และ สพ.ญ. บังอร จินะณรงค์ บริษัท Gampian Foods Siam จำกัด น.สพ. วิษณุ วรรณแสง บริษัท สหฟาร์ม จำกัด และสหกรณ์โคนมต่างๆ ที่นำชุดตรวจสอบไปทดลองใช้

คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าผลงานวิจัยโครงการนี้จะสามารถเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาทางด้านความปลอดภัยของอาหารในด้านการเฝ้าระวังยาต้านจุลชีพตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากสัตว์ เพื่อให้คำขวัญที่ว่า “อาหารปลอดภัยจากฟาร์มสู่ผู้บริโภค” (Food-Safety: From the Farm to the Table) เป็นจริงในอนาคตอันใกล้

Executive Summary

“การพัฒนาชุดตรวจสอบยาต้านจุลชีพตกค้างในนํ้านม”

วัตถุประสงค์ของโครงการ “การพัฒนาชุดตรวจสอบยาต้านจุลชีพตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากสัตว์” เพื่อให้ได้ชุดตรวจสอบเบื้องต้น (Screening test kit) สำหรับการตรวจหายาต้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างนํ้านมโคและตัวอย่างเนื้อไก่และเนื้อสุกร โดยมีวิธีการใช้ที่สะดวกและรวดเร็ว สามารถทำการทดสอบในภาคสนามได้ รวมทั้งมีประสิทธิภาพทัดเทียมกับชุดตรวจสอบของต่างประเทศแต่มีค่าใช้จ่ายที่ต่ำกว่า ตลอดจนสามารถทำการผลิตชุดตรวจสอบได้ในเชิงพาณิชย์และมีผู้ดำเนินการด้านการตลาดและการบริการเพื่ออำนวยความสะดวกให้แก่หน่วยงานหรือองค์กรที่ใช้ชุดตรวจสอบซึ่งจะส่งผลให้เกิดการเสริมสร้างประสิทธิภาพของระบบเฝ้าระวังยาต้านจุลชีพตกค้างในประเทศไทย

วิธีดำเนินการวิจัยโดย (1) ทำการเตรียมชุดตรวจสอบยาต้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างนํ้านมเนื้อไก่และเนื้อสุกรโดยใช้หลักการของ Tube diffusion method ซึ่งใช้เชื้อแบคทีเรีย *Geobacillus stearothermophilus* เป็นตัวทดสอบ (2) ทำการพัฒนาวิธีการสกัดยาต้านจุลชีพตกค้างจากตัวอย่างเนื้อไก่และเนื้อสุกร (3) ทำการทดสอบความน่าเชื่อถือ (Validity) ของชุดตรวจสอบ (4) ทำการทดสอบการใช้ชุดตรวจสอบทั้งในห้องปฏิบัติการขององค์กรที่เกี่ยวข้อง และจากตัวอย่างเนื้อไก่และเนื้อสุกรที่จำหน่ายแก่ผู้บริโภค (5) ทำการผลิตในเชิงพาณิชย์

ผลจากการวิจัยสามารถพัฒนาชุดตรวจสอบเบื้องต้นในการตรวจหายาต้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างนํ้านม ตัวอย่างเนื้อไก่และสุกร ตลอดจนในตัวอย่างชีร์มของไก่ และตัวอย่างปัสสาวะของสุกร โดยมีวิธีการที่ง่ายและไม่ต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาแพงแต่มีประสิทธิภาพ (Detection limits) และความน่าเชื่อถือ (Validity) สูงในการตรวจหายาต้านจุลชีพตกค้างโดยทำการหยอดตัวอย่างนํ้านมหรือวางแผ่นกระดาษกรองซึ่งชุ่มด้วยตัวอย่างนํ้าเนื้อสัตว์ หรือตัวอย่างชีร์มหรือปัสสาวะลงในหลอดชุดตรวจสอบ และสามารถอ่านผลการตรวจหลังจากการเพาะชุดตรวจสอบที่อุณหภูมิ 65 ± 1 องศาเซลเซียส นาน $2\frac{1}{2}$ – $3\frac{1}{2}$ ชั่วโมง ดังนั้น ชุดตรวจสอบเบื้องต้นในการตรวจหายาต้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างนํ้านม (ซึ่งตั้งชื่อว่า “AM-Test” หรือ “Antimicrobial Test”) และชุดตรวจสอบในตัวอย่างเนื้อสัตว์ ชีร์มและปัสสาวะ (ซึ่งตั้งชื่อว่า “CM-Test” หรือ “Clean Meat Test”) จะสามารถเสริมสร้างระบบการเฝ้าระวังยาต้านจุลชีพตกค้างในอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากสัตว์ในประเทศไทยให้มีประสิทธิภาพและเป็นรูปธรรมที่สามารถปฏิบัติอย่างกว้างขวางทั้งในห้องปฏิบัติการและในภาคสนาม

บทคัดย่อ

ได้ทำการพัฒนาชุดตรวจสอบเบื้องต้นสำหรับการตรวจหาสารต้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่าง นํ้านมโคและนํ้าเนื้อที่คั้นจากตัวอย่างเนื้อเยื่อไก่และเนื้อเยื่อสุกรโดยใช้หลักการการยับยั้งการแบ่งตัวของแบคทีเรีย *จีโอแบซิลลัส สเตียโรเทอร์โมฟิลัส* ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม หลังจากการเพาะที่อุณหภูมิ 65 ± 1 องศาเซลเซียส สามารถอ่านผลการทดสอบโดยดูการเปลี่ยนแปลงของสีบรอมคลีซอล เพอเฟิลได้ภายในเวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมงสำหรับตัวอย่างนํ้านมโค และประมาณ $2\frac{1}{2}$ - $3\frac{1}{2}$ ชั่วโมงสำหรับตัวอย่างเนื้อไก่และเนื้อสุกร โดยมีประสิทธิภาพในการตรวจสอบหายากลุ่มเบต้าแลคแทมในระดับ 0.005-0.02 พีพีเอ็ม ยากลุ่มเตตราไซคลิน ซัลโฟนามาย สเตร็ปโตมัยซิน เจนด้ามัยซิน และอีริโทรมัยซินในระดับ 0.15-2 พีพีเอ็ม ส่วนยาคลอแรมเฟนิคอล เอ็นโรฟล็อกซาซิน นอร์ฟล็อกซาซิน และยากลุ่มไนโตรฟูแรนส์ ในระดับ 5-12 พีพีเอ็ม

วิธีการตรวจหาสารต้านจุลชีพตกค้างในไก่และสุกรด้วยชุดตรวจสอบที่ได้พัฒนาขึ้นนี้จะใช้กระดาษกรองซึ่งชุ่มด้วยนํ้าเนื้อที่คั้นจากตัวอย่างเนื้อเยื่อของไก่และสุกรใส่ลงในหลอดทดสอบซึ่งเป็นการค้นพบใหม่โดยพบว่ามีประสิทธิภาพดีมากและสามารถแก้ไขปัญหายากในการที่ต้องสกัดยาต้านจุลชีพโดยวิธีการเดิม โดยมีความน่าเชื่อถือของชุดตรวจสอบในการตรวจหาสารต้านจุลชีพในตัวอย่างซีรัม เนื้อและตับ ไก่พบว่ามีค่าความไวรับ (Sensitivity) เท่ากับ 93, 87, 99 % ตามลำดับ ส่วนค่าความจำเพาะ (Specificity) พบว่าสูงถึง 100 % จากทั้ง 3 ชนิดตัวอย่างที่ตรวจ สำหรับค่าความไวรับในการตรวจหาสารต้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างซีรัมและปัสสาวะสุกรพบสูงถึง 100 % ส่วนค่าความจำเพาะเท่ากับ 93.3 และ 100 % ตามลำดับ ทั้งนี้ การทดสอบเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบกับวิธีการที่ใช้ในปัจจุบัน คือ วิธี European Four Plate Test (EFPT) และวิธี Microbial Inhibition Disk Assay (MIDA) พบว่าชุดตรวจสอบสามารถตรวจพบการตกค้างของยาต้านจุลชีพในตัวอย่างเนื้อไก่ได้ 12.3 % ในขณะที่วิธี EFPT และ MIDA สามารถตรวจพบการตกค้างของยาต้านจุลชีพในตัวอย่างเนื้อไก่เดียวกันได้ 0 % และ 1.7 % ตามลำดับ เช่นเดียวกับการตรวจหาการตกค้างของยาต้านจุลชีพในตัวอย่างเนื้อสุกรชุดตรวจสอบสามารถตรวจพบการตกค้างของยาต้านจุลชีพในตัวอย่างเนื้อสุกรได้ 9.3 % ในขณะที่วิธีการ EFPT และ MIDA สามารถตรวจพบการตกค้างของยาต้านจุลชีพในตัวอย่างเนื้อสุกรเดียวกันได้ 2 % และ 2.7 % ตามลำดับ

ชุดตรวจสอบที่ได้พัฒนาขึ้นใหม่สามารถทำการผลิตในเชิงพาณิชย์เพื่อให้ใช้ในการเฝ้าระวังยาต้านจุลชีพตกค้างได้อย่างมีประสิทธิภาพและสะดวกทั้งในห้องปฏิบัติการและในภาคสนามทั้งการตรวจหาสารต้านจุลชีพตกค้างในนํ้านมโค รวมทั้งในไก่และสุกรทั้งในขณะมีชีวิตหรือจากตัวอย่างเนื้อเยื่อของไก่และสุกร

Abstract

The screening test kit for detecting antimicrobial residues in milk and meat juice of chicken meat and pork has been developed and the results can be read after incubating 2-3 hours for milk sample and 2½-3½ hours for meat sample. The principle of test kit is based on inhibition of *Geobacillus stearothermophilus* in tube contained appropriated media and bromocresol purple. The detection limits of Beta-lactams are 0.005-0.02 PPM; Tetracycline group, Sulfonamides, Streptomycin, Gentamicin, and Erythromycin are 0.15-2 PPM; Chloramphenicol, Enrofloxacin, Norfloxacin, and Nitrofurans are 5-12 PPM.

The procedure of detecting antimicrobial residues in chicken or swine is performed by placing paper disk, which soaked with meat juice onto the media of test kit. This new procedure is simply and very effective. The validity study of test kit performed on serum, meat, and liver samples of chicken were found sensitivity of 93, 87, and 99 %, respectively; and specificity of 100 %. The validity study of test kit performed on serum and urine samples of swine were found sensitivity of 100 %; and specificity of 93.3 and 100 %, respectively. The detection limits of test kit were better than methods of European Four-Plate Test (EFPT) and Microbial Inhibition Disk Assay (MIDA). Since, the ability of test kit for detecting antimicrobial residues in chicken meat samples purchased from markets was found 12.3 %; while EFPT and MIDA were found 0 and 1.7 %, respectively. As well as, the study on pork samples purchased from markets which found antimicrobial residues 9.3 % by using the test kit; while EFPT and MIDA were found 2 and 2.7 %, respectively.

The new developed antimicrobial residues screening test kit has shown the ability to produce for commercial available products and it was simply to be used both in laboratory and fields (e.g. farms and slaughter houses). Beside, the new developed of screening test kit can be used for antimicrobial residues screening test in other samples, e.g. serum and urine samples of lived-animals; and in animal feeds.

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
Executive Summary	ii
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	iii
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	iv
สารบัญ	v
สารบัญตาราง	vii
สารบัญรูป	ix
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	x
บทนำ	1
วิธีดำเนินการวิจัย	
- การพัฒนาชุดตรวจสอบยาต้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างน้ำมัน เนื้อไก่และสุกร	7
- การพัฒนาวิธีการตรวจสอบสารต้านจุลชีพในตัวอย่างเนื้อ	7
- ยาต้านจุลชีพที่ใช้ทดสอบหา Detection limits ของชุดตรวจสอบ	7
- การทดสอบหาสารซึ่งใช้ทดแทนสารสกัดจากเนื้อปลอดสารต้านจุลชีพเพื่อใช้เป็นตัวอย่างควบคุม (Negative control) สำหรับชุดตรวจสอบ “CM-Test”	9
- การทดสอบความน่าเชื่อถือของชุดตรวจสอบ (Validity test) ของชุดตรวจสอบ “CM-Test”	9
- การทดสอบใช้ชุดตรวจสอบ “CM-Test” ในการตรวจหายาต้านจุลชีพตกค้างในเนื้อไก่และเนื้อสุกรที่จำหน่ายในตลาดสดและซูเปอร์มาร์เก็ตในเขตกรุงเทพมหานคร	11
- การทดสอบใช้ชุดตรวจสอบ “AM-Test” และชุดตรวจสอบ “CM-Test” ในการตรวจหายาต้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างน้ำมัน ตัวอย่างเนื้อไก่และเนื้อสุกรในฟาร์มปศุสัตว์	12
- การทดสอบใช้ชุดตรวจสอบ “AM-Test” ในการตรวจหายาต้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างน้ำมันโดยสหกรณ์โคนม	13
- การพัฒนาอุปกรณ์แทนให้ความร้อน (Heater block)	13

ผลการวิจัยและวิจารณ์

- การพัฒนาชุดตรวจสอบยาต้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างน้ำมัน “AM-Test” และชุดตรวจสอบยาต้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างเนื้อไก่และสุกร “CM-Test”	14
- วิธีการตรวจสอบยาต้านจุลชีพในตัวอย่างอย่างน้ำมัน ตัวอย่างซีรัม ตัวอย่างเนื้อ และตัวอย่างปัสสาวะ	16
- การอ่านผลการทดสอบหายาต้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างน้ำมัน ตัวอย่างซีรัม ตัวอย่างเนื้อ และตัวอย่างปัสสาวะ	18
- การพัฒนาวิธีการสกัดตัวอย่างเนื้อเพื่อตรวจสอบหายาต้านจุลชีพ	19
- การนำหลักการ Disk Diffusion มาใช้ร่วมกับหลักการ Tube Diffusion	20
- การทดสอบหาสารซึ่งใช้ทดแทนน้ำมันปลอดสารต้านจุลชีพ และสารสกัดจากเนื้อปลอดสารต้านจุลชีพเพื่อใช้เป็นตัวอย่างควบคุม (Negative control)	20
- Detection limits ของชุดตรวจสอบ “AM-Test” และ “CM-Test”	21
- การทดสอบความน่าเชื่อถือของชุดตรวจสอบ (Validity test) ของชุดตรวจสอบ “CM-Test”	22
- การทดสอบใช้ชุดตรวจสอบ “CM-Test” ในการตรวจหายาต้านจุลชีพตกค้างในเนื้อไก่และเนื้อสุกรที่จำหน่ายในตลาดสดและซูเปอร์มาร์เก็ตในเขตกรุงเทพมหานคร	24
- การทดสอบใช้ชุดตรวจสอบ “AM-Test” และชุดตรวจสอบ “CM-Test” ในการตรวจหายาต้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างน้ำมัน ตัวอย่างเนื้อไก่และเนื้อสุกรในฟาร์มปศุสัตว์	25
- การทดสอบใช้ชุดตรวจสอบ “AM-Test” ในการตรวจหายาต้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างน้ำมันโดยสหกรณ์โคนม	26
- การพัฒนาอุปกรณ์แทนให้ความร้อน (Heater block)	26
- ศิลปวิทยาที่เกี่ยวข้องกับชุดตรวจสอบ “AM-Test” และชุดตรวจสอบ “CM-Test”	27
สรุป	28
เอกสารอ้างอิง	45
ภาคผนวก	
- บทความสำหรับการเผยแพร่	47
- กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์	48
- ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้และกิจกรรมที่ดำเนินการมา และผลที่ได้รับตลอดโครงการ	49

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
ตารางที่ 1 ปริมาณมูลค่ายาต้านจุลชีพที่ใช้ในมนุษย์และในสัตว์ ปี พ.ศ. 2533-2541	1
ตารางที่ 2 ความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพ (PPM) ซึ่งเติมลงในตัวอย่างน้ำนม เนื้อไก่และเนื้อสุกรเพื่อทดสอบหา Detection limits ของชุดตรวจสอบ “AM-Test” และ “CM-Test”	8
ตารางที่ 3 ความสามารถของชุดตรวจสอบ “AM-Test” ในการตรวจสอบหายาด้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างน้ำนมโค	29
ตารางที่ 4 ความสามารถของชุดตรวจสอบ “CM-Test” ในการตรวจสอบหายาด้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างน้ำเนื้อไก่	30
ตารางที่ 5 ความสามารถของชุดตรวจสอบ “CM-Test” ในการตรวจสอบหายาด้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างน้ำเนื้อสุกร	31
ตารางที่ 6 ผลการตรวจหายาด้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างชีร์ม และเนื้อเยื่อของไก่ที่ได้รับยาด้านจุลชีพผสมในน้ำ 1 วัน (ในขนาดเพื่อการป้องกันโรค) โดยใช้ชุดตรวจสอบ “CM-Test”	32
ตารางที่ 7 ผลการตรวจหายาด้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างชีร์ม ปัสสาวะและเนื้อเยื่อของสุกรที่ได้รับยาด้านจุลชีพผสมในอาหาร 1 วัน (ในขนาดเพื่อการป้องกันโรค) โดยใช้ชุดตรวจสอบ “CM-Test”	33
ตารางที่ 8 ผลการตรวจหายาด้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างชีร์ม และเนื้อเยื่อของไก่โดยใช้ชุดตรวจสอบ “CM-Test” เก็บตัวอย่างหลังจากไก่ได้รับยาด้านจุลชีพผสมในน้ำในขนาดเพื่อการป้องกันโรค 1 วัน	34
ตารางที่ 9 ผลการตรวจหายาด้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างชีร์ม และปัสสาวะของสุกรโดยใช้ชุดตรวจสอบ “CM-Test” เก็บตัวอย่างหลังจากสุกรได้รับยาด้านจุลชีพผสมในอาหารในขนาดเพื่อการป้องกันโรค 1 วัน	34
ตารางที่ 10 ความน่าเชื่อถือของชุดตรวจสอบ “CM-Test” ในการตรวจหายาด้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างจากไก่และสุกร	35
ตารางที่ 11 ผลการตรวจตัวอย่างเนื้อไก่ซึ่งได้รับยาด้านจุลชีพที่ทดสอบด้วยชุดตรวจสอบ “CM-Test” เปรียบเทียบกับการทดสอบด้วยวิธี European Four Plate Test (EFPT)	35
ตารางที่ 12 ผลการทดสอบตัวอย่างหัวอาหารสัตว์ (Premixes) ด้วยชุดตรวจสอบ “CM-Test” ในการตรวจหาการปนเปื้อนของยากันบิด	36

ตารางที่ 13	ผลการทดสอบความสามารถ (Detection limits) ของชุดตรวจสอบ “CM-Test” ในการตรวจหาการปนเปื้อนของยากันบิด	36
ตารางที่ 14	เปรียบเทียบลักษณะชุดตรวจสอบยาด้านจุลชีพตกค้าง “KS-9” “KS-9S” “AM-Test” และ “CM-Test”	37

สารบัญรูป

รูป		หน้า
รูปที่ 1	แสดงลักษณะของหลอดชุดตรวจสอบ “AM-Test” และ “CM-Test”	38
รูปที่ 2	วิธีการใช้ชุดตรวจสอบ “AM-Test” ในการตรวจสอบหากรด่างจุลชีพตกค้างในตัวอย่างน้ำนม	39
รูปที่ 3	วิธีการใช้ชุดตรวจสอบ “CM-Test” ในการตรวจสอบหากรด่างจุลชีพตกค้างในตัวอย่างเนื้อไก่และเนื้อสุกร	40
รูปที่ 4	หลักการของชุดตรวจสอบเบื้องต้น “AM-Test” และ “CM-Test”	41
รูปที่ 5	การใช้เครื่องตีปั่นตัวอย่างชิ้นเนื้อ Homogenizer (A) และ Stomacher (B) ในการสกัดยาด่างจุลชีพจากตัวอย่างเนื้อ	42
รูปที่ 6	การใช้เครื่องบดกระเทียมในการคั้นน้ำจากตัวอย่างเนื้อ	42
รูปที่ 7	เปอร์เซ็นต์การตรวจพบยาด่างจุลชีพตกค้างในตัวอย่างเนื้อไก่ (300 ตัวอย่าง) และเนื้อสุกร (300 ตัวอย่าง) จากตลาดสดและซูเปอร์มาร์เก็ตในเขตกรุงเทพมหานครระหว่างเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2544 - กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2545 โดยใช้ชุดตรวจ CM-Test เปรียบเทียบกับวิธี EFPT และ MIDA	43
รูปที่ 8	แท่นให้ความร้อน (Heater block) ที่จัดทำขึ้น	44

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (List of abbreviations)

ชม.	ชั่วโมง
พีพีเอ็ม	ส่วนต่อล้านส่วน (mg/kg)
มล.	มิลลิลิตร
<i>B. stearothermophilus</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
CFU/ml.	Colony Forming Units per milliliter
EFPT	European Four Plate Test
<i>G. stearothermophilus</i>	<i>Geococcus stearothermophilus</i>
MIDA	Microbial inhibition disk assay
MRL	Maximal residue limit
PPM	part per million
%	percentage
g/L	Gram per liter
µg/ml	Microgram per milliliter
°C	Degree Celsius

บทนำ

การเลี้ยงสัตว์ในประเทศไทยได้พัฒนาจากการเลี้ยงเพื่อการยังชีพมาเป็นการเลี้ยงแบบอุตสาหกรรมซึ่งเน้นการเพิ่มผลผลิตให้ได้สูงสุดในพื้นที่การเลี้ยงที่จำกัด (Intensive Farm System) ดังนั้นการเกิดโรคระบาดในฟาร์มจึงมีโอกาสดังขึ้นได้ง่ายหากไม่มีมาตรการและการควบคุมอย่างใกล้ชิด ทั้งนี้ การป้องกันโรคในอุตสาหกรรมการปศุสัตว์สามารถใช้วัคซีนได้ แต่โรคติดเชื้ออีกหลายชนิดก็ไม่มีวัคซีน เช่น การติดเชื้อ *Escherichia coli* ในสุกร ไก่ และโค จากเหตุผลเหล่านี้เป็นสาเหตุให้ผู้ประกอบการรวมทั้งสัตวแพทย์ส่วนใหญ่ยังใช้แนวทางการป้องกันโรคด้วยการให้ยาต้านจุลชีพแก่สัตว์ในฟาร์ม ข้อมูลการใช้ยาต้านจุลชีพในประเทศไทยซึ่งเป็นรายงานจากกระทรวงสาธารณสุขพบว่าปริมาณมูลค่าของยาต้านจุลชีพที่ใช้ในสัตว์น้อยกว่าที่ใช้ในมนุษย์มาก (ตารางที่ 1) ซึ่งมูลค่าของยาต้านจุลชีพที่ใช้ในสัตว์น่าจะต่ำกว่าความเป็นจริงมาก เนื่องจากข้อมูลของสมาคมผู้ค้าเวชภัณฑ์และเคมีภัณฑ์สำหรับสัตว์แห่งประเทศไทย (2542) รายงานว่าการใช้ยาต้านจุลชีพในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่และสุกรในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2541 มีมูลค่า 984 และ 762 ล้านบาท ทั้งนี้ยังไม่รวมมูลค่ายาที่ใช้ในสัตว์น้ำและสัตว์เลี้ยง ตลอดจนมูลค่าของยาที่จำหน่ายโดยไม่มีทะเบียนและที่นำเข้ามาในรูปของเคมีภัณฑ์ซึ่งไม่ได้ผ่านสำนักงานอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข

ตารางที่ 1 ปริมาณมูลค่ายาต้านจุลชีพที่ใช้ในมนุษย์และในสัตว์ ปี พ.ศ. 2533-2541 (หน่วย:ล้านบาท)*

พ.ศ.	สำหรับมนุษย์ (ล้านบาท)			สำหรับสัตว์ (ล้านบาท)			รวมทั้งหมด (ล้านบาท)
	ผลิต	นำเข้า	รวม	ผลิต	นำเข้า	รวม	
2533	1,870.94	434.68	2,305.62	176.25	376.29	552.54	2,858.16
2534	2,157.24	549.56	2,706.80	192.13	421.79	613.92	3,320.72
2535	2,191.89	623.50	2,815.39	266.90	470.07	736.97	3,552.36
2536	2,390.76	647.86	3,038.62	187.03	436.80	623.83	3,662.45
2537	2,869.18	825.67	3,694.85	177.08	509.85	686.93	4,381.78
2538	4,112.67	1,548.90	5,661.57	249.45	490.00	739.45	6,401.02
2539	4,701.02	1,606.20	6,307.22	247.10	412.75	656.85	6,967.07
2540	4,833.09	1,979.88	6,813.97	293.49	536.39	829.88	7,642.85
2541	4,225.80	1,259.84	5,485.64	248.65	560.57	809.22	6,294.86

* ข้อมูลจากกระทรวงสาธารณสุข (พ.ศ. 2544)

ความพยายามควบคุมและกำกับการใช้ยาต้านจุลชีพที่ใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ในประเทศไทยได้มีมานานแล้วโดยผ่านพระราชบัญญัติยา พ.ศ. 2510 เป็นกฎหมายหลักในการกำกับดูแลยาสำหรับมนุษย์และสำหรับสัตว์ซึ่งกำหนดไว้ว่ายาต้านจุลชีพเป็นยาอันตราย รวมทั้งประกาศกระทรวงตามกฎหมายที่เกี่ยวข้อง 2 ฉบับ (ศศิ เจริญพจน์, 2544) ดังนี้

1. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 24 พ.ศ. 2538 กำหนดให้ยาต้านจุลชีพ 12 ชนิด คือ Avilamycin, Avoparcin, Bambermycin, Efrotomycin, Enramycin, Lasalocid sodium, Monensin sodium, Nitrovin, Thiopeptin, Tylosin, Virginiamycin และ Zinc bacitracin ที่อยู่ใน สภาวะสารผสมล่วงหน้า (Premix) กับสื่อสำหรับผสมอาหารสัตว์ได้รับการยกเว้นจากการเป็นยา ทั้งนี้ต้องไม่แสดงสรรพคุณว่าเป็นยา และต้องไม่นำมาผสมรวมกัน

2. ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ตาม พ.ร.บ. ควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2525 มาตรา 6 เรื่องกำหนดชื่อ ประเภท ชนิดหรือลักษณะของวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ที่ใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตอาหารสัตว์เพื่อการจำหน่าย ตลอดจนอัตราส่วนหรือปริมาณที่ใช้ หรือห้ามใช้ วัตถุนั้นเกินกำหนด

วัตถุประสงค์ในการควบคุมและกำกับการใช้ยาต้านจุลชีพที่ใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ เนื่องจาก ความตระหนักถึงปัญหาต้านจุลชีพตกค้างในน้ำนม เนื้อสัตว์และอาหารที่ได้จากสัตว์ อาจก่อให้เกิดผลข้างเคียงต่อสุขภาพ (Adversed-health effects) ได้ดังต่อไปนี้

1. คนบางกลุ่มอาจมีอาการแพ้ยา (Allergic reactions) เช่น เชื่อว่าประชากร 1-10% แพ้ ยาเพนนิซิลิน และปริมาณของเพนนิซิลินเพียง 1-10 units (0.6-6 µg/g) ก็สามารถก่อให้เกิดอาการ แพ้ (Wilson, 1994) โดยอาการที่พบบ่อยคือ อาการผื่นคันซึ่งอาจเป็นเฉพาะที่หรือทั่วร่างกาย มีน้อย รายที่จะมีอาการบวมหน้า ต่อม้ำเหลืองโต และปวดศีรษะ ยาต้านจุลชีพอื่นๆ ที่มีรายงานว่าอาจก่อให้เกิดอาการแพ้เทียบเคียงเท่ากับเพนนิซิลิน ได้แก่ สเตربتโตมัยซิน ซัลโฟนาไมด์ และยาปฏิชีวนะ ในกลุ่มอะมิโนไกลัยโคไซด์ สำหรับที่มีรายงานพบอาการแพ้น้อยกว่าได้แก่ โนโวไบโอวิน และ เตตราซัยคลิน

2. การได้รับยาต้านจุลชีพในระดับต่ำที่ตกค้างอยู่ในอาหารที่ได้จากสัตว์ อาจก่อให้เกิด ปัญหาการดื้อยาของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นอีกทางหนึ่ง เนื่องจากจุลินทรีย์จะไม่ถูกทำลายเมื่อได้รับยาใน ปริมาณที่ต่ำกว่าขนาดที่ใช้รักษา นอกจากนี้ยังสร้างสารพันธุกรรมที่ดื้อต่อยาชนิดนั้นๆ เรียกว่า อาร์-พลาสมิด (R-plasmid) ถ่ายทอดไปยังจุลินทรีย์ลูกหลานหรือจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ต่อไปด้วย

3. ยาต้านจุลชีพบางชนิดอาจก่อให้เกิดมะเร็ง เช่น คลอแรมเฟนิคอล และซัลฟาเมทาซีน เป็นต้น ดังนั้น เกือบทุกประเทศทั่วโลกได้มีประกาศห้ามใช้ คลอแรมเฟนิคอลในสัตว์ที่ใช้เป็นอาหาร ตั้งแต่ พ.ศ.2533 เป็นต้นมา เนื่องจากมีรายงานว่าผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยคลอแรมเฟนิคอล จำนวน 20,000-50,000 ราย จะมี 1 ราย เกิดโรคโลหิตจางชนิดอพลาสติก (Aplastic anemia) ซึ่งจะมีอัตราการเสียชีวิตสูงถึง 70% สำหรับผู้รอดชีวิตก็จะพบว่ามีโอกาสสูงในการเกิดมะเร็งของ เม็ดโลหิตขาว และทั้งนี้ ผลข้างเคียงที่อาจเกิดจากคลอแรมเฟนิคอลพบว่าไม่ขึ้นกับปริมาณของยา ที่ได้รับ (Sande and Mandell, 1985) ในระยะเวลาใกล้เคียงกับการประกาศห้ามใช้ยาคลอแรมเฟ-นิคอลในสัตว์ที่ใช้เป็นอาหารก็มีการห้ามใช้ยาซัลฟาเมทาซีนในโคนมที่กำลังอยู่ในระยะให้นม เนื่องจาก ศูนย์วิจัยพิษวิทยาแห่งชาติ ประเทศสหรัฐอเมริกา (The FDA's National Center for Toxicological Research หรือ NCTR) พบว่าซัลฟาเมทาซีนสามารถก่อให้เกิดมะเร็งของต่อม ไทรอยด์ในหนูทดลอง

แต่ที่เป็นประเด็นที่มีความสำคัญมากประเด็นหนึ่งที่ทำให้หน่วยงานรัฐและเอกชนที่เกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ตระหนักคือเรื่อง การส่งออกเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากสัตว์ที่จะต้องได้มาตรฐานตามกำหนดของประเทศคู่ค้า ดังนั้น สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมจึงได้กำหนดระบบการควบคุมการใช้ยาสำหรับสัตว์ในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ตามมอก.7001-2540 และกรมปศุสัตว์ก็ได้มีประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่องมาตรฐานฟาร์มเลี้ยงสัตว์ของประเทศไทย พ.ศ. 2542 เพื่อรับรองมาตรฐานฟาร์มเลี้ยงสัตว์ สำหรับส่วนภาคเอกชนโดยเฉพาะอย่างยิ่งฟาร์มปศุสัตว์เพื่อการส่งออกก็มีมาตรการในการป้องกันยาต้านจุลชีพตกค้างในเนื้อสัตว์ เช่น ทำการเปลี่ยนสูตรอาหารในระยะสุดท้ายเป็นอาหารที่ปลอดยาต้านจุลชีพ รวมทั้งมาตรการตรวจสอบยาต้านจุลชีพตกค้างในเนื้อล่วงหน้า 7 วัน ก่อนส่งโรงงานฆ่าสัตว์ ทั้งนี้แม้จะมีมาตรการต่างๆ ดังที่กล่าวแล้วก็ตาม การตรวจสอบยาต้านจุลชีพตกค้างในเนื้อสัตว์ก่อนสู่ผู้บริโภคหรือการส่งออกไปยังประเทศคู่ค้าเพื่อความมั่นใจว่าเนื้อสัตว์เหล่านั้นปลอดจากยาต้านจุลชีพจริงก็ยังคงมีความจำเป็น

การทบทวนเอกสารผลงานที่เกี่ยวข้อง :

การตรวจหาต่อต้านจุลชีพในน้ำนมและเนื้อสัตว์

หลักการที่ใช้ตรวจหาต่อต้านจุลชีพในน้ำนมและเนื้อสัตว์อาจแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

1. หลักการยับยั้งการแบ่งตัวของจุลินทรีย์ (Microbial inhibitor tests)
2. การทดสอบทางอิมมูโน (Immuno assays)
3. การทดสอบโดยวิธีไมโครเบียลรีเซฟเตอร์ (Microbial receptor assays)
4. วิธีการทางเคมี-ฟิสิกส์ (Physicochemical methods)

หลักการยับยั้งการแบ่งตัวของจุลินทรีย์ (Microbial inhibitor tests) คือ วิธีการตรวจโดยใช้แบคทีเรียชนิดที่ไวต่อยาต้านจุลชีพเป็นตัวทดสอบ เช่น วิธีการยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อ *Bacillus stearothermophilus* disk assay (หรือ BsDA) ซึ่งทำการตรวจสอบโดยใช้กระดาษกรองแผ่นกลมเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10 มม. จุ่มในน้ำนมที่จะทดสอบแล้ววางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแบคทีเรียดังกล่าวผสมอยู่ หลังจากอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิประมาณ 60-64 °เซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะขุ่นหรือมีโคโลนีของแบคทีเรียเป็นจุดเล็กกระจายทั่วไป ยกเว้นตรงบริเวณกระดาษกรองและรัศมีโดยรอบมีลักษณะใส (Clear zone of inhibition หรือ Inhibitory zone) วัดเส้นผ่าศูนย์กลางได้เกิน 12 มม. แสดงว่าในน้ำนมมียาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพ แบคทีเรียที่ใช้ในการตรวจสอบหาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพในน้ำนมโดยอาศัยหลักการเดียวกันนี้ยังมีอีกหลายชนิด เช่น เชื้อ *Bacillus subtilis*, *Bacillus megatherium*), *Bacillus cereus*, *Sarcina lutea*, *Streptococcus thermophilus* และ *Escherichia coli* เป็นต้น ดังนั้น ถ้าทำการทดสอบกับเชื้อ 3 ชนิด (Three-plate test) หรือ ทำการทดสอบกับเชื้อ 6 ชนิด (Six-plate test) ก็จะเป็นการเพิ่มความมั่นใจในการรายงานผลมากขึ้น (IDF, 1987)

การตรวจหายาด้านจุลชีพในน้ำนมโดยอาศัยหลักการการยับยั้งการแบ่งตัวของแบคทีเรียจากการซึมกระจายของน้ำนมและยาจากแผ่นกระดาษกรอง (Disk diffusion method) เป็นวิธีการที่ใช้มากกว่า 30 ปี และยังเป็นวิธีการที่นิยมใช้อยู่มากที่สุดในห้องปฏิบัติการตรวจคุณภาพน้ำนมทั่วโลก (IDF, 1993) และในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาได้มีการดัดแปลงและพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบ (Test kits) โดยเติมสารเคมี เช่น Bromocresol purple ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเมื่อเกิดสภาพความเป็นกรดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเนื่องจากการแบ่งตัวของแบคทีเรีย ดังนั้น ถ้าการตรวจสอบโดยการเติมน้ำนมลงไปไหลดทดลองซึ่งมีเชื้อแบคทีเรีย อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและสารเคมีดังกล่าวและไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสีหลังจากการอบเพาะเชื้อประมาณ 3 ชม. แสดงว่าตัวอย่างน้ำนมมียาปฏิชีวนะหรือยาด้านจุลชีพตกค้าง ชุดตรวจสอบที่มีการพัฒนาขึ้นจำหน่าย โดยอาศัยหลักการนี้ได้แก่ Delvotest^R-SP (DSM Food Specialties, The Netherlands), BR-Test AS (Glengarry Biotech, Inc.) และ Charm Farm Test (Penicillin Assays, Inc.) เป็นต้น ข้อดีของชุดตรวจสอบเหล่านี้คือ สามารถรู้ผลการตรวจอย่างรวดเร็วและลดขั้นตอนการทดสอบรวมทั้งเครื่องมืออุปกรณ์ที่จำเป็นต้องมีในห้องปฏิบัติการ ดังนั้น จึงสามารถนำไปใช้ทำการตรวจสอบในฟาร์มหรือนอกห้องปฏิบัติการได้ แต่ข้อด้อยที่เหมือนกันของชุดตรวจสอบและวิธีการ Disk diffusion method คือ ไม่สามารถบอกชนิดและปริมาณของยาปฏิชีวนะหรือยาด้านจุลชีพที่ตกค้างในน้ำนมได้

การทดสอบทางอิมมูโน (Immuno assays) คือ วิธีการตรวจโดยอาศัยหลักการให้โมเลกุลของยาด้านจุลชีพจับกับโมเลกุลของตัวรับ (Receptor) ซึ่งถูกสร้างให้มีส่วนเชื่อมรับที่สามารถต่อกับโมเลกุลของยาด้านจุลชีพแต่ละชนิดโดยเฉพาะแล้วอ่านผลจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น เช่น วิธีการ Latex agglutination และวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay หรือ ELISA เป็นต้น ตัวอย่างของชุดตรวจสอบซึ่งใช้วิธีการเหล่านี้ที่ผลิตในเชิงพาณิชย์ เช่น (Angenics) Spot Test EZ-Screen Sulfadimethoxine in Milk Lactek Beta-Lactam Milk Screening Kit Signal Neomycin Detection Test Signal Gentamicin Detection Test (Mohr, 1990)

การตรวจสอบหายาด้านจุลชีพในน้ำนมมีข้อดีที่สามารถบอกชนิดของยาได้ จึงอาจใช้เป็น การตรวจสอบยืนยัน (Confirmation test) และสามารถทำการตรวจสอบนอกห้องปฏิบัติการได้ ข้อด้อยก็คือ ถ้าตัวอย่างน้ำนมที่ตรวจสอบมียาด้านจุลชีพชนิดอื่นๆ ที่ไม่จำเพาะกับชุดตรวจสอบก็จะให้ผลการตรวจสอบเป็นลบได้

การทดสอบโดยวิธีไมโครเบียลรีเซฟเตอร์ (Microbial receptor assays) คือ วิธีการตรวจหายาด้านจุลชีพในน้ำนม โดยอาศัยหลักการให้โมเลกุลของยาดักค้างในน้ำนมจับกับส่วนรับ (Receptor site) ซึ่งมีความจำเพาะกับยาด้านจุลชีพของแบคทีเรีย ต่อจากนั้นทำการเติมยาชนิดที่ได้ติดฉลากสารกัมมันตภาพรังสีชนิดคาร์บอน 14 (C^{14}) หรือ ทรีเทียม (H^3) ดังนั้น ถ้า การตรวจวัดปริมาณของกัมมันตภาพรังสีมีน้อย แสดงว่าในน้ำนมมียาดักค้างอยู่ เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียจับกับโมเลกุลของยาดักค้างในน้ำนมไปแล้ว ยกตัวอย่างเช่น วิธี Charm test II เป็นต้น

วิธีการทางเคมี-ฟิสิกส์ (Physicochemical Methods) คือ วิธีการตรวจโดยวิธี

Thin-layer chromatography หรือ TLC และ วิธี HPLC หรือ High-performance liquid chromatography ซึ่งอาศัยหลักการคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ที่จำเพาะของยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดที่จะถูกแยกจากสารอื่นๆ เมื่อให้ตัวอย่างที่ตรวจสอบผ่านตัวกลางที่อำนาจการดูดซับ (Adsorbant) โมเลกุลของสารแต่ละชนิดไม่เท่ากัน คล้ายกับการใช้สารเคมีในการกรองน้ำ ดังนั้น ถ้าทำการตรวจสอบสารมาตรฐานและตัวอย่างที่ตรวจสอบแล้ว พบว่ามีสารในตัวอย่างผ่านตัวกลางที่อำนาจการดูดซับออกมาในเวลาเดียวกันเมื่อเทียบกับสารมาตรฐานก็แสดงว่าน่าจะเป็นสารตัวเดียวกัน ข้อดีของการตรวจหายาดก้างโดยวิธีนี้คือมีความแม่นยำที่สูงกว่า และสามารถคำนวณหาปริมาณยาที่ตกค้าง แต่ก็ยังมีข้อด้อยเนื่องจากมีขั้นตอนในการสกัดยาที่สงสัยจากน้ำนม ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อทำการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งยาต้านจุลชีพแต่ละกลุ่มหรือชนิดจะใช้วิธีการสกัดและการเตรียมตัวอย่างที่แตกต่างกัน รวมทั้งต้องอาศัยเครื่องมือในการทำการตรวจวิเคราะห์ซึ่งมีราคาค่อนข้างสูง

การตรวจสอบยาต้านจุลชีพในน้ำนมและเนื้อสัตว์ที่ใช้อยู่ในปัจจุบันในประเทศไทยและปัจจัยในการสร้างระบบการเฝ้าระวังและการป้องกันการตกค้างของยาต้านจุลชีพ

การตรวจสอบยาต้านจุลชีพตกค้างในน้ำนมดิบในปัจจุบันนิยมใช้ชุดตรวจสอบเบื้องต้น เช่น ชุดตรวจสอบ Delvotest-SP^R, Charm Farm Test^R และ AIM-96^R เป็นต้น ซึ่งสามารถรู้ผลการตรวจได้ภายใน 3½-4½ ชั่วโมง และมีความสามารถในการตรวจสอบยาต้านจุลชีพได้ดีกว่าวิธีการ Microbial inhibition disk assay (MIDA) และวิธี “Yoghurt test” แต่ทั้งนี้ชุดตรวจสอบทั้งหมดดังกล่าวต้องนำเข้าจากต่างประเทศทำให้ต้นทุนในการเฝ้าระวังยาต้านจุลชีพตกค้างในน้ำนมค่อนข้างสูง สำหรับการตรวจสอบยาต้านจุลชีพในเนื้อสัตว์ที่ใช้อยู่ในปัจจุบันคือ วิธี European Four Plate Test (EFPT) โดยการตัดชิ้นเนื้อตัวอย่างวางลงบนจานเพาะเชื้อและทำการอ่านผลหลังจากการอบจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง หรือใช้วิธี Microbial Inhibition Disk Assay (MIDA) ซึ่งต้องทำการสกัดยาต้านจุลชีพจากตัวอย่างเนื้อด้วย Citrate buffer solution และใช้แผ่นกระดาษกรองเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร จุ่มสารสกัดแล้ววางลงบนจานเพาะเชื้อ 4 ชนิด คล้ายกับวิธี EFPT ทั้งนี้วิธี MIDA ต้องใช้เวลาในการอบเพาะนานเช่นเดียวกับวิธี EFPT จึงสามารถทำการอ่านผลได้ ดังนั้น ก่อนหน้านี้คณะผู้วิจัยจึงได้ดำเนินการวิจัยและพัฒนาชุดตรวจสอบยาต้านจุลชีพตกค้างในน้ำนมและเนื้อสัตว์ขึ้นโดยมุ่งหวังให้ชุดตรวจสอบมีประสิทธิภาพไม่ด้อยไปกว่าชุดตรวจสอบจากต่างประเทศแต่มีค่าใช้จ่ายที่ถูกกว่า โดยชุดตรวจสอบยาต้านจุลชีพตกค้างในน้ำนมได้ตั้งชื่อว่า “KS-9” (เกรียงศักดิ์และธงชัย, 2541) และชุดตรวจสอบยาต้านจุลชีพตกค้างในเนื้อไก่และสุกรได้ตั้งชื่อว่า “KS-9S” (เกรียงศักดิ์และคณะ, 2543) แต่ทั้งนี้วิธีการใช้ชุดตรวจสอบ “KS-9S” ต้องทำการสกัดตัวอย่างเนื้อก่อนโดยการตีปั่นในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์โดยต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาค่อนข้างสูงคือ เครื่อง Homogenizer หรือเครื่อง Stomacher รวมทั้งการใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในอัตราส่วนสองเท่าของตัวอย่างเนื้ออาจทำให้ความเข้มข้นของยาดก้างลดลงในสารสกัดที่นำมาทดสอบ ด้วยข้อจำกัดดังกล่าวทำให้การใช้ชุดตรวจสอบ “KS-9S” ต้องปฏิบัติในห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมือดังกล่าว ดังนั้น จึงยังมีความจำเป็นในการพัฒนาชุด

ตรวจสอบที่ใช้สะดวกขึ้นเพื่อให้ระบบการเผาระวังยาต้านจุลชีพตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากสัตว์สามารถนำไปปฏิบัติได้อย่างครบวงจรของห่วงโซ่อาหารคือ ตั้งแต่ระดับฟาร์ม โรงงานฆ่าสัตว์ โรงงานแปรรูปเนื้อสัตว์และหน่วยงานของรัฐในทุกระดับที่เกี่ยวข้องทั้งในส่วนกลาง และส่วนภูมิภาค ส่วนชุดตรวจสอบยาต้านจุลชีพตกค้างในน้ำมัน “KS-9” ก็ยังขาดเครื่องมือเฉพาะชุดตรวจสอบ ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงตั้งใจจัดทำหรือจัดหาแท่นให้ความร้อน (Heater blocks) ในราคาที่ไมแพงเกินไปเพื่อช่วยให้ฟาร์มโคนมสามารถทำการเผาระวังปัญหาตกค้างได้เองโดยไม่ต้องส่งตัวอย่างน้ำมันไปยังห้องปฏิบัติการของสหกรณ์โคนมหรือโรงงานรับซื้อน้ำมันดิบ คณะผู้วิจัยเชื่อว่าถ้าหากระบบการเผาระวังยาต้านจุลชีพตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากสัตว์ในประเทศไทยมีประสิทธิภาพนอกจากจะทำให้อาหารปลอดภัยต่อผู้บริโภคแล้ว ยังจะเป็นที่ยอมรับของนานาชาติโดยเฉพาะอย่างยิ่งการที่ประเทศไทยจะประกาศเป็นครัวของโลก

โครงการวิจัยนี้มีความมุ่งหวังดั้งเดิมคือ การวิจัยและพัฒนาต่อจากชุดตรวจสอบ “KS-9” และชุดตรวจสอบ “KS-9S” ดังกล่าวข้างต้น แต่ด้วยความเคารพต่อรองศาสตราจารย์ น.สพ. ดร. เกรียงศักดิ์ สายธนู และไม่ให้เกิดความเข้าใจผิดต่อครอบครัวของท่าน คณะผู้วิจัยจึงจำเป็นต้องยกเลิกกิจกรรมที่ต้องเกี่ยวข้องกับชุดตรวจสอบ “KS-9” และ “KS-9S” และทำการดำเนินการวิจัยและพัฒนาสูตรอาหารของชุดตรวจสอบขึ้นใหม่

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- (1) เพื่อการพัฒนาชุดตรวจสอบหาต้านจุลชีพตกค้างในน้ำมันและเนื้อสัตว์ที่มีวิธีใช้ที่สะดวกและรวดเร็ว รวมทั้งมีประสิทธิภาพทัดเทียมกับชุดตรวจสอบของต่างประเทศแต่มีค่าใช้จ่ายที่ต่ำกว่า
- (2) เพื่อการหาสารที่จะใช้แทนตัวอย่างเนื้อที่ไม่มียาต้านจุลชีพตกค้างเพื่อให้เป็นตัวอย่างควบคุมเปรียบเทียบ (Negative Control)
- (3) เพื่อการพัฒนาวิธีการสกัดยาต้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างเนื้อสัตว์ที่สะดวกและรวดเร็วโดยไม่ต้องอาศัยเครื่องมือราคาแพงและสามารถนำไปปฏิบัตินอกห้องปฏิบัติการได้
- (4) เพื่อการพัฒนาชุดตรวจสอบหาต้านจุลชีพตกค้างในน้ำมันและเนื้อสัตว์ของไทยให้สามารถผลิตในเชิงพาณิชย์เพื่อเสริมสร้างประสิทธิภาพของระบบเผาระวังยาต้านจุลชีพตกค้างในประเทศไทย

วิธีดำเนินการวิจัย

(1) การพัฒนาชุดตรวจสอบยาด้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างน้ำมัน เนื้อไก่และสุกร

ทำการเตรียมชุดตรวจสอบยาด้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างน้ำมัน เนื้อไก่และเนื้อสุกร โดยใช้หลักการของ Tube diffusion method ซึ่งใช้เชื้อแบคทีเรีย *Geobacillus stearothermophilus* เป็นตัวทดสอบโดยผสมเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมรวมปริมาณ 0.3 มิลลิลิตร และบรรจุในหลอดที่เตรียมจากวัสดุพลาสติกชนิด Polypropylene ขนาดประมาณ 10 x 40 มิลลิเมตร (เส้นผ่าศูนย์กลาง x ส่วนสูง) โดยทดสอบการสุทธอาหารเลี้ยงเชื้อในส่วนประกอบต่างๆ สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ การเตรียมสปอร์ของเชื้อ และอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดชุดตรวจสอบยาด้านจุลชีพตกค้างสุทธอาหารต่างๆ ที่ออกแบบเพื่อการทดสอบจะประกอบด้วยวัสดุอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีต่างๆ ดังต่อไปนี้

- | | |
|-------------------------|---------------------------------------|
| - Meat extract | - Yeast extract |
| - Peptone | - Tryptose |
| - Agar | - Glycerol |
| - Lactose | - Glucose |
| - แป้ง (Soluble starch) | - โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) |
| - โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) | - แมงกานีสซัลเฟต (MnSO ₄) |
| - Bromocresol purple | |

ทั้งนี้เพื่อความสะดวกในการกล่าวอ้างถึงชุดตรวจสอบยาด้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างน้ำมัน ตัวอย่างเนื้อไก่และสุกร คณะผู้วิจัยจึงได้ตั้งชื่อชุดตรวจสอบยาด้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างน้ำมันว่า “AM-Test” โดยย่อมาจาก Antimicrobial residue Screening Test ส่วนชุดตรวจสอบยาด้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างเนื้อไก่และสุกรจะใช้ชื่อว่า “CM-Test” โดยย่อมาจาก Clean Meat Test

(2) การพัฒนาวิธีการตรวจสอบสารด้านจุลชีพในตัวอย่างเนื้อ

ทำการทดสอบวิธีการตรวจสอบสารด้านจุลชีพในตัวอย่างเนื้อโดยวิธีการ ดังต่อไปนี้

(2.1) การสกัดยาด้านจุลชีพจากตัวอย่างเนื้อด้วยวิธีการตีปั่น (Homogenized)

ตัวอย่างชิ้นเนื้อในน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 (น้ำหนัก:ปริมาตร)

(2.2) การตัดชิ้นเนื้อหรือใช้เนื้อบดใส่ลงในชุดตรวจสอบโดยตรง

(2.3) การคั้นน้ำเนื้อจากตัวอย่างเนื้อและใส่ลงในชุดตรวจสอบโดยตรง

(2.4) การกระดาศกรองซึ่งชุ่มด้วยน้ำเนื้อวางลงในชุดตรวจสอบให้กระดาศกรองสัมผัสกับผิวบนของอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดชุดตรวจสอบ

(3) ยาด้านจุลชีพที่ใช้ทดสอบหา Detection limits ของชุดตรวจสอบ

ทำการเตรียมยาด้านจุลชีพมาตรฐาน (SIGMA Chemical Company, Massachusetts ประเทศสหรัฐอเมริกา) ในน้ำกลั่นเพื่อใช้ในการทดสอบ Detection limits (ความสามารถในการตรวจ

พบยาต้านจุลชีพในปริมาณต่ำที่สุด) ของชุดตรวจสอบโดยการเติมสารละลายยาต้านจุลชีพมาตรฐาน ในตัวอย่างที่ทำการทดสอบให้มีความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพ (ppm) ในตัวอย่างที่ทดสอบแยกแต่ละชนิดของยาดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพ (ppm) ซึ่งเติมลงในตัวอย่างน้ำนม เนื้อไก่และเนื้อสุกร เพื่อทดสอบหา Detection limits ของชุดตรวจสอบ “AM-Test” และ “CM-Test”

ยาต้านจุลชีพที่ทดสอบ	ความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพ (ppm) ในตัวอย่างที่ทดสอบ		
	น้ำนม	น้ำเนื้อไก่	น้ำเนื้อสุกร
Penicillin	0.005-0.05	0.005-0.05	0.005-0.05
Ampicillin	0.005-0.05	0.005-0.05	0.005-0.05
Amoxicillin	0.005-0.05	0.005-0.05	0.005-0.05
Cloxacillin	0.005-0.05	0.005-0.05	0.005-0.05
Chloramphenicol	-	5-10	5-10
Enrofloxacin	-	5-10	5-10
Norfloxacin	-	5-10	5-10
Gentamicin	0.1-0.5	0.5-1.0	0.5-1.0
Kanamycin	0.1-0.5	0.5-5	0.5-5
Erythromycin	0.1-0.5	0.5-5	0.5-5
Chlortetracycline	0.1-0.5	0.5-1	0.5-1
Tetracycline	0.1-0.5	0.5-1	0.5-1
Oxytetracycline	0.1-0.5	0.5-1	0.5-1
Streptomycin	0.1-0.5	-	-
Sulfamethazine	0.1-0.5	0.1-0.5	0.1-0.5
Sulfathiazole	0.1-0.5	0.1-0.5	0.1-0.5
Sulfadiazine	0.1-0.5	0.1-0.5	0.1-0.5
Trimethoprim	-	0.1-0.5	0.1-0.5
Furazolidone	-	1-12	1-12
Furaltadone	-	1-12	1-12
Nitrofurazone	-	1-12	1-12
Nitrofurantoin	-	1-12	1-12

- = ไม่ได้ทำการทดลอง

(4) การทดสอบหาสารซึ่งใช้ทดแทนสารสกัดจากเนื้อปลอดสารต้านจุลชีพเพื่อใช้เป็นตัวอย่างควบคุม (Negative control) สำหรับชุดตรวจสอบ “CM-Test”

ทำการทดสอบหาสารที่สามารถใช้แทนแทนสารสกัดจากเนื้อปลอดสารต้านจุลชีพเพื่อใช้เป็นตัวอย่างควบคุม (Negative control) ด้วยการใส่สารอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งสกัดจากเนื้อหรือสารประเภทโปรตีนที่ใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อดังต่อไปนี้

- Meat extract (Scharlau Chemie S.A., EU) ส่วนประกอบใน 1g/L
 - Total nitrogen 11.5-12.5 กรัม
 - Animo-acid nitrogen 3.4-4.5 กรัม
 - Sodium chloride < 7 กรัม
- Yeast extract (Scharlau Chemie S.A., EU) ส่วนประกอบใน 1g/L
 - Total nitrogen 10 กรัม
 - Animo-acid nitrogen 5 กรัม
 - Sodium chloride < 1 กรัม
- Brain heart infusion (Scharlau Chemie S.A., EU) ส่วนประกอบใน 1g/L
 - Brain extract 7.8 กรัม
 - Heart extract 9.7 กรัม
 - Proteose peptone 10 กรัม
 - Dextrose 2 กรัม
 - Sodium chloride 5 กรัม
 - Di-sodium phosphate 2.5 กรัม

(5) การทดสอบความน่าเชื่อถือของชุดตรวจสอบ (Validity test) ของชุดตรวจสอบ “CM-Test”

การทดสอบความน่าเชื่อถือของชุดตรวจสอบจะทำการวิเคราะห์จากผลการตรวจของชุดตรวจสอบที่ทดสอบในน้ำที่คั่นจากตัวอย่างเนื้อและเซรุ่มของไก่ และในน้ำที่คั่นจากตัวอย่างเนื้อเซรุ่ม และปัสสาวะของสุกรหลังจากได้รับยาด้านจุลชีพเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับยา และคำนวณหาค่าความไว (Sensitivity ซึ่งหมายถึง ความสามารถของชุดตรวจสอบในการตรวจพบยาด้านจุลชีพตกค้างถ้ามีการให้แก่สัตว์จริง) ค่าความจำเพาะ (Specificity ซึ่งหมายถึง ความสามารถของชุดตรวจสอบในการตรวจไม่พบยาด้านจุลชีพตกค้างถ้าไม่มีการให้แก่สัตว์จริง) และความแม่นยำ (Accuracy ซึ่งหมายถึง ความแม่นยำของชุดตรวจสอบ) โดยใช้ 2 x 2 Table (Two by Two Table) ตามสูตรต่อไปนี้

	ไก่/สุกรได้รับยา	ไก่/สุกรไม่ได้รับยา	
ผลการตรวจด้วยชุดตรวจสอบ +ve	a	b	a + b
ผลการตรวจด้วยชุดตรวจสอบ -ve	c	d	c + d
	a + c	b + d	n

Sensitivity (True positive value) หรือความไว = $a / a+c$

Specificity (True negative value) หรือความจำเพาะ = $d / b+d$

Accuracy of the Test หรือความแม่นยำ = $a+d / n$

(5.1) วิธีการศึกษาในไก่

5.1.1 เริ่มเลี้ยงไก่เนื้อคณะเทศ ตั้งแต่อายุ 1 วัน

5.1.2 อายุ 1-21 วันให้อาหารสำเร็จรูปของบริษัท (มียาต้านจุลชีพผสม)

5.1.3 อายุ 22- 42 วัน ให้อาหารซึ่งผสมเอง (ปลอดยาต้านจุลชีพ)

5.1.4 อายุ 43-47 วัน (น้ำหนักเฉลี่ย 2.05 กก./ตัว) แบ่งไก่ออกเป็น 5 กลุ่มๆ

ละ 20 ตัว (กลุ่มทดลอง 4 กลุ่ม และกลุ่มควบคุม 1 กลุ่ม)

5.1.5 การให้ยาผสมน้ำให้กินโดยการรดน้ำประมาณ 12 ชั่วโมงก่อนให้น้ำผสมยาเฉลี่ยไก่แต่ละกลุ่มจะกินน้ำวันละ 4 ลิตร /กลุ่มการทดลอง โดยจะให้ยาผสมน้ำตั้งแต่วันที่ 7.00 น.ถึง19.00น. โดยแบ่งไก่ทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม

- กลุ่มให้ยา Sulprim ขนาด 8.2 กรัม/น้ำ 4 ลิตร
- กลุ่มให้ยา Colistin+Amoxycillin ขนาด 2 กรัม/น้ำ 4 ลิตร
- กลุ่มให้ยา Norfloxacin ขนาด 1 กรัม/น้ำ 4 ลิตร
- กลุ่มให้ยา Erythromycin ขนาด 10 กรัม/น้ำ 4 ลิตร
- กลุ่มควบคุม หรือ Negative control (ไก่ซึ่งไม่ได้รับยาต้านจุลชีพ)

หลังจากให้ยาครบตามกำหนด 5 วัน ทำการฆ่าไก่ตามระยะเวลาที่กำหนดเพื่อเก็บตัวอย่างซีรัม ตับ และกล้ามเนื้อ และทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อการตรวจสอบต่อไป

(5.2) วิธีการศึกษาในสุกร

5.2.1 ใช้สุกรขุนน้ำหนักเฉลี่ย 72.5 กก.จำนวน 60 ตัว

5.2.2 ให้อาหารซึ่งผสมเอง (ปลอดยาต้านจุลชีพ) นาน 20 วัน

5.2.3 แบ่งสุกรออกเป็น 5 กลุ่มๆละ 12 ตัว ดังต่อไปนี้

- กลุ่มให้ยา Tiamulin ขนาด 100 กรัม/อาหาร 100 กก.
- กลุ่มให้ยา Lincospectin ขนาด 100 กรัม/อาหาร 100 กก.
- กลุ่มให้ยา Sulprim ขนาด 480 กรัม/อาหาร 30 กก.
- กลุ่มให้ยา Chlortetracycline ขนาด 100 กรัม/อาหาร 100 กก.

- กลุ่มควบคุม (ไม่ให้ยาแก๊สกร)

หลังจากให้ยาครบตามกำหนด 5 วัน ทำการเก็บปัสสาวะ และเลือดตามระยะเวลาที่กำหนดคือ วันที่ 0 2 4 และ 7 จากสุกรแต่ละกลุ่มทดลอง และทำการเก็บตัวอย่างซีรัม ตับ ไต และกล้ามเนื้อ (เฉพาะวันที่ 7 หลังหยุดให้ยาโดยการฆ่าสุกรและเก็บตัวอย่าง) โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อการตรวจสอบต่อไป

(6) การทดสอบใช้ชุดตรวจสอบ “CM-Test” ในการตรวจหาอันตรายด้านจุลชีพตกค้างในเนื้อไก่และเนื้อสุกรที่จำหน่ายในตลาดสดและซูเปอร์มาร์เก็ตในเขตกรุงเทพมหานคร

ทำการตรวจหาอันตรายด้านจุลชีพตกค้างในเนื้อไก่และเนื้อสุกรที่จำหน่ายในตลาดสดและซูเปอร์มาร์เก็ตในเขตกรุงเทพมหานครด้วยชุดตรวจสอบ “CM-Test” เปรียบเทียบกับวิธีการ European Four Plate Test (EFPT) และวิธี Microbial Inhibition disk assay (MIDA)

(6.1) ตัวอย่างเนื้อไก่และเนื้อสุกร

ทำการสุ่มตัวอย่างเนื้อไก่และเนื้อสุกรจากตลาดสด 5 แห่ง และซูเปอร์มาร์เก็ต 4 แห่งในเขตกรุงเทพมหานคร ในช่วงเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2544 ถึงกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2545 ให้ได้จำนวนตัวอย่างเนื้อไก่รวม 300 ตัวอย่าง และตัวอย่างเนื้อสุกรรวม 300 ตัวอย่าง

(6.2) การเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบหาอันตรายด้านจุลชีพตกค้าง

ทำการเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบหาอันตรายด้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างเนื้อไก่และเนื้อสุกรด้วยวิธีการดังต่อไปนี้

(6.2.1) ชุดตรวจสอบยาต้านจุลชีพ “CM-Test” ซึ่งพัฒนาขึ้นโดยคณะผู้วิจัย ประกอบด้วยสปอร์ของแบคทีเรีย *Geobacillus stearothermophilus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม และอำนวยความสะดวกในการซึมผ่านของสารต้านจุลชีพและการเจริญเติบโตของสปอร์โดยบรรจุอยู่ในหลอดพลาสติก (Polypropylene) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 ซม. สูง 4 ซม.

(6.2.2) **European Four Plate Test (EFPT)** (Okerman et al., 1998) เป็นวิธีการตรวจสอบหาอันตรายด้านจุลชีพตกค้างในเนื้อเยื่อโดยใช้หลักการ Microbial inhibition plate assay ทำการทดสอบโดยตัดชิ้นเนื้อตัวอย่างให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 8 มม. และมีความหนาประมาณ 4-6 มม. วางลงบนจานเพาะเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Test agar pH 6.0, 7.2 และ 8.0 และ *Micrococcus luteus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Test agar pH 8.0 ทำการอ่านผลหลังจากอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18-24 ชั่วโมง ตัวอย่างที่มี Inhibition zone (หรือ Clear zone) ขนาดเกิน 2 มม. จากขอบชิ้นเนื้อแสดงว่ามีอันตรายด้านจุลชีพตกค้าง

(6.2.3) **Microbial Inhibition disk assay (MIDA)** (ดวงดาว วงศ์สมมาตร, 2543) เป็นวิธีการทดสอบโดยใช้กระดาษกรองเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 ซม. จุ่มสารละลายสกัดตัวอย่างเนื้อ (ทำการสกัดตัวอย่างเนื้อด้วย Citric Acid-Acetone Buffer) แล้ววางลงบนจานเพาะเชื้อ

Micrococcus luteus ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Antimicrobial test media 5 (AM 5), *Bacillus subtilis* ใน AM 5 และ *Bacillus mycoides* ใน AM 8 ทำการอ่านผลหลังจากเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง ตัวอย่างที่มี Inhibition zone (หรือ Clear zone) ขนาดเกิน 2 มม. จากขอบกระดาศกรองแสดงว่ามียาต้านจุลชีพตกค้าง

(6.2.4) **Charm-II Test™** (Charm 7600 System, Charm Science Inc., U.S.A.) เป็นวิธีการตรวจสอบยืนยันกลุ่มยาต้านจุลชีพโดยใช้หลักการ Microbial receptor assay (Charm II Test, 1995) ซึ่งในการศึกษานี้ทำการทดสอบยาต้านจุลชีพ 3 กลุ่ม คือ Beta-lactams, Tetracyclines และ Sulfonamides ในตัวอย่างเนื้อไก่และสุกรที่ให้ผลบวกจากวิธีการตรวจสอบเบื้องต้นด้วย CM-Test, EFPT และ MIDA

(7) การทดสอบใช้ชุดตรวจสอบ “AM-Test” และชุดตรวจสอบ “CM-Test” ในการตรวจหายาต้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างน้ำนม ตัวอย่างเนื้อไก่และเนื้อสุกรในฟาร์มปศุสัตว์ ทำการทดสอบการใช้ชุดตรวจสอบ “AM-Test” และ “CM-Test” ในฟาร์มปศุสัตว์ที่เข้าร่วมโครงการทดลองจำนวนทั้งหมด 8 ฟาร์ม ดังต่อไปนี้

(7.1) ฟาร์มโคนม จำนวน 2 ฟาร์ม

- อุดมฟาร์ม
(40/3 หมู่ 4 ต.ช้างค้ำแพว อ.แก่งคอย จ.สระบุรี)
- ฟาร์มโคนมของสถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตกาฬสินธุ์
อ.เมือง จ.กาฬสินธุ์

(7.2) ฟาร์มไก่เนื้อ จำนวน 4 ฟาร์ม

- บริษัท แกมเปียน ฟู้ดส์ จำกัด
(110 หมู่ 2 ต.หนองขี้ซาก อ.บ้านบึง จ.ชลบุรี)
- ฟาร์มคุณสุกร วงษ์วัฒนกุล
(98 หมู่ 7 ต.ท่าเคย อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี)
- บ. เอ็ม เค เอส ฟาร์ม จำกัด
(329 หมู่ 2 ต.หนองไผ่แก้ว อ.บ้านบึง จ. ชลบุรี)
- บริษัท สหฟาร์ม จำกัด
(99 หมู่ 8 ถ.สระบุรี-หล่มสัก ต.ห้วยหิน อ.ชัยบาดาล จ.ลพบุรี)

(7.3) ฟาร์มสุกร จำนวน 2 ฟาร์ม

- กิตติวัฒน์ฟาร์ม
(100 หมู่ 5 ถ.เชียงใหม่-ดอยสะเก็ด อ.สันทราย จ.เชียงใหม่)
- ฟาร์มสุกรของสถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตกาฬสินธุ์
อ.เมือง จ. กาฬสินธุ์

(9) การทดสอบใช้ชุดตรวจสอบ “AM-Test” ในการตรวจหายาด้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างน้ำนมโดยสหกรณ์โคนม

ทำการส่งชุดตรวจสอบยาด้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างน้ำนม “AM-Test” ให้แก่สหกรณ์โคนมทดลองใช้พร้อมกับแบบสอบถามความคิดเห็นต่อวิธีการใช้ชุดตรวจสอบ ระยะเวลาในอบเพาะชุดตรวจสอบ ความยากง่ายในการอ่านผลทดสอบ และอุปกรณ์ที่ให้ไว้พร้อมชุดตรวจสอบที่จะทำการผลิตในเชิงพาณิชย์ โดยมีสหกรณ์โคนมเข้าร่วมโครงการจำนวน 12 แห่ง ดังต่อไปนี้

- สหกรณ์โคนมหนองโพ จ.ราชบุรี
- สหกรณ์โคนมชุมพร จ.ชุมพร
- สหกรณ์โคนมเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่
- สหกรณ์โคนมท่าม่วง จ.กาญจนบุรี
- สหกรณ์โคนมไทย-เดนมาร์ก ห้วยสัตว์ใหญ่ อ.หัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์
- สหกรณ์โคนมไทย-เดนมาร์ก อ.ปราณบุรี จ.ประจวบคีรีขันธ์
- องค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย (อ.ส.ค.) ภาคใต้
อ.ปราณบุรี จ.ประจวบคีรีขันธ์
- สหกรณ์โคนมกุยบุรี จ.ประจวบคีรีขันธ์
- สหกรณ์โคนมพิมาย จ.นครราชสีมา
- สหกรณ์โคนมมวกเหล็ก จ.สระบุรี
- บริษัทส่งเสริมผลิตภัณฑ์นม จำกัด อ.มวกเหล็ก จ.สระบุรี
- สหกรณ์โคนมรัตนบุรี จ.สุรินทร์

(10) การพัฒนาอุปกรณ์แทนให้ความร้อน (Heater block)

ทำการจัดอุปกรณ์ทำแทนให้ความร้อน (Heater block) ซึ่งสามารถปรับอุณหภูมิให้คงที่ 65 ± 1 °C และสามารถอบเพาะหลอดทดสอบ “AM-Test” หรือ “CM-Test” ได้ครั้งละ 15 หลอด โดยต้นทุนการผลิตแทนให้ความร้อนจะต้องไม่สูงเกิน 4,000 บาท เพื่อให้ผู้ประกอบการฟาร์มสัตว์ที่ใช้เป็นอาหาร หน่วยงานของรัฐหรือเอกชนที่เกี่ยวข้องสามารถจัดซื้อเพื่อนำไปใช้ในฟาร์มหรือภาคสนามได้ ซึ่งรวมถึงโรงงานแปรรูปเนื้อสัตว์และโรงงานฆ่าสัตว์ในส่วนขององค์การบริหารส่วนท้องถิ่น

ทั้งนี้ คณะผู้วิจัยไม่มีผู้ใดเป็นวิศวกรไฟฟ้าแต่มีความเชื่อมั่นว่าวิศวกรไฟฟ้าไทยสามารถผลิตอุปกรณ์แทนให้ความร้อนได้แน่นอน ดังนั้นแผนการดำเนินการในการพัฒนาอุปกรณ์แทนให้ความร้อน (Heater block) จะใช้การติดต่อประสานงานหาวิศวกรไฟฟ้าไทยซึ่งมีความรู้ในการสร้างอุปกรณ์แทนให้ความร้อนและเข้าใจวัตถุประสงค์ของโครงการที่ต้องการให้การเฝ้าระวังยาด้านจุลชีพตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากสัตว์ในประเทศสามารถทำการส่งออกได้อย่างมีความมั่นใจและมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคในประเทศในมาตรฐานเดียวกันกับเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากสัตว์เพื่อการส่งออก

ผลการวิจัยและวิจารณ์

การพัฒนาชุดตรวจสอบยาด้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างน้ำนม “AM-Test” และชุดตรวจสอบยาด้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างเนื้อไก่และสุกร “CM-Test”

ความมุ่งหมายของการวิจัยและพัฒนาชุดตรวจสอบเบื้องต้น (Screening test kit) สำหรับการตรวจหาสารต้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างน้ำนมโค และตัวอย่างเนื้อสัตว์ซึ่งใช้เนื้อไก่และเนื้อสุกรเป็นตัวอย่างในการศึกษาทดลอง โดยใช้หลักการการยับยั้งการแบ่งตัวของแบคทีเรีย *จีโอแบซิลลัส สเตียโรเทอร์โมฟิลัส* (*Geobacillus stearothermophilus*) ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเพื่อให้สามารถอ่านผลการทดสอบได้ภายในเวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมงสำหรับตัวอย่างน้ำนมโค และประมาณ 2½ -3½ ชั่วโมงสำหรับตัวอย่างเนื้อไก่และเนื้อสุกร

(1.1) การเตรียมเชื้อ *Geobacillus stearothermophilus*

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Geobacillus stearothermophilus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (Nutrient agar) ที่เตรียมไว้ในขวดสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้สำลีพันปลายไม้ป้ายเชื้อให้กระจายทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 65 ± 1 °C เป็นเวลานาน 18-20 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการเก็บเชื้อโดยใช้น้ำเกลือ 0.9 % ล้างเซลล์ที่เจริญบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการเก็บรวบรวมเซลล์ที่ได้ในขวดที่ปราศจากเชื้อใช้ปิเปตดูดเชื้อประมาณ 200 ไมโครลิตร ผสมกับอาหารสำหรับเก็บเชื้อ 1 มิลลิลิตร แล้วเก็บในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปเก็บในอุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำมาใช้สำหรับการผลิตชุดตรวจสอบ

ส่วนประกอบของอาหารสำหรับเก็บเชื้อ (Glycerol broth)

มีทเอ็กแทรกต์ (Meat extract)	3	กรัม
เปปโตเน (Peptone)	5	กรัม
น้ำตาลแลคโตส (Lactose)	5	กรัม
กลีเซอรอล 100% (Glycerol 100%)	150	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นเติมจนครบ	1,000	มิลลิลิตร

ปรับความเป็นกรด-ด่าง (pH) ให้ได้ 7.4 ± 1 และทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธี

การอบนิ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันสูง (Autoclaving)

ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (Nutrient Agar)

ยีสต์เอ็กแทรกต์ (Yeast extract)	2	กรัม
มีทเอ็กแทรกต์ (Meat extract)	1	กรัม
เปปโตเน (Peptone)	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5	กรัม
อะการ์ (Agar)	15	กรัม

แมงกานีสซัลเฟต (MnSO ₄)	10	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับความเป็นกรด-ด่าง (pH) ให้ได้ 7.4±0.1 และทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีการอบนิ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันสูง (Autoclaving)

(1.2) การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับบรรจุในชุดตรวจสอบ

ทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับบรรจุในชุดตรวจสอบมีส่วนประกอบดังนี้คือ

ส่วนที่ 1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

ทริปโตส (Tryptose)	5	กรัม
แป้ง (Soluble starch)	5	กรัม
อะการ์ (Agar)	10	กรัม
น้ำตาลกลูโคส (Glucose)	10	กรัม
โบรโมคลีซอลเพอร์เพิล (Bromocresol purple)	0.06	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับความเป็นกรด-ด่าง (pH) ให้ได้ 7.4±0.1 และทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีการอบนิ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันสูง (Autoclaving)

ส่วนที่ 2 สารละลายยาทริเมทโทพริม (Trimethoprim)

เตรียมสารละลายยาทริเมทโทพริม 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ppm) แล้วทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วยเมมเบรน มิลลิพอร์ (Membrane milipore) ขนาด 0.2 ไมครอน

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับชุดตรวจสอบ

ส่วนที่ 1 ปริมาณ	500	มิลลิลิตร
ส่วนที่ 2 ปริมาณ	625	ไมโครลิตร

(1.3) การผสมเชื้อ *Geobacillus stearothermophilus* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ทำการผสมสปอร์ของเชื้อ *Geobacillus stearothermophilus* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 45 °C ในปริมาณของเชื้อซึ่งจะทำให้สามารถอ่านผลการตรวจสอบได้ในระยะเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง ทำการถ่ายใส่หลอดพลาสติกชนิด polypropylene ขนาด 10 x 40 มิลลิเมตร หลอดละ 300 ไมโครลิตร (รูปที่ 7) ภายใต้บรรยากาศปลอดเชื้อแล้วทำการปิดฝาหลอดชุดตรวจสอบด้วยแผ่นอะลูมิเนียมฟอยล์ให้สนิทโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 350 °C ทำการเก็บรักษาชุดตรวจสอบที่อุณหภูมิ 4-10 °C จนกว่าจะมีการนำมาใช้

วิธีการตรวจสอบยาต้านจุลชีพในตัวอย่างอย่างน้ำมัน ตัวอย่างชีรัม ตัวอย่างเหื่อ และ ตัวอย่างปัสสาวะ

(1) วิธีการตรวจสอบยาต้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างน้ำมัน (รูปที่ 2)

(1.1) ตัดจำนวนหลอดทดสอบเท่าจำนวนตัวอย่างที่จะทดสอบและเพิ่มอีก 1 หลอด เพื่อใช้เป็นหลอดควบคุมหรือหลอดปลอดสารต้านจุลชีพ (Negative control)

(1.2) เขียนหมายเลขของตัวอย่างบนหลอดทดสอบ

(1.3) ใช้ไซริงค์ต่อกับไซริงค์ที่ดูดตัวอย่างน้ำมันที่จะทดสอบปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร หยดลงในหลอดชุดทดสอบ

ทุกครั้งที่ทำการทดสอบให้หยอดน้ำมันปลอดสารต้านจุลชีพ 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบที่กำหนดให้เป็นหลอดควบคุม (น้ำมันปลอดสารต้านจุลชีพจะเตรียมไว้ในชุดตรวจสอบที่ผลิตในเชิงพาณิชย์ และถ้าใช้ไม่หมดให้เก็บไว้ในช่องทำน้ำแข็งของตู้เย็น)

(1.4) ทำการปิดฝาหลอดชุดตรวจสอบด้วยกระดาษทาบหรือเทปกาว เพื่อป้องกันสารในหลอดทดสอบระเหยในระหว่างการอบเพาะหลอดทดสอบ

(1.5) นำหลอดทดสอบไปอบเพาะในอุณหภูมิ 65 ± 1 องศาเซลเซียส โดยใช้อ่างน้ำร้อนที่สามารถควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ตู้อบเพาะเชื้อ (Incubator) หรือแท่นให้ความร้อน (Heater block) หลังจากทำการ อบเพาะหลอดทดสอบได้ 2 ชั่วโมงให้นำหลอดควบคุมมาดูผลก่อน ถ้าสีของหลอดควบคุมเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้งหมด ให้อ่านผลการทดสอบตัวอย่างที่ทดสอบทั้งหมดได้ แต่ถ้าสีของหลอดควบคุมยังไม่เปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้งหมดให้ทำการอบเพาะหลอดทดสอบต่อและนำมาอ่านผลทุก 10-15 นาที

(2) วิธีการตรวจสอบยาต้านจุลชีพในตัวอย่างเหื่อ (รูปที่ 3)

(2.1) ตัดจำนวนหลอดทดสอบเท่าจำนวนตัวอย่างที่จะทดสอบและเพิ่มอีก 1 หลอด เพื่อใช้เป็นหลอดควบคุมหรือหลอดปลอดสารสกัดโปรตีนปลอดยาต้านจุลชีพ (Negative control)

(2.2) เขียนหมายเลขของ ตัวอย่างบนหลอดทดสอบ

(2.3) ใช้ตัวอย่างเหื่อประมาณ 15 กรัม และห่อด้วยผ้าขาวบาง แล้วทำการคั้นน้ำจากเหื่อโดยใช้อุปกรณ์สำหรับบดกระเทียมให้ได้น้ำที่คั้นจากเหื่อประมาณ 0.1-0.2 มิลลิลิตร

(2.4) ทำการชั่งน้ำที่คั้นได้จากตัวอย่างเหื่อด้วยแผ่นกระดาษกรองเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร (หรือน้อยกว่า 1 เซนติเมตร) ให้กระดาษกรองชุ่มด้วยน้ำที่คั้นจากเหื่อ แล้ววางกระดาษกรองดังกล่าวลงในหลอดชุดตรวจสอบโดยให้สัมผัสผิวบนของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ทุกครั้งที่ทำการทดสอบให้ใช้แผ่นกระดาษกรองจุ่มสารสกัดโปรตีนปลอดสารต้านจุลชีพ วางลงในหลอดทดสอบที่กำหนดให้เป็นหลอดควบคุม (สารสกัดโปรตีนปลอดสารต้านจุลชีพจะเตรียมไว้ในชุดตรวจสอบที่ผลิตในเชิงพาณิชย์ และถ้าใช้ไม่หมดให้เก็บไว้ในช่องทำน้ำแข็งของตู้เย็น)

(2.5) ทำการปิดฝาหลอดชุดตรวจสอบด้วยกระดาษขาวหรือเทปกาวเพื่อป้องกันสารในหลอดทดสอบระเหยในระหว่างการอบเพาะหลอดทดสอบ

(2.6) นำหลอดทดสอบไปอบเพาะในอุณหภูมิ 65 ± 1 องศาเซลเซียส โดยใช้อ่างน้ำร้อนที่สามารถควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ตู้อบเพาะเชื้อ (Incubator) หรือแท่นให้ความร้อน (Heater block) หลังจากทำการ อบเพาะหลอดทดสอบได้ $2\frac{1}{2}$ ชั่วโมงให้นำหลอดควบคุมมาดูผลก่อน ถ้าสีของหลอดควบคุมเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้งหมด ให้อ่านผลการทดสอบตัวอย่างที่ทดสอบทั้งหมดได้ แต่ถ้าสีของหลอดควบคุมยังไม่เปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้งหมดให้ทำการอบเพาะหลอดทดสอบต่อ และนำมาอ่านผลทุก 10-15 นาที

(3) วิธีการตรวจสอบยาด้านจุลชีพในตัวอย่างซีรัม

(3.1) ตัดจำนวนหลอดทดสอบเท่าจำนวนตัวอย่างที่จะทดสอบและเพิ่มอีก 1 หลอดเพื่อใช้เป็นหลอดควบคุมหรือหลอดปลอดสารด้านจุลชีพ (Negative control)

(3.2) เขียนหมายเลขของ ตัวอย่างบนหลอดทดสอบ

(3.3) ใช้แผ่นกระดาษกรองเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร (หรือน้อยกว่า 1 เซนติเมตร) จุ่มตัวอย่างซีรัม แล้ววางกระดาษกรองดังกล่าวลงในหลอดชุดตรวจสอบโดยให้สัมผัสผิวบนของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ทุกครั้งทำการทดสอบให้ใช้แผ่นกระดาษกรองจุ่มสารสกัดโปรตีนปลอดสารด้านจุลชีพวางลงในหลอดทดสอบที่กำหนดให้เป็นหลอดควบคุม (สารสกัดโปรตีนปลอดสารด้านจุลชีพจะเตรียมไว้ในชุดตรวจสอบที่ผลิตในเชิงพาณิชย์ และถ้าใช้ไม่หมดให้เก็บไว้ในช่องทำน้ำแข็งของตู้เย็น)

(3.4) ทำการปิดฝาหลอดชุดตรวจสอบด้วยกระดาษขาวหรือเทปกาว เพื่อป้องกันสารในหลอดทดสอบระเหยในระหว่างการอบเพาะหลอดทดสอบ

(3.5) นำหลอดทดสอบไปอบเพาะในอุณหภูมิ 65 ± 1 องศาเซลเซียส โดยใช้อ่างน้ำร้อนที่สามารถควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ตู้อบเพาะเชื้อ (Incubator) หรือแท่นให้ความร้อน (Heater block) หลังจากทำการ อบเพาะหลอดทดสอบได้ 2 ชั่วโมงให้นำหลอดควบคุมมาดูผลก่อน ถ้าสีของหลอดควบคุมเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้งหมด ให้อ่านผลการทดสอบตัวอย่างที่ทดสอบทั้งหมดได้ แต่ถ้าสีของหลอดควบคุมยังไม่เปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้งหมดให้ทำการอบเพาะหลอดทดสอบต่อ และนำมาอ่านผลทุก 10-15 นาที

(4) วิธีการตรวจสอบยาด้านจุลชีพในตัวอย่างปัสสาวะ

(4.1) ตัดจำนวนหลอดทดสอบเท่าจำนวนตัวอย่างที่จะทดสอบและเพิ่มอีก 1 หลอดเพื่อใช้เป็นหลอดควบคุมหรือหลอดปลอดสารด้านจุลชีพ (Negative control)

(4.2) เขียนหมายเลขของ ตัวอย่างบนหลอดทดสอบ

(4.3) ใช้แผ่นกระดาษกรองเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร (หรือน้อยกว่า 1 เซนติเมตร) จุ่มตัวอย่างปัสสาวะ แล้ววางกระดาษกรองดังกล่าวลงในหลอดชุดตรวจสอบโดยให้สัมผัสผิวบนของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ทุกครั้งที่ทำการทดสอบให้ใช้แผ่นกระดาษกรองจุ่มสารสกัดโปรตีนปลอดสารต้านจุลชีพ วางลงในหลอดทดสอบที่กำหนดให้เป็นหลอดควบคุม (สารสกัดโปรตีนปลอดสารต้านจุลชีพจะเตรียมไว้ในชุดตรวจสอบที่ผลิตในเชิงพาณิชย์ และถ้าใช้ไม่หมดให้เก็บไว้ในช่องทำน้ำแข็งของตู้เย็น)

(4.4) ทำการปิดฝาหลอดชุดตรวจสอบด้วยกระดาษทาวหรือเทปทาว เพื่อป้องกันสารในหลอดทดสอบระเหยในระหว่างการอบเพาะหลอดทดสอบ

(4.5) นำหลอดทดสอบไปอบเพาะในอุณหภูมิ 65 ± 1 องศาเซลเซียส โดยใช้อ่างน้ำร้อนที่สามารถควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ตู้อบเพาะเชื้อ (Incubator) หรือแท่นให้ความร้อน (Heater block) หลังจากทำการ อบเพาะหลอดทดสอบได้ 2 ชั่วโมงให้นำหลอดควบคุมมาดูผลก่อน ถ้าสีของหลอดควบคุมเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้งหมด ให้อ่านผลการทดสอบตัวอย่างที่ทดสอบทั้งหมดได้ แต่ถ้าสีของหลอดควบคุมยังไม่เปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้งหมดให้ทำการอบเพาะหลอดทดสอบต่อและนำมาอ่านผลทุก 10-15 นาทีการอ่านผล

การอ่านผลการทดสอบหายาด้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างน้ำนม ตัวอย่างชีร์ม ตัวอย่างเนื้อ และตัวอย่างปัสสาวะ

การอ่านผลการทดสอบหายาด้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างน้ำนม ตัวอย่างชีร์ม ตัวอย่างเนื้อ และตัวอย่างปัสสาวะโดยดูการเปลี่ยนแปลงของสีในหลอดชุดตรวจสอบ ถ้าสีของหลอดทดสอบเปลี่ยนเป็นสีเหลือง แสดงว่าตัวอย่างน้ำนม ตัวอย่างชีร์ม ตัวอย่างเนื้อและตัวอย่างปัสสาวะไม่มียาด้านจุลชีพตกค้างอยู่ แต่ถ้าสีของหลอดทดสอบยังคงเป็นสีม่วงแสดงว่ามียาด้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างที่ทำการทดสอบ แต่ถ้าสีของชุดตรวจสอบเป็นสีม่วงด้านบนและมีสีเหลืองด้านล่างหรือสีม่วงจางลงแต่ไม่เป็นสีเหลืองแสดงว่าตัวอย่างอาจมียาด้านจุลชีพตกค้างในปริมาณต่ำกว่าความเข้มข้นที่ชุดตรวจสอบสามารถตรวจพบ (Detection limits) ได้ 100 % เนื่องจากหลักการของชุดตรวจสอบอาศัยการแบ่งตัวของแบคทีเรีย *Geobacillus stearothermophilus* ในกรณีที่ไม่ถูกยับยั้งด้วยยาด้านจุลชีพก็จะใช้สารอาหารในหลอดทดสอบแล้วสร้างสภาวะที่เป็นกรดขึ้นทำให้สาร Bromocresol purple เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง (รูปที่ 4) ทั้งนี้ สีเหลืองที่เกิดขึ้นจะชัดเจนมากหรือน้อยเพียงใดจะขึ้นอยู่กับสภาวะของกรดในหลอดทดสอบ ดังนั้นถ้ามียาด้านจุลชีพในระดับที่เพียงสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของแบคทีเรีย *G. stearothermophilus* ได้เพียงบางส่วนก็จะการเปลี่ยนแปลงของสีม่วงในหลอดทดสอบไปเป็นสีเหลืองไม่ชัดเจน

การพัฒนาวิธีการสกัดตัวอย่างเนื้อเพื่อตรวจสอบหาธาตุานจุลชีพ

โดยทั่วไปวิธีการสกัดตัวอย่างเนื้อเพื่อตรวจสอบหาธาตุานจุลชีพตกค้างจะต้องใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมผสมกับตัวอย่างเนื้อและทำการตีปั่นด้วยเครื่อง Homogenizer หรือด้วยเครื่อง Stomacher (รูปที่ 5) ซึ่งเครื่องมือดังกล่าวมีราคาค่อนข้างสูงมาก รวมทั้งมีน้ำหนักมากจึงไม่สามารถนำไปใช้ในภาคสนามได้ ดังนั้น วัตถุประสงค์ในการวิจัยนี้จึงได้พยายามพัฒนาวิธีการสกัดตัวอย่างเนื้อด้วยวิธีการที่ใช้เครื่องมือซึ่งสามารถหาได้ทั่วไปและมีราคาถูกเพื่อให้การตรวจสอบหรือการเฝ้าระวังธาตุานจุลชีพตกค้างสามารถปฏิบัติได้ในทุกๆ ห้องปฏิบัติการและในภาคสนามซึ่งหมายถึงสามารถทำการตรวจสอบได้ในฟาร์ม ในโรงงานฆ่าสัตว์ของท้องถิ่น หรือแม้แต่ในซูเปอร์มาร์เก็ตและในตลาดสด วิธีการที่ได้พัฒนาขึ้น คือ

(1) การบดตัวอย่างเนื้อประมาณ 5 กรัมในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ด้วยโกรบดยา (Mortar) แล้วคูดตัวอย่างน้ำสกัดมาหยอดลงในชุดตรวจสอบ “CM-Test” ซึ่งเป็นวิธีการที่สะดวกและได้ทำการทดสอบแล้วพบว่าให้ประสิทธิภาพเท่ากับการใช้เครื่องตีปั่นขึ้นเนื้อและสามารถนำไปใช้ในภาคสนามได้ แต่ปัญหาที่พบคือ บางครั้งการคูดตัวอย่างน้ำสกัดอาจมีเศษเนื้อติดปลายของหลอดดูด (Syringe tip) ทำให้อาจได้ปริมาณของตัวอย่างน้ำสกัดคลาดเคลื่อน

(2) การคั้นน้ำเนื้อจากตัวอย่างเนื้อประมาณ 15 กรัม โดยการห่อตัวอย่างเนื้อด้วยผ้าขาวบางและบีบด้วยเครื่องบดกระเทียม (รูปที่ 6) ซึ่งเป็นวิธีการที่จะได้ปริมาณความเข้มข้นของธาตุานจุลชีพจากตัวอย่างเนื้อโดยไม่ถูกเจือจางด้วยน้ำกลั่นหรือสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดตัวอย่างเนื้อ นอกจากนี้ น้ำกลั่นและสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดอาจไม่ใช่สารละลายที่เหมาะสมในการสกัดธาตุานจุลชีพบางชนิดจากตัวอย่างเนื้อ ดังนั้น การใช้ น้ำที่คั้นได้จากตัวอย่างเนื้อซึ่งน่าจะเป็นส่วนของ Plasma protein ในเนื้อจึงเป็นตัวอย่างที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการตรวจสอบหาธาตุานจุลชีพตกค้างในตัวอย่างเนื้อ

ทั้งนี้ การทดสอบหาธาตุานจุลชีพตกค้างโดยการใช้ น้ำที่คั้นได้จากตัวอย่างเนื้อหรือแม้แต่การใช้ตัวอย่างเนื้อบดละเอียดใส่ลงในชุดตรวจสอบ “CM-Test” โดยตรงพบว่าไม่สามารถทำได้เนื่องจาก น้ำที่คั้นได้จากตัวอย่างเนื้อไก่และสุกร หรือเนื้อที่บดละเอียดมีค่าความเป็นกรดค่อนข้างสูงคือมี pH ระหว่าง 5.4-5.7 จึงทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของ Acid-base indicators (Bromocresol purple) ในหลอดชุดตรวจสอบจากสีม่วงเป็นสีเหลืองในทันที จึงต่างจากการตรวจสอบหาธาตุานจุลชีพตกค้างในตัวอย่างนํ้านมดิบและในน้ำกลั่นหรือสารละลายบัฟเฟอร์ที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อซึ่งสามารถหยอดลงในหลอดชุดตรวจสอบโดยตรง เนื่องจากความเป็นกรด-ด่างของนํ้านมดิบและน้ำกลั่นหรือสารละลายบัฟเฟอร์ที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อค่อนข้างเป็นกลางคือ มี pH ประมาณ 6.7-7 ดังนั้น การแก้ไขปัญหาดังกล่าวจึงได้นำการใช้แผ่นกระดาษกรองจุ่มตัวอย่างน้ำที่คั้นได้จากตัวอย่างเนื้อแล้ววางลงในหลอดชุดตรวจสอบ “CM-Test” โดยให้แผ่นกระดาษกรองสัมผัสกับผิวบนของอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดชุดตรวจสอบ

การนำหลักการ Disk Diffusion มาใช้ร่วมกับหลักการ Tube Diffusion

การใช้แผ่นกระดาษกรองซึ่งชุ่มด้วยน้ำที่คั้นได้จากตัวอย่างเนื้อ (เรียกว่า น้ำเนื้อ) หรือตัวอย่างปัสสาวะหรือตัวอย่างซีรัมวางลงในชุดตรวจสอบ “CM-Test” พบว่าความเป็นกรดของน้ำเนื้อ ซึ่งมี pH 5.5-5.7 และปัสสาวะซึ่งอาจมี pH ต่ำถึง 5 รวมทั้ง pH 7.4 ของตัวอย่างซีรัมไม่มีผลต่อ Bromocresol purple ในหลอดชุดตรวจสอบ ทั้งนี้ การใช้แผ่นกระดาษกรองซึ่งชุ่มด้วยสารละลายที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อแล้ววางในจานเพาะเชื้อเป็นหลักการของ Disk diffusion คือ มีการกระจายของยาต้านจุลชีพจากแผ่นกระดาษกรองและยับยั้งการแบ่งตัวของแบคทีเรียที่ทดสอบ ในขณะที่ลักษณะของชุดตรวจสอบ “CM-Test” ซึ่งเป็นหลอดทรงกระบอกสำหรับตรวจสอบยาต้านจุลชีพตกค้างเป็นหลักการของ Tube diffusion คือ มีการซึมผ่านของยาต้านจุลชีพจากผิวบนลงล่างของหลอดชุดตรวจสอบ การใช้หลักการของ Disk diffusion ร่วมกับหลักการของ Tube diffusion ในการวิจัยนี้สามารถแก้ไขปัญหาผลกระทบของสภาพความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างต่อ Acid-base indicators ในหลอดชุดตรวจสอบ และลดขั้นตอนในการปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างที่จะทดสอบ นอกจากนี้ การปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างที่จะทดสอบคงเป็นการยากมากในกรณีตัวอย่างที่จะทดสอบมีปริมาณน้อย

การทดสอบหาสารซึ่งใช้ทดแทนน้ำนมปลอดสารต้านจุลชีพ และสารสกัดจากเนื้อปลอดสารต้านจุลชีพเพื่อใช้เป็นตัวอย่างควบคุม (Negative control)

ในการทดสอบหาสารต้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างทุกครั้งจะต้องมีหลอดควบคุม (Negative control) ซึ่งคือ หลอดทดสอบที่ใส่น้ำนมปลอดสารต้านจุลชีพสำหรับการใช้ชุดตรวจสอบ “AM-Test” และหลอดทดสอบที่ใส่น้ำเนื้อปลอดสารต้านจุลชีพหรือสารสกัดโปรตีนปลอดสารต้านจุลชีพสำหรับการใช้ชุดตรวจสอบ “CM-Test” เนื่องจากการอ่านผลการทดสอบของชุดตรวจสอบอาศัยการเปลี่ยนสีของสาร Bromocresol purple blue ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของสีจากสีม่วงเป็นสีเหลืองดังกล่าวขึ้นกับสภาวะของกรดในหลอดทดสอบซึ่งเชื้อ *G. stearothermophilus* สร้างขึ้นจากการใช้สารอาหารในหลอดทดสอบ ดังนั้น การเปลี่ยนแปลงของสีในหลอดทดสอบจึงขึ้นกับปัจจัยดังต่อไปนี้

(1) จำนวนเชื้อ *G. stearothermophilus* ในหลอดทดสอบ ซึ่งอาจมีจำนวนลดลงเนื่องจากการเก็บรักษาชุดตรวจสอบไม่เหมาะสมทำให้เชื้อบางส่วนสูญเสียไปหรือเชื้อบางส่วนถูกยาต้านจุลชีพที่ตกค้างในตัวอย่างที่ทดสอบทำลายไป ดังนั้นสภาวะกรดที่เชื้อสามารถสร้างขึ้นก็จะต่ำลง

(2) อุณหภูมิที่ใช้ในการอบเพาะหลอดทดสอบที่ 65 °C พบว่าจะเหมาะสมที่สุดในการแบ่งตัวของเชื้อ *G. stearothermophilus* ในหลอดทดสอบ ซึ่งถ้าการอบเพาะใช้อุณหภูมิที่สูงหรือต่ำกว่านี้ก็จะมีผลต่อการแบ่งตัวของเชื้อต่ำลง ดังนั้น สภาวะกรดที่เชื้อสามารถสร้างขึ้นก็จะต่ำลง

ทั้งนี้สภาวะกรดที่เกิดขึ้นจะทำให้สาร Bromocresol purple blue เปลี่ยนเป็นสีเหลืองที่ pH ประมาณ 5.6-5.7

ดังนั้น เพื่อความแน่นอนของหลอดควบคุมและความสะดวกของของผู้ใช้ชุดตรวจสอบ ในชุดตรวจสอบ “AM-Test” ที่ผลิตในเชิงพาณิชย์จะมีนมผงปลอดสารต้านจุลชีพประมาณ 0.6 กรัม

บรรจุในขวด 10 มิลลิลิตร ให้ซึ่งผู้ใช้สามารถละลายด้วยน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร แล้วใช้เป็นตัวอย่างน้ำนมปลอดสารต้านจุลชีพ ส่วนในชุดตรวจสอบ “CM-Test” ที่ผลิตในเชิงพาณิชย์จะมีสารอาหารเลี้ยงเชื้อจุลชีพ Brain heart infusion 0.1 กรัม บรรจุในขวด 10 มิลลิลิตร ให้ซึ่งผู้ใช้สามารถละลายด้วยน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร แล้วใช้เป็นแทนตัวอย่างน้ำนมปลอดสารต้านจุลชีพ

Detection limits ของชุดตรวจสอบ “AM-Test” และ “CM-Test”

ความสามารถที่ชุดตรวจสอบให้ผลบวกในการทดสอบหรือความสามารถในการตรวจพบยาต้านจุลชีพที่ตกค้างอยู่ในตัวอย่างในปริมาณความเข้มข้นของยาน้อยที่สุดเรียกว่าค่า Detection limits ของชุดตรวจสอบ ผลจากการทดสอบในตัวอย่างน้ำนม ตัวอย่างน้ำเนื้อไก่ และตัวอย่างน้ำเนื้อสุกรที่เติมยาต้านจุลชีพในปริมาณต่างๆ (Spiked หรือ Fortified samples) พบว่า Detection limits ของชุดตรวจสอบ “AM-Test” มีประสิทธิภาพดีมากในการตรวจสอบหาต้านจุลชีพในตัวอย่างน้ำนมโดยเฉพาะอย่างยิ่งยากลุ่ม Beta-lactams (Penicillin, Ampicillin, Amoxicillin และ Cloxacillin) ซึ่ง Detection limits อยู่ในระดับ 0.01-0.02 ppm สำหรับยาต้านจุลชีพชนิดอื่นๆ ที่ทำการทดสอบได้แก่ Streptomycin, Gentamicin, Erythromycin, Tetracycline, Oxytetracycline, Chlortetracycline และยาในกลุ่ม Sulfonamides (Sulfadiazine, Sulfathiazole และ Sulfamethazine) มี Detection limits อยู่ในระดับ 0.2-0.4 ppm ซึ่งเป็นระดับที่ใกล้เคียงกับค่าสูงสุดของยาตกค้างที่อนุญาตให้ตรวจพบได้ (Maximum residue limits หรือ MRLs) ยกเว้นยา Kanamycin พบว่าชุดตรวจสอบ “AM-Test” มี Detection limit ที่ 2 ppm (ตารางที่ 3)

สำหรับการทดสอบหา Detection limits ของชุดตรวจสอบ “CM-Test” ในตัวอย่างน้ำเนื้อไก่ และน้ำเนื้อสุกรซึ่งเติมยาต้านจุลชีพลงไปพบว่าคล้ายคลึงกับประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ “AM-Test” โดยยาต้านจุลชีพกลุ่ม Beta-lactams (Penicillin, Ampicillin, Amoxicillin และ Cloxacillin) มี Detection limits อยู่ในระดับ 0.005-0.2 ppm ซึ่งเป็นระดับที่ต่ำกว่าค่า MRLs สำหรับยาต้านจุลชีพชนิดอื่นๆ ที่ทำการทดสอบ Gentamicin, Tetracycline, Oxytetracycline และยาในกลุ่ม Sulfonamides (Sulfamethazine, Sulfathiazole, Sulfadiazine และ Trimethoprim) มี Detection limits อยู่ในระดับ 0.15-0.8 ppm ซึ่งเป็นระดับที่ใกล้เคียงกับค่า MRLs ส่วน Detection limits ของชุดตรวจสอบ “CM-Test” ต่อยา Chlortetracycline, Kanamycin และ Erythromycin แม้จะอยู่ในระดับ 0.8-2 ppm แต่ก็อาจกล่าวได้ว่าใกล้เคียงกับค่า MRLs ถ้าพิจารณาหน่วยที่ใช้วัดความเข้มข้นของยาในระดับส่วนต่อพันล้านส่วน (ppm) ยกเว้นยา Enrofloxacin ซึ่งค่า Detection limit เท่ากับ 7-8 ppm ในขณะที่กำหนดค่า MRL เท่ากับ 0.1 ppm ทั้งนี้ค่า Detection limits ที่ได้จากการทดสอบยาต้านจุลชีพซึ่งไม่อนุญาตให้ใช้ในสัตว์ที่ใช้เป็นอาหารหรือไม่ได้มีการกำหนดค่า MRLs ได้แก่ Chloramphenicol, Norfloxacin และยาในกลุ่ม Nitrofurans (Furazolidone, Furaltadone, Nitrofurazone และ Nitrofurantoin) มีค่า Detection limits อยู่ในระดับ 5-12 ppm (ตารางที่ 4 และ ตารางที่ 5)

การทดสอบความน่าเชื่อถือของชุดตรวจสอบ (Validity test) ของชุดตรวจสอบ “CM-Test”

การทดสอบความน่าเชื่อถือของชุดตรวจสอบ “CM-Test” ในการตรวจหายาด้านจุลชีพในตัวอย่างเนื้อไก่และเนื้อสุกรจำเป็นที่จะต้องใช้ไก่และสุกรทดลองโดยให้กินยาด้านจุลชีพในขนาดของยาที่ระบุไว้ในเอกสารกำกับยาเปรียบเทียบกับกลุ่มไก่และสุกรทดลองที่ไม่ได้รับยาด้านจุลชีพ ทั้งนี้ยาที่ใช้ในการศึกษาจะต้องเป็นยาที่มีทะเบียนยาและยังมีการใช้แพร่หลายในการเลี้ยงสัตว์ในปัจจุบัน ซึ่งคณะผู้วิจัยเลือกให้ยา Sulfadiazine + Trimethoprim (Sulprim), Norfloxacin, Colistin + Amoxycillin, และ Erythromycin สำหรับการทดสอบในไก่ ส่วนยาที่ใช้ในสุกรได้แก่ Sulfadiazine + Trimethoprim, Lincomycin + Spectinomycin, Tiamulin hydrogen fumarate และ Chortetracycline และเพื่อให้การใช้สัตว์ทดลองเกิดประโยชน์มากที่สุดจึงได้ทำการศึกษาระยะเวลาที่ชุดตรวจสอบ “CM-Test” สามารถตรวจพบยาด้านจุลชีพในตัวอย่างซีรัม ตัวอย่างเนื้อและตับของไก่หลังจากหยุดใช้ยา (Withdrawal period) สำหรับสุกรก็จะทำการตรวจตัวอย่างซีรัม ตัวอย่างปัสสาวะ ตัวอย่างเนื้อสุกร ตับและไตหลังจากหยุดใช้ยา (Withdrawal period)

ผลการศึกษาพบว่าชุดตรวจสอบ “CM-Test” ยังสามารถให้ผลบวกในไก่ที่ได้รับยา Sulfadiazine + Trimethoprim ในตัวอย่างซีรัม ตัวอย่างเนื้อและตับได้ 100 % ในวันที่ 3 หลังการหยุดใช้ยา ส่วนไก่ที่ได้รับยา Norfloxacin พบว่าชุดตรวจสอบ “CM-Test” สามารถให้ผลบวกได้ 100 % จากตัวอย่างซีรัมและตัวอย่างเนื้อในวันที่ 3 หลังการหยุดใช้ยา สำหรับไก่ที่ได้รับยา Colistin + Amoxycillin และ Erythromycin ชุดตรวจสอบ “CM-Test” สามารถให้ผลบวก 88 -100 % ในวันที่ 1 หลังการหยุดใช้ยา (ตารางที่ 6)

ผลการศึกษาในสุกรที่ได้รับยา Sulfadiazine+Trimethoprim พบว่าชุดตรวจสอบ “CM-Test” สามารถให้ผลบวก 93-100 % ในตัวอย่างซีรัมตลอดระยะเวลาที่ศึกษาถึงวันที่ 7 หลังการหยุดใช้ยา และให้ผลบวก 100 % ในตัวอย่างปัสสาวะถึงวันที่ 4 หลังการหยุดใช้ยา ส่วนกลุ่มสุกรที่ได้รับยา Lincomycin + Spectinomycin, Tiamulin hydrogen fumarate และ Chortetracycline พบว่าชุดตรวจสอบ “CM-Test” สามารถให้ผลบวก 100 % ในตัวอย่างซีรัมและตัวอย่างปัสสาวะถึงวันที่ 2 หลังการหยุดใช้ยา (ตารางที่ 7)

ความน่าเชื่อถือของชุดตรวจสอบ “CM-Test” ในการตรวจหายาด้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างซีรัม ตัวอย่างเนื้อและตับจากไก่ซึ่งได้รับยาด้านจุลชีพและตัวอย่างซีรัมและปัสสาวะจากสุกรที่ได้รับยาด้านจุลชีพ เปรียบเทียบกับตัวอย่างซีรัมและปัสสาวะจากกลุ่มไก่และสุกรที่ไม่ได้รับยาด้านจุลชีพ คำนวนโดยใช้ผลการทดสอบตัวอย่าง 1 วันหลังจากหยุดให้ยา ผลการศึกษาพบว่าชุดตรวจสอบ “CM-Test” ในการตรวจหายาด้านจุลชีพตกค้างในไก่มีค่า Sensitivity (ความสามารถของชุดตรวจสอบในการให้ผลบวกถ้ามีการใช้ยาด้านจุลชีพในสัตว์) 93, 87, 99 % จากการตรวจในตัวอย่างซีรัม เนื้อและตับ ตามลำดับ ส่วนค่า Specificity (ความสามารถของชุดตรวจสอบในการให้ผลลบถ้ามีการไม่ใช้ยาด้านจุลชีพในสัตว์) พบว่าสูงถึง 100 % จากทั้ง 3 ชนิดตัวอย่างที่ตรวจ สำหรับค่า Sensitivity ของชุดตรวจสอบ “CM-Test” ในการตรวจหายาด้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างซีรัมและ

ปัสสาวะสุกรพบว่าสูงถึง 100 % ส่วนค่า Specificity เท่ากับ 93.3 และ 100 % ตามลำดับ (ตารางที่ 8, ตารางที่ 9 และตารางที่ 10)

จากผลของการศึกษานี้ แสดงว่าชุดตรวจสอบ “CM-Test” สามารถตรวจหายาต้านจุลชีพจากตัวอย่างซีรัม ปัสสาวะและตัวอย่างเนื้อได้ดีมากโดยเฉพาะในขณะที่สัตว์ยังได้รับยาต้านจุลชีพอยู่หรือหลังจากการหยุดให้ยา 1 วัน ซึ่งแม้ชุดตรวจสอบ “CM-Test” ไม่สามารถให้ผลบวกในการตรวจหายาต้านจุลชีพในวันถัดมาก็ตามแต่โดยทฤษฎีของระยะเวลาหยุดยา (Withdrawal period) จะมีการเผื่อเวลาเพื่อให้เนื้อสัตว์ปลอดยาต้านจุลชีพก่อนทำการแปรรูปสู่ผู้บริโภค ดังนั้น อาจจะต้องมีการศึกษาเปรียบเทียบกับการใช้ชุดตรวจสอบ “CM-Test” กับวิธีการตรวจหายาต้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างเนื้ออื่นๆ ที่มี Detection limits ดีกว่า เช่น วิธีการของ Charm-II Test หรือวิธีการของ High-performance liquid chromatography (HPLC) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม จุดเด่นของชุดตรวจสอบ “CM-Test” คือ สามารถตรวจหายาต้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างซีรัมและปัสสาวะได้ดีมาก ซึ่งปัจจุบันฟาร์มไก่เนื้อเพื่อการส่งออกจะต้องส่งตัวอย่างเนื้อไก่และฟาร์มสุกรเพื่อการส่งออกจะต้องส่งตัวอย่างซีรัมเพื่อตรวจหายาต้านจุลชีพก่อนการส่งไปยังโรงงานแปรรูปเนื้อสัตว์ล่วงหน้า 7 วัน ดังนั้น ชุดตรวจสอบ “CM-Test” จึงน่าจะเป็นทางเลือกในการตรวจสอบการตกค้างของยาต้านจุลชีพในสัตว์ขณะที่มีชีวิตในฟาร์มก่อนส่งเข้าโรงงานแปรรูปเนื้อสัตว์ และที่สำคัญคือ สามารถดำเนินการทดสอบที่ฟาร์มได้โดยไม่ต้องส่งไปยังห้องปฏิบัติการในส่วนกลาง

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบยาต้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างซีรัม และตัวอย่างปัสสาวะไม่ได้อยู่ในแผนการวิจัยที่เสนอแต่แรก แต่เนื่องจากผู้วิจัยได้รับทราบโจทย์จากผู้ประกอบการฟาร์มปศุสัตว์ในระยะเวลาที่ทำการทดสอบชุดตรวจสอบ “CM-Test” ในภาคสนามว่ามีวิธีการเฝ้าระวังปัญหาต้านจุลชีพตกค้างในสัตว์ที่ใช้เป็นอาหารก่อนส่งไปยังโรงงานฆ่าสัตว์และ/หรือโรงงานแปรรูปเนื้อสัตว์โดยไม่ต้องทำการฆ่าสัตว์ที่ฟาร์มได้หรือไม่ ดังนั้น แผนการวิจัยจึงได้เพิ่มการวิจัยในการตรวจสอบหาต้านจุลชีพในตัวอย่างซึ่งได้จากสัตว์ในขณะที่มีชีวิตคือ ตัวอย่างซีรัมจากไก่และสุกร รวมทั้งตัวอย่างปัสสาวะจากสุกร (ตารางที่ 6, 7, 8, 9 และ 10) ซึ่งพบว่าทั้งนี้ ในการส่งออกเนื้อสุกรของประเทศไทยได้มีการตรวจซีรัมเพื่อหาต้านจุลชีพตกค้างในสุกรมีชีวิต 7 วันก่อนส่งโรงงาน ฆ่าสัตว์และ/หรือโรงงานแปรรูปเนื้อสัตว์โดยใช้วิธี Microbial inhibitor assay ในงานเพาะเชื้อซึ่งดัดแปลงจากวิธีการ European Four Plate (EFPT) อยู่แล้ว การวิจัยในขั้นต่อไปจึงควรทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจหาต้านจุลชีพตกค้างในซีรัมและในปัสสาวะเทียบกับวิธี EFPT อย่างไรก็ตามหากประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ “CM-Test” ใกล้เคียงกับวิธี EFPT แต่ชุดตรวจสอบ “CM-Test” ใช้เวลาน้อยกว่ามากทั้งในเรื่องการเตรียมงานในห้องปฏิบัติการและระยะเวลาในการทราบผลการตรวจ

สำหรับความน่าเชื่อถือของชุดตรวจสอบ “AM-Test” ในการตรวจหาต้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างน้ำนมมิได้ดำเนินการศึกษา เนื่องจาก ระยะเวลาและงบประมาณที่จำกัด แต่คณะผู้วิจัยมีความเชื่อมั่นว่าไม่แตกต่างจากการศึกษาที่ได้เคยดำเนินการมาแล้วในการทดสอบชุดตรวจสอบ

“KS-9” นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยได้ส่งชุดตรวจสอบ “AM-Test” ให้สหกรณ์โคนมต่างๆ กว่า 20 แห่งทำการทดลองใช้กว่า 6 เดือน ซึ่งผลตอบรับก็เป็นที่น่าพอใจมากซึ่งคณะผู้วิจัยได้เสนอข้อมูลในส่วนนี้ในรายงานฉบับนี้ด้วย

การทดสอบใช้ชุดตรวจสอบ “CM-Test” ในการตรวจหายาด้านจุลชีพตกค้างในเนื้อไก่และเนื้อสุกรที่จำหน่ายในตลาดสดและซูเปอร์มาร์เก็ตในเขตกรุงเทพมหานคร

ชุดตรวจสอบ “CM-Test” สามารถตรวจพบการตกค้างของยาด้านจุลชีพในตัวอย่างเนื้อไก่ได้ 12.3 % (37 ตัวอย่าง) ซึ่งดีกว่าการใช้วิธี EFPT และ MIDA มาก เนื่องจาก 2 วิธีหลังสามารถตรวจพบการตกค้างของยาด้านจุลชีพในตัวอย่างเนื้อไก่ได้เพียง 0 และ 1.7 % (5 ตัวอย่าง) ตามลำดับ เช่นเดียวกับการตรวจหายาด้านจุลชีพตกค้างของยาด้านจุลชีพในตัวอย่างเนื้อสุกร “CM-Test” สามารถตรวจพบการตกค้างของยาด้านจุลชีพในตัวอย่างเนื้อสุกรได้ 9.3 % (28 ตัวอย่าง) ในขณะที่วิธีการ EFPT และ MIDA สามารถตรวจพบการตกค้างของยาด้านจุลชีพในตัวอย่างเนื้อสุกรได้เพียง 2 % (6 ตัวอย่าง) และ 2.7 % (8 ตัวอย่าง) ตามลำดับ (รูปที่ 7) แสดงว่าชุดตรวจสอบ “CM-Test” มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบหายาด้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างเนื้อไก่และเนื้อสุกรได้ดีกว่าวิธีการ EFPT และ MIDA

เมื่อทำการตรวจสอบยืนยันตัวอย่างเนื้อไก่และเนื้อสุกรที่ให้ผลบวกจากการตรวจด้วย “CM-Test” โดยวิธี Charm-II Test™ เพื่อตรวจสอบว่าเป็นกลุ่มยา Beta-lactams, Tetracyclines และ/หรือ Sulfonamides พบว่าเป็นการตกค้างของยาด้านจุลชีพในกลุ่ม Sulfonamides 58.6 และ 38.1 % ในตัวอย่างเนื้อไก่และเนื้อสุกร ตามลำดับ และยาในกลุ่ม Tetracyclines ร่วมกับ Sulfonamides ในตัวอย่างเนื้อสุกร 52.4 % ทั้งนี้ ตัวอย่างที่ตรวจไม่พบกลุ่มยาดังกล่าวอาจอนุมานได้ว่าเป็นกลุ่มยาอื่นนอกซึ่งไม่ได้ทำการตรวจ เช่น ยาในกลุ่ม Aminoglycosides, Fluoroquinolones, Lincosamides และ Macrolides เป็นต้น

ทั้งนี้ความชุกของยาด้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างเนื้อไก่และเนื้อสุกรจากผลการศึกษาพบว่าต่ำกว่าในปี พ.ศ. 2541 มากซึ่งเป็นการสำรวจด้วยชุดตรวจสอบ “KS-9S” โดยตรวจพบยาด้านจุลชีพตกค้างถึง 26 และ 52 % ในตัวอย่างเนื้อไก่และเนื้อสุกรที่สุ่มจากตลาดในเขตกรุงเทพมหานคร ตามลำดับ (เกรียงศักดิ์ สายธนูและคณะ, 2543) แนวโน้มของการตกค้างของยาด้านจุลชีพที่ลดลงน่าจะเนื่องจากการได้มีการรณรงค์การใช้ยาด้านจุลชีพในการเลี้ยงสัตว์อย่างเหมาะสมรอบคอบเพิ่มขึ้น รวมทั้งผู้ประกอบการฟาร์มคงมีเข้าใจดีขึ้นในเรื่องการหยุดยาก่อนจำหน่ายสัตว์ออกจากฟาร์ม

ชุดตรวจสอบหายาด้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างเนื้อเป็ด “CM-Test” มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบหายาด้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างเนื้อไก่และเนื้อสุกรได้ดีกว่าวิธีการ EFPT และ MIDA ซึ่งใช้ในการตรวจสอบเป็ดสดในปัจจุบัน นอกจากนี้ ชุดตรวจสอบ “CM-Test” ยังมีค่าใช้จ่ายที่ถูกลงกว่าและสามารถรู้ผลการตรวจได้รวดเร็วกว่า

การทดสอบใช้ชุดตรวจสอบ “AM-Test” และชุดตรวจสอบ “CM-Test” ในการตรวจหายาต้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างน้ำนม ตัวอย่างเนื้อไก่และเนื้อสุกรในฟาร์มปศุสัตว์

ฟาร์มโคนมอุดมฟาร์ม จ.สระบุรี และฟาร์มโคนมของสถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขต กาศสินธุ์ จ.กาฬสินธุ์ ได้ทำการทดลองใช้ชุดตรวจสอบ “AM-Test” ในการตรวจสอบตัวอย่างน้ำนมที่ ฟาร์ม โดยทั้ง 2 ฟาร์มได้รับแท่นให้ความร้อน (Heater block) เพื่อการทดลองใช้ด้วย พบว่าสามารถ ทำการใช้ชุดตรวจสอบได้โดยไม่ยากและมีความน่าเชื่อถือสูงโดยน้ำนมดิบที่ผ่านการตรวจด้วย ชุดตรวจสอบ “AM-Test” ไม่ถูกตีกลับจากบริษัทผู้รับซื้อน้ำนมดิบ

สำหรับบริษัท สหฟาร์ม จำกัด จ.ลพบุรี ได้ทำการทดลองใช้ชุดตรวจสอบ “CM-Test” ในการ ตรวจสอบตัวอย่างเนื้อไก่ที่ทดลองให้ยาด้านจุลชีพ Gallimycin, Colistin, Apramycin, Amoxycillin และ Ampromilium เพื่อหาระยะเวลาหยุดยาที่เหมาะสมโดยเปรียบเทียบกับวิธี European four plate test (EFPT) ซึ่งจากรายงานการศึกษาพบว่าชุดตรวจสอบ “CM-Test” มีประสิทธิภาพและความ สะดวกใช้มากกว่ามากดังรายงานการเปรียบเทียบผลการตรวจด้วยชุดตรวจสอบ “CM-Test” และวิธี EFPT (ตารางที่ 11) และถ้าใช้ข้อมูลนี้ในการคำนวณค่าความน่าเชื่อถือของชุดตรวจสอบ “CM-Test” จะพบว่ามีความน่าเชื่อถือดีกว่าวิธี EFPT มาก

ส่วนบริษัท แกมเปียน ฟูดส์ จำกัด จ.ชลบุรี ซึ่งมีฟาร์มในเครือข่ายประมาณ 2,000 ฟาร์ม มีจำนวนไก่รวมประมาณ 7,000,000 ตัวในความรับผิดชอบของบริษัทโดยส่วนใหญ่อยู่ในเขตภาค ตะวันออกได้ทำการทดลองใช้ชุดตรวจสอบ “CM-Test” ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของยาด้าน จุลชีพในตัวอย่างอาหารสัตว์ระยะสุดท้าย (อาหารไก่ที่ให้ในระยะสุดท้ายคือ ประมาณ 3 สัปดาห์ก่อน ส่งโรงงานฆ่าสัตว์จะต้องปลอดจากยาด้านจุลชีพและยากันบิด) เพื่อป้องกันการตกค้างของยาด้าน จุลชีพก่อนส่งไก่ไปโรงงานแปรรูปเนื้อไก่ โดยทำตามคำแนะนำของผู้วิจัยในการสกัดยาด้านจุลชีพ จากตัวอย่างอาหารสัตว์ด้วยการเขย่ากับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 หรือ 1:2 (น้ำหนัก:ปริมาตร) แล้ว ใช้น้ำจากการสกัดตัวอย่างอาหารสัตว์ 0.1 มิลลิลิตร หยดลงในหลอดชุดตรวจสอบโดยตรง หรือถ้า น้ำจากการสกัดตัวอย่างอาหารสัตว์มีสภาพเป็นกรด pH ต่ำกว่า 5 ก็แนะนำให้ใช้กระดาษกรอง เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร จุ่มน้ำจากการสกัดตัวอย่างอาหารสัตว์แล้ววางลงในหลอดทดสอบ ทำการอบเพาะที่ 65 ± 1 องศาเซลเซียส และอ่านผลเช่นเดียวกันกับวิธีการใช้ชุดตรวจสอบ “CM-Test” ในการตรวจหายาด้านจุลชีพในตัวอย่างเนื้อ ซึ่งบริษัท แกมเปียน ฟูดส์ จำกัด ได้ใช้ ชุดตรวจสอบ “CM-Test” ในการตรวจสอบตัวอย่างอาหารสัตว์ระยะสุดท้ายมาตั้งแต่เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2545 จนปัจจุบัน และผลการใช้ชุดตรวจสอบ “CM-Test” พบว่าอาหารไก่อระยะสุดท้ายบาง รุ่นการผลิตมีการปนเปื้อนของสารต้านจุลชีพ ดังนั้น ผลจากการเฝ้าระวังของบริษัท แกมเปียน ฟูดส์ จำกัด ส่งผลให้บริษัทที่ส่งอาหารไก่ให้กับบริษัท แกมเปียน ฟูดส์ จำกัด ได้มีการดำเนินการ ตรวจสอบและส่งหัวอาหาร (Premix) มาให้ทางคณะผู้วิจัยตรวจสอบซึ่งผลการตรวจสอบพบว่าให้ ผลบวก (ตารางที่ 12) ซึ่งน่าจะเกิดจากยากันบิด (Coccidiostat) และ/หรือยาด้านจุลชีพเพื่อเร่ง

การเจริญเติบโต (Growth promoter) ปนเปื้อนในอาหารเนื่องจากชุดตรวจสอบ “CM-Test” มีความไวรับต่อยากันบิตและยาต้านจุลชีพเพื่อเร่งการเจริญเติบโตได้ดีมากเช่นกัน (ตารางที่ 13)

ฟาร์มสุกรของสถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตกาฬสินธุ์ กาฬสินธุ์ ได้ทำการทดลองใช้ชุดตรวจสอบ “CM-Test” ในการตรวจสอบตัวอย่างเนื้อสุกร ดับและไตที่โรงงานฆ่าสัตว์ ได้รายงานว่าวิธีการใช้ชุดตรวจสอบ “CM-Test” สามารถปฏิบัติได้ไม่ยากและการเปลี่ยนแปลงของสีของชุดตรวจสอบก็อ่านผลได้ง่าย

ส่วนฟาร์มไก่เนื้อของคุณสุกร จ.ราชบุรี ฟาร์มไก่เนื้อของบริษัท เอ็ม เค เอส ฟาร์ม จำกัด จ. ชลบุรี และฟาร์มสุกรจากกิตติวัฒน์ฟาร์ม จ.เชียงใหม่ ได้ส่งตัวอย่างเนื้อและตับจากโรงเรือนที่หยุดการเลี้ยง 7 วันก่อนส่งโรงงานฆ่าสัตว์และแปรรูปเนื้อสัตว์มายังห้องปฏิบัติการวิจัยของคุณะผู้วิจัยเพื่อตรวจสอบยาต้านจุลชีพก็พบว่าให้ผลลบต่อชุดตรวจสอบ “CM-Test” และไก่เนื้อของฟาร์มก็สามารถผ่านการตรวจสอบจากกรมปศุสัตว์และสามารถส่งออกได้ทั้งหมด

นอกจากนี้ โครงการเนื้อสุกรอนามัยของจังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดขอนแก่นซึ่งใช้ห้องปฏิบัติการของคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่และมหาวิทยาลัยขอนแก่นตามลำดับ ก็ได้ใช้ชุดตรวจสอบ “CM-Test” ในการตรวจสอบตัวอย่างเนื้อสุกรของฟาร์มที่เข้าร่วมโครงการ “เนื้อสุกรอนามัย” ก็ไม่พบว่ามีปัญหาในการใช้ชุดตรวจสอบแต่อย่างใด

การทดสอบใช้ชุดตรวจสอบ “AM-Test” ในการตรวจหายาด้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างน้ำนมโดยสหกรณ์โคนม

สหกรณ์โคนม 12 แห่งซึ่งเกือบทั้งหมดเคยเป็นผู้ใช้ชุดตรวจสอบยาต้านจุลชีพตกค้างในน้ำนมโค “KS-9” ซึ่งเป็นชุดตรวจสอบยาต้านจุลชีพตกค้างในน้ำนมโคชุดแรกของคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยจากการวิจัยของ รศ.นสพ.ดร. เกรียงศักดิ์ สายธนู และรศ.นสพ.ดร. ธงชัย เฉลิมชัยกิจ ที่ได้ผลิตเพื่อการวิจัยและพัฒนาโดยทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และมีรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ในปี พ.ศ. 2542 โดยสหกรณ์โคนม 12 แห่งได้ทำการทดสอบใช้ชุดตรวจสอบ “AM-Test” เป็นระยะเวลา 8 เดือน (มีนาคม-ตุลาคม พ.ศ. 2545) ได้แสดงความคิดเห็นที่พึงพอใจจากการสำรวจความคิดเห็นตามแบบสอบถามต่อวิธีการใช้ชุดตรวจสอบ ระยะเวลาในอบเพาะชุดตรวจสอบ ความยากง่ายในการอ่านผลทดสอบ และอุปกรณ์ที่ให้ไว้พร้อมชุดตรวจสอบ “AM-Test”

การพัฒนาอุปกรณ์แทนให้ความร้อน (Heater block)

วัตถุประสงค์ของการจัดทำอุปกรณ์แทนให้ความร้อน (Heater block) ก็เพื่อให้ผู้ประกอบการฟาร์มปศุสัตว์ ตลอดจนหน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับความปลอดภัยของอาหารในส่วนภูมิภาคหรือท้องถิ่นที่ยังไม่สามารถมีห้องปฏิบัติการด้านจุลชีววิทยาสามารถทำการทดสอบหายาด้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างน้ำนม ชีวรั่ว ปัสสาวะ และเนื้อสัตว์ได้ ดังนั้น แทนให้ความร้อนที่จัดทำขึ้นจะต้องมีประสิทธิภาพทัดเทียมกับผลิตภัณฑ์ของต่างประเทศ แต่มีต้นทุนหรือราคาจำหน่ายที่ผู้ประกอบการ

และหน่วยงานที่มีงบประมาณจำกัดสามารถจัดซื้อได้โดยไม่เกิน 4,000 บาท คณะผู้วิจัยได้มีโอกาสรู้จักกับคุณวิรุทธิ์ ปล้องใหม่ วิศวกรไฟฟ้าที่สามารถจัดทำอุปกรณ์แทนให้ความร้อน และในที่สุดก็สามารถทำการผลิตอุปกรณ์แทนให้ความร้อนที่มีความคงที่ของอุณหภูมิ 65 ± 1 องศาเซลเซียสสำหรับอบเพาะหลอดทดสอบถึงจำนวน 15 หลอด มากกว่าอุปกรณ์แทนให้ความร้อนของ Delvotest ซึ่งสามารถอบเพาะหลอดทดสอบเพียง 10 หลอด โดยอุปกรณ์แทนให้ความร้อนที่จัดทำขึ้นมีต้นทุนการผลิตเพียง 3,200 บาท (รูปที่ 8)

ศิลปวิทยาที่เกี่ยวข้องกับชุดตรวจสอบ “AM-Test” และชุดตรวจสอบ “CM-Test”

การตรวจสอบเบื้องต้นในการหาสารต้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างน้ำมันและตัวอย่างเนื้อโดยใช้หลักการการยับยั้งการแบ่งตัวของแบคทีเรีย *Geobacillus stearothermophilus* และ/หรือ *Bacillus subtilis* และ/หรือ *Micrococcus luteus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย เช่น วิธี Microbial Inhibition Disk Assay (MIDA) ในการตรวจหายาด้านจุลชีพ ตกค้างในน้ำมันโค และวิธี European Four Plate Test (EFPT) ในการตรวจหายาด้านจุลชีพตกค้าง ตัวอย่างเนื้อสัตว์ แต่เนื่องจากวิธี MIDA และวิธี EFPT มีความยุ่งยากในการเตรียมเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อทุกครั้งที่จะทำการทดสอบหาสารต้านจุลชีพตกค้าง และต้องใช้เวลาในการอบเพาะ จานเพาะเชื้อนาน 18-24 ชั่วโมง จึงจะสามารถอ่านผลการตรวจได้ ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาชุด ตรวจสอบหายาด้านจุลชีพตกค้างในน้ำมันโคโดยใช้หลักการ Tube diffusion method ซึ่งใช้เชื้อ *Geobacillus stearothermophilus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่บรรจุในหลอดพลาสติกมาใช้ในการ ตรวจสอบหายาด้าน จุลชีพตกค้างในน้ำมันโคโดยสามารถรู้ผลการตรวจภายในเวลาประมาณ 3-3½ ชั่วโมง หลังจากการอบเพาะที่อุณหภูมิ 64 ± 1 องศาเซลเซียส ชุดตรวจสอบดังกล่าวคือ ชุดตรวจสอบ Delvotest[®] SP (DSM Food Specialties, ประเทศเนเธอร์แลนด์) ซึ่งได้จดสิทธิบัตรในประเทศสหรัฐอเมริกาเลขที่สิทธิบัตร US 4, 946, 777

สำหรับการพัฒนาชุดตรวจสอบยาด้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างน้ำมันและในตัวอย่างเนื้อสัตว์ในประเทศไทยซึ่งใช้หลักการการยับยั้งการแบ่งตัวของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่บรรจุในหลอดพลาสติกมีดังต่อไปนี้ คือ

(1) ชุดตรวจสอบยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำมันโค “KS-9” ซึ่งพัฒนาโดยคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สามารถรู้ผลการตรวจภายในเวลา 2½-3½ ชั่วโมง (เกรียงศักดิ์ และธงชัย, 2541)

(2) ชุดตรวจสอบยาด้านจุลชีพตกค้างในเนื้อไก่และสุกร “KS-9S” ซึ่งพัฒนาโดยคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สามารถรู้ผลการตรวจภายในเวลา 3½-4½ ชั่วโมง (เกรียงศักดิ์และธงชัย, 2543)

(3) ชุดตรวจสอบยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำมันโคและเนื้อสัตว์ ซึ่งพัฒนาโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข สามารถรู้ผลการตรวจภายในเวลา 3½-4½ ชั่วโมง (เอกสาร

แผ่นพับประชาสัมพันธ์ ชุดตรวจสอบยาปฏิชีวนะตกค้างในนํ้านมโคและเนื้อสัตว์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข)

ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นในประเทศไทยทั้ง 3 ชนิดดังกล่าวมีสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันและแตกต่างจากชุดตรวจสอบ Delvotest[®] SP แต่ลักษณะของชุดตรวจสอบ KS-9 และ KS-9S บรรจุในหลอดพลาสติก (Polypropylene) เหมือนกับชุดตรวจสอบ Delvotest[®] SP ส่วนชุดตรวจสอบของโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข บรรจุในหลอดพลาสติกสำหรับเก็บตัวอย่างที่ใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการที่มีชื่อเรียกว่า หลอด Eppendorf

สำหรับชุดตรวจสอบตามการประดิษฐ์นี้สามารถใช้ทำการตรวจหาสารต้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างนํ้านม เนื้อสัตว์ ซีรัม และปัสสาวะ นอกจากนี้ ยังมีข้อแตกต่างจากชุดตรวจสอบที่กล่าวมาข้างต้นคือ วิธีการในการเตรียมสปอร์ของเชื้อ *Geobacillus stearothermophilus* และส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งระยะเวลาในการอ่านผลการตรวจ (ตารางที่ 14)

สรุป

ผลจากการวิจัย สามารถพัฒนาชุดตรวจสอบเบื้องต้น (Screening test kit) ในการตรวจหาสารต้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างนํ้านม เนื้อสัตว์ ซีรัมและปัสสาวะ โดยอาศัยหลักการการยับยั้งการแบ่งตัวของแบคทีเรีย จีโอบาซิลลัส สเตียโรเทอร์โมฟิลัส (*Geobacillus stearothermophilus* ATCC 10149) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมรวมปริมาณ 0.3 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในหลอดที่เตรียมจากวัสดุ Polypropylene ขนาดประมาณ 10 x 40 มิลลิเมตร (เส้นผ่าศูนย์กลาง x ส่วนสูง) วิธีการตรวจหาสารต้านจุลชีพตกค้างโดยทำการหยอดตัวอย่างนํ้านม หรือวางแผ่นกระดาษกรองซึ่งชุ่มด้วยตัวอย่างนํ้าเนื้อสัตว์ หรือตัวอย่างซีรัมและปัสสาวะลงในหลอดชุดตรวจสอบ สามารถอ่านผลการตรวจหลังจากการอบเพาะชุดตรวจสอบที่อุณหภูมิ 65 ± 1 องศาเซลเซียส นานประมาณ 2–3 ชั่วโมง โดยดูการเปลี่ยนแปลงของสีในหลอดชุดตรวจสอบ ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดชุดตรวจสอบเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองแสดงว่าตัวอย่างที่ทำการตรวจไม่มีสารต้านจุลชีพตกค้างหรือมีในปริมาณที่ต่ำกว่าความสามารถของชุดตรวจสอบที่จะตรวจพบได้ (Detection limits) แต่ถ้าตัวอย่างที่ตรวจมีสารต้านจุลชีพตกค้างสีของอาหารเลี้ยงเชื้อในชุดตรวจสอบจะยังคงมีสีม่วง

ด้วยวิธีการที่ง่ายและไม่ต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาแพงแต่มีประสิทธิภาพและความน่าเชื่อถือสูง ดังนั้น ชุดตรวจสอบเบื้องต้นในการตรวจหาสารต้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างนํ้านม “AM-Test” ในตัวอย่างเนื้อสัตว์ ซีรัมและปัสสาวะ “CM-Test” จะสามารถช่วยให้เกิดระบบการเฝ้าระวังยาต้าน จุลชีพตกค้างในอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากสัตว์ในประเทศไทยที่มีประสิทธิภาพและเป็นรูปธรรมที่สามารถปฏิบัติอย่างกว้างขวางทั้งในห้องปฏิบัติการและในภาคสนาม

ตารางที่ 3 ความสามารถของชุดตรวจสอบ “AM-Test” ในการตรวจสอบหายาด้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างน้ำนมโค (Detection limits, ppm)

ยาด้านจุลชีพ	ความเข้มข้นของยา (ppm) ⁽¹⁾		MLR (ppm) ในน้ำนม ⁽²⁾
	ผล ±	ผล +	
Ampicillin	0.008	0.01	0.004
Amoxicillin	0.008	0.01	0.004
Cloxacillin	0.01	0.02	0.03
Penicillin G	0.008	0.01	0.004
Streptomycin	0.1	0.2	0.2
Gentamicin	0.2	0.4	0.1
Kanamycin	1.0	2.0	0.15
Erythromycin	0.1	0.2	0.04
Tetracycline	0.1	0.2	0.1
Oxytetracycline	0.1	0.2	0.1
Chlortetracycline	0.2	0.4	0.1
Sulfadiazine	0.1	0.2	0.1
Sulfathiazole	0.1	0.2	0.1
Sulfamethazine	0.1	0.2	0.1

⁽¹⁾ ให้ผล ± หมายถึง “AM-Test” ให้ผลบวกไม่ 100 % ในการทดสอบซ้ำ
ให้ผล + หมายถึง “AM-Test” ให้ผลบวก 100 % ในการทดสอบซ้ำ

⁽²⁾ MRL (Maximum Residue Limits) คือ ปริมาณยาสูงสุดที่ยอมรับให้มีการตกค้าง
(CODEX Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs in Foods; CONSOLIDATED
VERSION of the Annexes I to IV of Council Regulation n^o 2377/90 (December 2000)

ตารางที่ 4 ความสามารถของชุดตรวจสอบ “CM-Test” ในการตรวจสอบหาต้านจุลชีพตกค้าง
ในตัวอย่างน้ำเนื้อไก่ (Detection limits, ppm)

ยาต้านจุลชีพ	ความเข้มข้นของยา (ppm) ⁽¹⁾		MLR (ppm) ในเนื้อสัตว์ ⁽²⁾
	ผล ±	ผล +	
Penicillin	0.005	0.008	0.05
Ampicillin	0.008	0.01	0.05
Amoxicillin	0.005	0.01	0.05
Cloxacillin	0.2	0.025	0.3
Chloramphenicol	9	10	0 (ไม่ได้กำหนด)
Enrofloxacin	5-7	8	0.1
Norfloxacin	7	8	0 (ไม่ได้กำหนด)
Gentamicin	0.5 – 0.7	0.8	0.05
Kanamycin	1-1.5	2	0.1
Erythromycin	1	2	0.2
Chlortetracycline	0.8-1	1.5	0.1
Tetracycline	0.2	0.3	0.1
Oxytetracycline	0.4 – 0.7	0.8	0.1
Sulfamethazine	0.2-0.4	0.5	0.1
Sulfathiazole	0.1	0.2	0.1
Sulfadiazine	0.2- 0.4	0.2	0.1
Trimethoprim	0.2	0.3	0.05
Furazolidone	4	5	0 (ไม่ได้กำหนด)
Furaltadone	10-11	12	0 (ไม่ได้กำหนด)
Nitrofurazone	4	5	0 (ไม่ได้กำหนด)
Nitrofurantoin	2-4	5	0 (ไม่ได้กำหนด)

⁽¹⁾ ให้ผล ± หมายถึง “CM-Test” ให้ผลบวกไม่ 100 % ในการทดสอบซ้ำ
ให้ผล + หมายถึง “CM-Test” ให้ผลบวก 100 % ในการทดสอบซ้ำ

⁽²⁾ MRL (Maximum Residue Limits) คือ ปริมาณยาสูงสุดที่ยอมรับให้มีการตกค้าง
(CODEX Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs in Foods; CONSOLIDATED
VERSION of the Annexes I to IV of Council Regulation n^o 2377/90; December 2000)
เนื้อสัตว์ หมายถึง เนื้อสุกร และ/หรือเนื้อไก่ และ/หรือเนื้อโค-แพะ-แกะ

ตารางที่ 5 ความสามารถของชุดตรวจสอบ “CM-Test” ในการตรวจสอบหาต้านจุลชีพตกค้าง
ในตัวอย่างน้ำเนื้อสุกร (Detection limits, ppm)

ยาต้านจุลชีพ	ความเข้มข้นของยา (ppm) ⁽¹⁾		MLR (ppm) ในเนื้อสัตว์ ⁽²⁾
	ผล ±	ผล +	
Penicillin	0.005	0.008	0.05
Ampicillin	0.008	0.01	0.05
Amoxicillin	0.005	0.01	0.05
Cloxacillin	0.01	0.015	0.3
Chloramphenicol	9	10	0 (ไม่ได้กำหนด)
Enrofloxacin	6	7	0.1
Norfloxacin	8-9	10	0 (ไม่ได้กำหนด)
Gentamicin	0.25 – 0.5	0.6	0.05
Kanamycin	1	1.5	0.1
Erythromycin	0.5	1	0.2
Chlortetracycline	0.7	0.8	0.1
Tetracycline	0.3	0.4	0.1
Oxytetracycline	0.2 – 0.4	0.5	0.1
Sulfamethazine	0.15	0.2	0.1
Sulfathiazole	0.1	0.15	0.1
Sulfadiazine	0.2- 0.4	0.5	0.1
Trimethoprim	0.4	0.5	0.05
Furazolidone	7	8	0 (ไม่ได้กำหนด)
Furaltadone	11	12	0 (ไม่ได้กำหนด)
Nitrofurazone	5	6	0 (ไม่ได้กำหนด)
Nitrofurantoin	5	5	0 (ไม่ได้กำหนด)

⁽¹⁾ ให้ผล ± หมายถึง “CM-Test” ให้ผลบวกไม่ 100 % ในการทดสอบซ้ำ
ให้ผล + หมายถึง “CM-Test” ให้ผลบวก 100 % ในการทดสอบซ้ำ

⁽²⁾ MRL (Maximum Residue Limits) คือ ปริมาณยาสูงสุดที่ยอมรับให้มีการตกค้าง
(CODEX Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs in Foods; CONSOLIDATED
VERSION of the Annexes I to IV of Council Regulation n^o 2377/90; December 2000)
เนื้อสัตว์ หมายถึง เนื้อสุกร และ/หรือเนื้อไก่ และ/หรือเนื้อโค-แพะ-แกะ

ตารางที่ 6 ผลการตรวจยาด้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างซีรัม และเนื้อเยื่อของไก่ที่ได้รับยาด้านจุลชีพผสมในน้ำ 1 วัน (ในขนาดเพื่อการป้องกันโรค) โดยใช้ชุดตรวจสอบ “CM-Test” (รายงานเป็น % ของชุดตรวจสอบที่ให้ผลบวกจากการศึกษาในไก่ 20 ตัวต่อยาและทำการทดสอบตัวอย่างละ 5 ซ้ำ)

ยาละลายน้ำ	ชนิดตัวอย่างที่ตรวจ	ระยะเวลาที่เก็บตัวอย่างหลังจากการใช้ยา			
		1 วัน	3 วัน	4 วัน	6 วัน
Sulfadiazine + Trimethoprim	ซีรัม	100	100	25	0
	กล้ามเนื้อ	100	100	0	0
	ตับ	100	100	90	0
Colistin + Amoxycilin	ซีรัม	88	0	0	0
	กล้ามเนื้อ	88	0	0	0
	ตับ	100	0	0	0
Norfloxacin	ซีรัม	84	100	25	0
	กล้ามเนื้อ	100	100	0	0
	ตับ	96	0	0	0
Erythromycin	ซีรัม	100	0	0	0
	กล้ามเนื้อ	60	0	0	0
	ตับ	100	0	0	0
กลุ่มควบคุม (ไม่ได้ให้ยา)	ซีรัม	0	0	0	0
	กล้ามเนื้อ	0	0	0	0
	ตับ	0	0	0	0

ตารางที่ 7 ผลการตรวจยาด้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างซีรัม ปัสสาวะและเนื้อเยื่อของสุกรที่ได้รับ ยาด้านจุลชีพผสมในอาหาร 1 วัน (ในขนาดเพื่อการป้องกันโรค) โดยใช้ชุดตรวจสอบ “CM-Test” (รายงานเป็น % ของชุดตรวจสอบที่ให้ผลบวกจากการศึกษาในสุกร 3 ตัว ต่อยาและทำการทดสอบตัวอย่างละ 5 ซ้ำ)

ยาผสมอาหาร	ชนิดตัวอย่าง ที่ตรวจ	ระยะเวลาที่เก็บตัวอย่างหลังจากการใช้ยา			
		0 วัน	2 วัน	4 วัน	7 วัน
Sulfadiazine + Trimethoprim	ซีรัม	100	100	93	100
	ปัสสาวะ	100	100	100	53
	กล้ามเนื้อ	-	-	-	0
	ตับ	-	-	-	67
	ไต	-	-	-	0
Lincomycin + Spectinomycin	ซีรัม	100	100	67	87
	ปัสสาวะ	100	100	40	13.3
	กล้ามเนื้อ	-	-	-	0
	ตับ	-	-	-	0
	ไต	-	-	-	0
Tiamulin hydrogen fumarate	ซีรัม	100	100	87	100
	ปัสสาวะ	100	100	67	6.7
	กล้ามเนื้อ	-	-	-	13.3
	ตับ	-	-	-	0
	ไต	-	-	-	67
Chortetracycline	ซีรัม	100	100	60	0
	ปัสสาวะ	-	-	-	-
	กล้ามเนื้อ	-	-	-	-
	ตับ	-	-	-	-
	ไต	-	-	-	-
กลุ่มควบคุม (ไม่ได้ให้ยา)	ซีรัม	6.7	13.3	0	0
	ปัสสาวะ	0	20	0	0
	กล้ามเนื้อ	0	0	0	0
	ตับ	0	0	0	0
	ไต	0	0	0	0

- = ไม่ได้ทำการเก็บตัวอย่าง

ตารางที่ 8 ผลการตรวจยาด้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างซีรัม และเนื้อเยื่อของไก่โดยใช้ชุดตรวจสอบ “CM-Test” เก็บตัวอย่างหลังจากไก่ได้รับยาด้านจุลชีพผสมในน้ำในขนาดเพื่อการป้องกันโรค 1 วัน (ทำการศึกษาในไก่ 5 ตัวต่อยาและทำการทดสอบตัวอย่างละ 5 ซ้ำ)

ชนิดตัวอย่าง ที่ตรวจ	ยาละลายน้ำให้ไก่กิน				
	SDZ+TMP	COL+AMX	NFX	EMC	ไม่ได้ให้ยา
ซีรัม	25 (100 %)	22 (88 %)	21 (84 %)	25 (100 %)	0
กล้ามเนื้อ	25 (100 %)	22 (88 %)	25 (100 %)	15 (60 %)	0
ตับ	25 (100 %)	25 (100 %)	24 (96 %)	25 (100 %)	0

SDZ+TMP = Sulfadiazine + Trimethoprim NFX = Norfloxacin
COL+AMX = Colistin + Amoxycilin EMC = Erythromycin

ตารางที่ 9 ผลการตรวจยาด้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างซีรัม และปัสสาวะของสุกรโดยใช้ชุดตรวจสอบ “CM-Test” เก็บตัวอย่างหลังจากสุกรได้รับยาด้านจุลชีพผสมในอาหารในขนาดเพื่อการป้องกันโรค 1 วัน (ทำการศึกษาในสุกร 3 ตัวต่อยาและทำการทดสอบตัวอย่างละ 5 ซ้ำ)

ชนิดตัวอย่าง ที่ตรวจ	ยาผสมในอาหารสุกร				
	SDZ+TMP	LCM+SPM	TML	CTC	ไม่ได้ให้ยา
ซีรัม	15 (100 %)	15 (100 %)	15 (100 %)	15 (100 %)	1 (6.7 %)
ปัสสาวะ	15 (100 %)	15 (100 %)	15 (100 %)	-	0

- = ไม่สามารถทำการเก็บตัวอย่าง

SDZ+TMP = Sulfadiazine + Trimethoprim TML = Tiamulin hydrogen fumarate
LCM+SPM = Lincomycin + Spectinomycin CTC = Chlortetracycline

ตารางที่ 10 ความน่าเชื่อถือของชุดตรวจสอบ “CM-Test” ในการตรวจยาด้านจุลชีพตกค้างในตัว
อย่างจากไก่และสุกรที่ได้รับยาด้านจุลชีพทั้งหมดที่ทดลองในตารางที่ 6 และตารางที่ 7
(ผลการทดสอบที่ใช้ในการคำนวณเป็นตัวอย่าง 1 วันหลังจากหยุดให้ยา)

ตัวอย่าง ที่ตรวจ	ไก่กินน้ำที่ผสมยา		ไก่กินน้ำปกติ		ความน่าเชื่อถือ		
	ผลบวกจริง	ผลลบเท็จ	ผลลบจริง	ผลบวกเท็จ	Sensitivity	Specificity	Accuracy
ซีรัม	93	7	25	0	93 %	100 %	94.4 %
กล้ามเนื้อ	87	13	25	0	87 %	100 %	89.6 %
ตับ	99	1	25	0	99 %	100 %	99.2 %

ตัวอย่าง ที่ตรวจ	สุกรกินอาหารที่ผสมยา		สุกรกินอาหารปกติ		ความน่าเชื่อถือ		
	ผลบวกจริง	ผลลบเท็จ	ผลลบจริง	ผลบวกเท็จ	Sensitivity	Specificity	Accuracy
ซีรัม	60	0	14	1	100 %	93.3 %	98.7 %
ปัสสาวะ	45	0	15	0	100 %	100 %	100 %

Sensitivity = (ผลบวกจริง/ จำนวนตัวอย่างจากสัตว์ที่ได้รับยา) x 100

Specificity = (ผลลบจริง/ จำนวนตัวอย่างจากสัตว์ที่ไม่ได้รับยา) x 100

Accuracy = {(ผลบวกจริง+ผลลบจริง)/ จำนวนตัวอย่างทั้งหมด} x 100

ตารางที่ 11 ผลการตรวจตัวอย่างเนื้อไก่ซึ่งได้รับยาด้านจุลชีพที่ทดสอบด้วยชุดตรวจสอบ “CM-Test” เปรียบเทียบกับการทดสอบด้วยวิธี European Four Plate Test (EFPT)
ใน () คือ ผลจากการทดสอบด้วยวิธี EFPT *

วันที่ เก็บตัวอย่าง	ไก่ที่ได้กินน้ำที่มียาผสม					ไก่ที่ ไม่ได้ให้ยา
	Gallimicin	Colistin	Apramycin	Amoxycillin	Amprolium	
0	-ve (-ve)	-	+ve (-ve)	-	-ve (-ve)	-ve (-ve)
1	+ve (-ve)	-	-ve (-ve)	-	+ve (-ve)	-ve (-ve)
2	+ve (-ve)	-	-ve (-ve)	-	+ve (-ve)	-ve (-ve)
3	+ve (-ve)	+ve (-ve)	+ve (-ve)	-	-ve (-ve)	-ve (-ve)
5	-	+ve (-ve)	-	-	-	-
7	-	-	-	+ve (-ve)	-	-
9	-	-	-	-ve (-ve)	-	-

* ทำการทดสอบ 3 ซ้ำต่อแต่ละตัวอย่าง

- = ไม่ได้ทำการเก็บตัวอย่าง

ตารางที่ 12 ผลการทดสอบตัวอย่างหัวอาหารสัตว์ (Premixes) ด้วยชุดตรวจสอบ “CM-Test” ในการตรวจหาการปนเปื้อนของยาต้านบิต

รหัสของ Premix	สัดส่วนของ Premix ในน้ำกลั่นที่ใช้ในการละลายยาจาก Premix (W/V)							
	50%	10%	5%	1%	0.5%	0.2%	0.1%	0.01%
VP510-1	+	+	+	+	+	+	+	-
VP511-1	+	+	+	+	+	+	+	+
VP513	+	+	+	+	+	+	+	+

ตารางที่ 13 ผลการทดสอบความสามารถ (Detection limits) ของชุดตรวจสอบ “CM-Test” ในการตรวจหาการปนเปื้อนของยาต้านบิต

ยาต้านบิต	ความเข้มข้นของยาต้านบิต (mg/ L, ppm.)							
	5.0	1.0	0.5	0.1	0.05	0.025	0.012	0.00625
Colistin	+	+	+	-				
Flavomycin	+	+	-					
Surmax	+	-						
Copper sulfate	+	+	-					
Monensin	+	+	+	+	+	±	±	-
Sacox	+	+	+	+	+	+	+	+
Salocin	+	+	+	+	+	+	+	+

± = หลอดทดสอบมีสีม่วงจางซึ่งอาจสรุปว่าให้ผลบวกมากกว่าให้ผลลบ

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบลักษณะชุดตรวจสอบยาด้านจุลชีพตกค้าง “KS-9” “KS-9S” “AM-Test” และ “CM-Test”

ลักษณะเปรียบเทียบ	ชุดตรวจสอบ “KS-9”	ชุดตรวจสอบ “KS-9S”	ชุดตรวจสอบ “AM-Test”	ชุดตรวจสอบ “CM-Test”
เชื้อที่ใช้ในชุดตรวจสอบ	ระบุ <i>Bacillus stearothermophilus</i> var <i>calidolactis</i>	ระบุ <i>Bacillus stearothermophilus</i> var <i>calidolactis</i> C 593	ระบุใช้เชื้อ <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	ระบุใช้เชื้อ <i>Geobacillus stearothermophilus</i>
อาหารที่ใช้เตรียมสปอร์	ไม่มี Manganese Sulphate	ไม่มี Manganese Sulphate	มี Manganese Sulphate	มี Manganese Sulphate
อาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดทดสอบ	12 ชนิด	12 ชนิด	6 ชนิด	6 ชนิด
ยาด้านจุลชีพในอาหารเลี้ยงเชื้อ	ไม่มียา Trimethoprim	มียา Trimethoprim	มียา Trimethoprim	มียา Trimethoprim
Acid-base indicator	ใช้ Bromocresol purple	ใช้ Bromocresol purple	ใช้ Bromocresol purple	ใช้ Bromocresol purple
หลอดชุดตรวจสอบ	หลอดพลาสติก ~10X40 มม.*	หลอดพลาสติก ~10X40 มม.*	หลอดพลาสติก ~10X40 มม.*	หลอดพลาสติก ~10X40 มม.*
การใช้ตรวจตัวอย่างน้ำนม	ใช้ตัวอย่างน้ำนม 0.1 มล.	ไม่ได้ใช้ตรวจน้ำนม	ใช้ตัวอย่างน้ำนม 0.1 มล.	ไม่ได้ใช้ตรวจน้ำนม
การเตรียมตัวอย่างเนื้อ	ไม่ได้ใช้ตรวจเนื้อ	สกัดตัวอย่างเนื้อด้วย Buffer โดยใช้เครื่องตีปั่นชิ้นเนื้อ	ไม่ได้ใช้ตรวจเนื้อ	ใช้แผ่นกระดาษกรองชุ่มน้ำที่คั้นจากตัวอย่างเนื้อ
การอบเพาะชุดตรวจสอบ**	$65 \pm 1^{\circ}\text{C}$	$65 \pm 1^{\circ}\text{C}$	$65 \pm 1^{\circ}\text{C}$	$65 \pm 1^{\circ}\text{C}$
ระยะเวลาในการอ่านผล	2 ½ - 3 ½ ชั่วโมง	3 ½ - 4 ½ ชั่วโมง	2 - 3 ชั่วโมง	3 - 4 ชั่วโมง
ผู้ถือสิทธิบัตร (ถ้ามี)	จุฬาฯ และสภาวิจัย	จุฬาฯ และ สกว.	จุฬาฯ และ สกว.	จุฬาฯ และ สกว.

* ลักษณะของหลอดชุดตรวจสอบเหมือนกับชุดตรวจสอบ Delvotest[®] SP (DSM Food Specialties, ประเทศเนเธอร์แลนด์) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมานานกว่า 20 ปี และเหมือนกับชุดตรวจสอบยาด้านจุลชีพตกค้างในน้ำนมอื่นที่ผลิตในยุโรป เช่น ADM (Copan Italia Inc., ประเทศอิตาลี) เป็นต้น

** อุณหภูมิที่ใช้ในการอบเพาะชุดตรวจสอบคือ อุณหภูมิ 64-65 °C ที่ใช้ในการอบเพาะเชื้อกลุ่ม Thermophilic bacteria ในหลอดทดสอบที่ใช้หลักการ Tube diffusion เช่นเดียวกับ Delvotest[®] SP และชุดตรวจสอบของต่างประเทศ



รูปที่ 1

แสดงลักษณะของหลอดชุดตรวจสอบ “AM-Test” และ “CM-Test” ซึ่งประกอบด้วย
หลอดพลาสติกชนิด polypropylene ขนาด 10 X 40 มิลลิเมตร (เส้นผ่าศูนย์กลาง X
ส่วนสูง) อยู่ติดกันเป็น 5 x 5 แถว แถวละ 5 หลอดชุดตรวจสอบ)

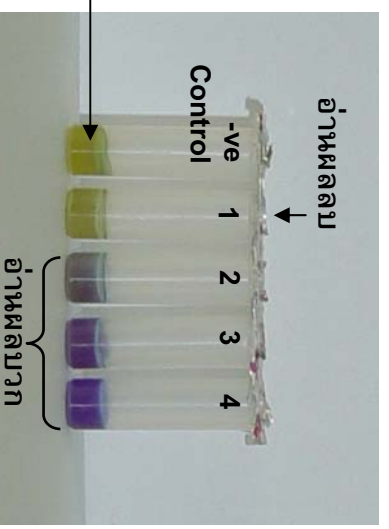
- ติดจำนวนหลอดทดสอบเท่าจำนวนตัวอย่างที่จะทดสอบ และเพิ่มอีก 1 หลอดเพื่อใช้เป็นหลอดควบคุม (Negative control หรือหลอดทดสอบน้ำนมปลอดสารต้านจุลชีพ)
- เชียนหมายเลขตัวอย่างบนหลอดทดสอบ และหลอดควบคุม (Negative control)
- ใช้ไซริงค์ตอกกับไซริงค์ทึบเจาะฝาหลอดทดสอบ และดูดตัวอย่างน้ำนมที่จะทดสอบปริมาณ 0.1 มล.
หยอกลงในหลอดทดสอบ
- ทำการปิดฝาหลอดด้วยเทปกาวเพื่อป้องกันการระเหยของสารในหลอดทดสอบ
- ทำการอ่านผลหลังจากอบเพาะหลอดทดสอบที่ $65 \pm 1^\circ\text{C}$ ประมาณ 2-2½ ชม. โดยนำหลอดควบคุม (Negative control) มา ดูผลก่อน ถ้าสีของหลอดควบคุมเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้งหมดให้อ่านผลการทดสอบตัวอย่างน้ำนมทั้งหมดได้ แต่ถ้าสีของหลอดควบคุมยังไม่เปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้งหมดให้ทำการอบเพาะต่อและทำการอ่านผลทุก 15 นาที



หลอดทดสอบเปลี่ยนเป็นสีเหลือง = ไม่มียาต้านจุลชีพ
แต่ถ้ายังคงมีสีม่วงหรือม่วงจาง = มียาต้านจุลชีพตกค้าง

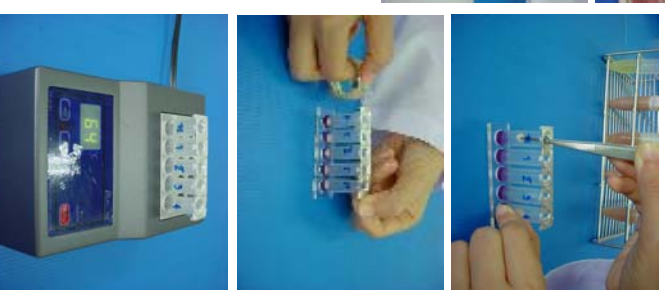
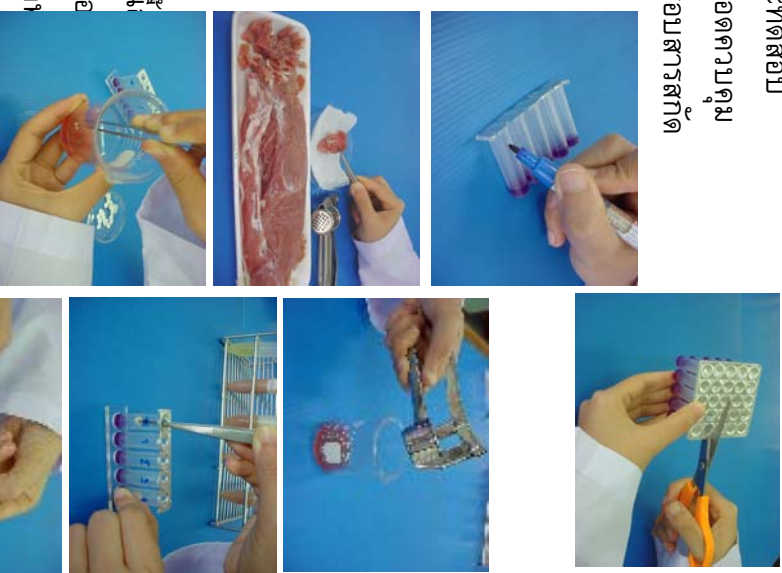
ทุกครั้งที่ทำการทดสอบ :

ให้หยอดน้ำนมปลอดสารต้านจุลชีพ
0.1 มล. ลงในหลอดควบคุม



รูปที่ 2 วิธีการใช้ชุดตรวจสอบ “AM-Test” ในการตรวจสอบหายาต้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างน้ำนม

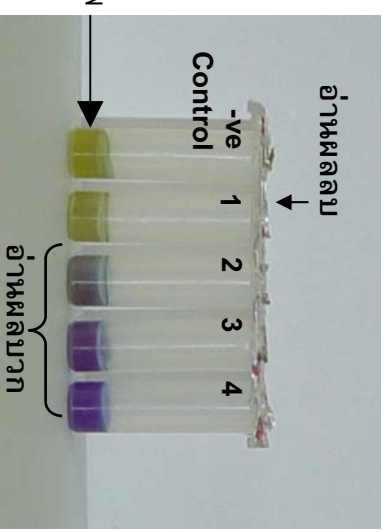
- จัดจำนวนหลอดทดสอบเท่าจำนวนตัวอย่างที่จะทดสอบ และเพิ่มอีก 1 หลอดเพื่อใช้เป็นหลอดควบคุม (Negative control หรือหลอดทดสอบสารสกัดโปรตีนหลอดสารต้านจุลชีพ)
- เขียนหมายเลขตัวอย่างบนหลอดทดสอบ และหลอดควบคุม (Negative control)
- ถิ่นน้ำเนื้อจากตัวอย่างเนื้อ (ประมาณ 15 กรัม) โดยห่อด้วยผ้าขาวบาง และบีบด้วยที่บีบกระดาษเทียม
- ใช้ปากคีบ (Forceps) คีบกระดูกาวกระดูกงูประมาณ 6 ซม. จุ่มในน้ำเนื้อในหลอดทดสอบโดยให้กระดูกาวกระดูกงูจุ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดเพาะ
- ทำการปิดฝาหลอดด้วยเทปขาวเพื่อป้องกันการระเหยของสารในหลอดทดสอบ
- ทำการอ่านผลหลังจากบ่มเพาะหลอดทดสอบที่ $65 \pm 1^\circ\text{C}$ ประมาณ 3-4 ชม. โดยนำหลอดควบคุม (Negative control) มาดูผลก่อน ถ้าสีของหลอดควบคุมเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้งหมด ให้อ่านผลการทดสอบตัวอย่างนั้นทั้งหมดได้ แต่ถ้าสีของหลอดควบคุมยังไม่เปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้งหมด ให้ทำการบ่มเพาะต่อและทำการอ่านผลทุก 15 นาที



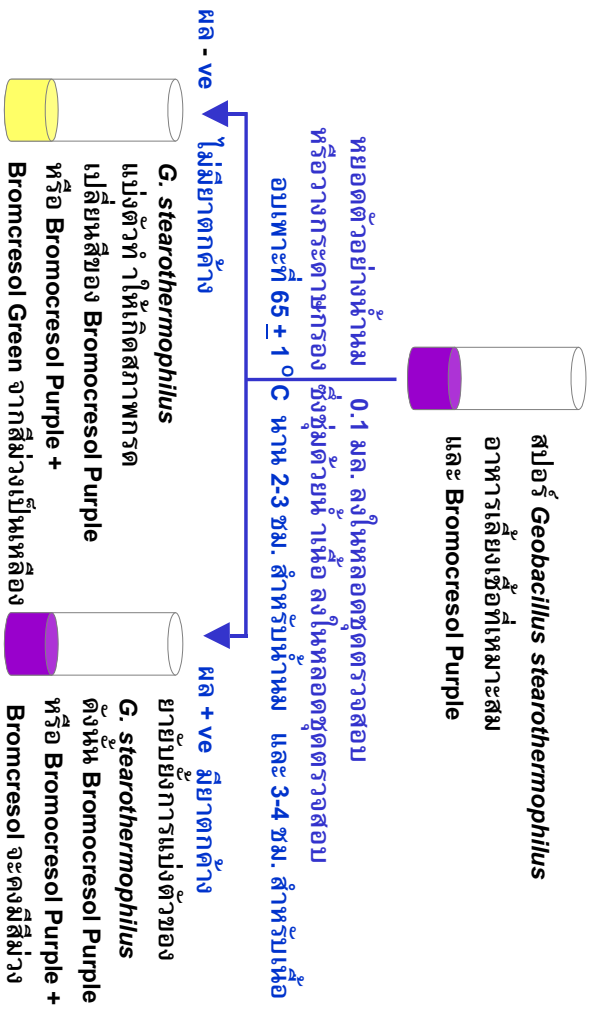
หลอดทดสอบเปลี่ยนเป็นสีเหลือง = ไม่มียาต้านจุลชีพ
แต่ถ้ายังคงมีสีม่วงหรือม่วงจาง = มียาต้านจุลชีพตกค้าง

ทุกครั้งที่ทำการทดสอบ :

ให้ใช้กระดากะการกรองชิ้นสารสกัดจากเนื้อปลาลอดสารต้านจุลชีพ
วางลงในหลอดควบคุม (Negative control)



รูปที่ 3 วิธีการใช้ชุดตรวจสอบ “CM-Test” ในการตรวจสอบหาต้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างเนื้อไก่และเนื้อสุกร การตรวจตัวอย่างวิธีนี้และวิธีสภาวะก็มีหลักการเดียวกัน คือ ใช้กระดากะการกรองตัวอย่างวิธีนี้และวิธีสภาวะก็มีหลักการเดียวกัน



รูปที่ 4 หลักการของชุดตรวจสอบเบื้องต้น “AM-Test” และ “CM-Test”



(A)

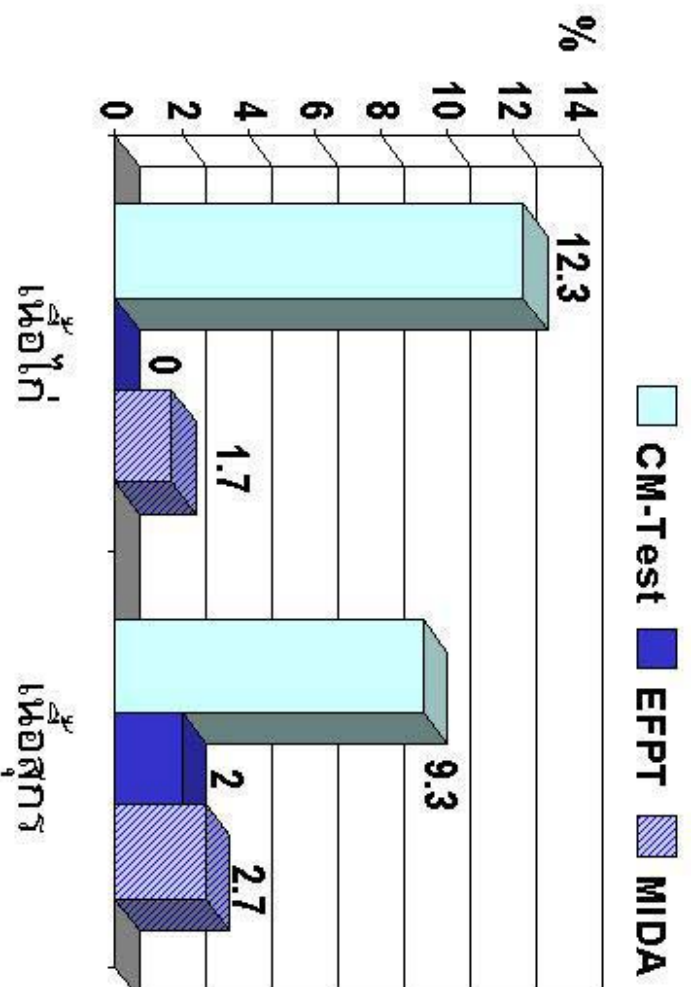


(B)

รูปที่ 5 การใช้เครื่องตีปั่นตัวอย่างขึ้นเนื้อ Homogenizer (A) และ Stomacher (B) ในการสกัดยาต้านจุลชีพจากตัวอย่างเนื้อ



รูปที่ 6 การใช้เครื่องบดกระเทียมในการคั้นน้ำจากตัวอย่างเนื้อ



รูปที่ 7

เปอร์เซ็นต์การตรวจพบยาต้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างเนื้อไก่ (300 ตัวอย่าง) และเนื้อสุกร (300 ตัวอย่าง) จากตลาดสดและซูเปอร์มาร์เก็ตในเขตกรุงเทพมหานครระหว่างเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2544 - กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2545 โดยใช้ชุดตรวจ CM-Test เปรียบเทียบกับวิธี EFPT และ MIDA



รูปที่ 8 แทนให้ความร้อน (Heater block) ที่จัดทำขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- กระทรวงสาธารณสุข. 2544. การสัมมนาวิชาการ เรื่อง โรคติดเชื้ออุบัติใหม่และอุบัติซ้ำ, วันที่ 3-5 เมษายน 2544 ณ ห้องราชเทวีแกรนด์บอลรูม โรงแรมเอเชีย กรุงเทพมหานคร, ดำเนินการโดยกองโรคติดต่อทั่วไป กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข และคณะกรรมการสภาวะวิจัยแห่งชาติ สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- เกรียงศักดิ์ สายชนู และชัชชัย เนลิมาชัยกิจ. 2541 (1998) “การประเมินประสิทธิภาพของ เเคเอส-9 เมื่อใช้ตรวจหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมที่ผ่านความร้อน.” ประมวลเรื่อง การประชุมวิชาการ โคนมและผลิตภัณฑ์ ครั้งที่ 2 จัดโดยคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. วันที่ 3-5 มิถุนายน 2541. ณ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. หน้า 65-75.
- เกรียงศักดิ์ สายชนู และ ชัชชัย เนลิมาชัยกิจ. 2543. ชุดตรวจสอบสารต้านจุลชีพในน้ำนมไก่และเนื้อสุกร : “เคเอส-9เอส” ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 26 จัดโดยสัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์. 15-17 พฤศจิกายน 2543. โรงแรมมิราเคิลแกรนด์, กรุงเทพฯ. หน้า 247-254.
- เกรียงศักดิ์ สายชนู ชัชชัย เนลิมาชัยกิจ และศศิธร คณะรัตน์. 2543. ความสามารถของ “เคเอส-9เอส” ในการตรวจสอบสารต้านจุลชีพในน้ำนมไก่และสุกร. ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 26 (15-17 พ.ย. 2543) จัดโดยสัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์ ณ โรงแรม มิราเคิล แกรนด์ กรุงเทพฯ. หน้า 255-262.
- ดวงดาว วงศ์สมมาตร. 2543. Sample examination method for antibiotic residues in livestock and marine food product. กองอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (ติดต่อด่วนตัว).
- ศศิ เจริญพจน์. 2544. เอกสารวิชาการ กองควบคุมยาสัตว์ กรมปศุสัตว์ เรื่อง ยาต้านจุลชีพเพื่อการเลี้ยงสัตว์และความปลอดภัยของผู้บริโภค. พิมพ์ที่ โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, กรุงเทพฯ. 35 หน้า.
- สมาคมผู้ค้าเวชภัณฑ์และเคมีภัณฑ์แห่งประเทศไทย. 2542. เอกสารเผยแพร่ในการสัมมนาโต๊ะกลมเพื่อหาแนวทางการวิจัยเรื่อง การพัฒนาเวชภัณฑ์และชีวภัณฑ์สำหรับสัตว์ในประเทศไทย จัดโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ณ ห้องประชุมของ สกว. วันที่ 11 พฤศจิกายน 2542.
- Charm II Test for Beta-lactams, Tetracyclines, and Sulfonamides in Tissue, Serum, and Urine. 1995. Charm Sciences Inc. Operator's Manual.
- IDF. 1987. Milk and Milk Products-Detection of Inhibitor. Bulletin of the International Dairy Federation, No. 220. 78 pages.
- IDF. 1993. Inhibitory Substances in Milk - Current Analytical Practice. Bulletin of the International Dairy Federation, No. 283. 76 pages.
- Mohr, P. 1990. Play It Safe-Test Your Milk. Dairy Today. April 1990 : 42-43.

- Okerman L, van Hoof J, Debeuckelaere W. 1998. Evaluation of the European four-plate test as a tool for screening antibiotic residues in meat samples from retail outlets. JAOAC, 81(1): 51-6.
- Sande, M.A. and G.L. Mandell. 1985. "Antimicrobial agents, Tetracyclines, Chloramphenicol, Erythromycin, and Miscellaneous Antibacterial Agents", in Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (7th ed.), A.G. Gilman, L.S. Goodman, T.W. Rall, and F. Murad (Eds.). NY: Macmillan Publishing Co., p. 1170-1198.
- Wilson, 1994. "Antibiotic Residues and Public Health", in ANIMAL DRUGS and HUMAN HEALTH, L.M. Crawford and D.A. Franco (Eds.). Technomic Publishing Co., Inc., USA. p. 63-80.

ภาคผนวก

บทความสำหรับการเผยแพร่

“ชุดตรวจยาต้านจุลชีพตกค้างในน้ำนมและเนื้อสัตว์”

การตกค้างของยาต้านจุลชีพในอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากสัตว์ นอกจากทำให้ผู้บริโภคเกิดความไม่มั่นใจในความปลอดภัยแล้ว ยังมีผลกระทบต่อการส่งออกเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากสัตว์ ทั้งนี้วิธีการตรวจสอบหายาด้านจุลชีพตกค้างในเนื้อสัตว์ที่ใช้ในปัจจุบันคือ วิธี European Four Plate Test (EFPT) หรือวิธี Microbial Inhibition Disk Assay (MIDA) ซึ่งมีขั้นตอนในการเตรียมจานเพาะเชื้อและต้องใช้เวลามากน้อย 18 ชั่วโมง จึงสามารถอ่านการตรวจสอบได้ นอกจากวิธี EFPT และ MIDA ยังมีความจำเพาะ (Specificity) ค่อนข้างต่ำ จึงมักเกิดผลลบเท็จ สำหรับวิธีการตรวจสอบหายาด้านจุลชีพตกค้างในน้ำนมต้องใช้ชุดตรวจสอบของต่างประเทศซึ่งมีราคาค่อนข้างสูง ดังนั้น จึงได้มีการวิจัยและพัฒนาชุดตรวจสอบยาต้านจุลชีพตกค้างในน้ำนมและเนื้อสัตว์ขึ้นโดยความสนับสนุนของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจหายาด้านจุลชีพตกค้างในน้ำนม เนื้อไก่และสุกร ตลอดจนในตัวอย่างชีรรมของไก่ และตัวอย่างบัสสาวะของสุกร โดยใช้หลักการการยับยั้งการแบ่งตัวของแบคทีเรีย *Geobacillus stearothermophilus* ซึ่งบรรจุในหลอดพลาสติก (Polypropylene) 1 x 4 เซนติเมตร (เส้นผ่าศูนย์กลาง x ความสูง) ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมและสารที่ให้สีเหลืองถ้ามีการแบ่งตัวของแบคทีเรีย เมื่อทำการหยอดตัวอย่างน้ำนม 0.1 มิลลิลิตร หรือวางแผ่นกระดาษกรองเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร ซึ่งชุ่มด้วยตัวอย่างน้ำที่ปั่นจากตัวอย่างเนื้อสัตว์ผ่านผ้ากรองหรือตัวอย่างชีรรมหรือบัสสาวะลงในหลอดชุดตรวจสอบ จะสามารถอ่านผลการตรวจหลังจากการบ่มเพาะชุดตรวจสอบที่อุณหภูมิ 65 ± 1 องศาเซลเซียส นาน $2\frac{1}{2}$ – $3\frac{1}{2}$ ชั่วโมง ด้วยวิธีการที่ง่ายและไม่ต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาแพงแต่มีประสิทธิภาพ (Detection limits) และความแม่นยำ (Validity) สูงในการตรวจหายาด้านจุลชีพตกค้างไม่ต่ำกว่าชุดตรวจสอบของต่างประเทศ ดังนั้น ชุดตรวจสอบสำหรับการตรวจหายาด้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างน้ำนม (ซึ่งตั้งชื่อว่า “AM-Test” หรือ “Antimicrobial Test”) และชุดตรวจสอบในตัวอย่างเนื้อสัตว์ ชีรรมและบัสสาวะ (ซึ่งตั้งชื่อว่า “CM-Test” หรือ “Clean Meat Test”) จะสามารถเสริมสร้างระบบการเฝ้าระวังยาต้านจุลชีพตกค้างในอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากสัตว์ในประเทศไทยให้มีประสิทธิภาพและเป็นรูปธรรมที่สามารถปฏิบัติงานกว้างขวางทั้งในแง่ปฏิบัติการและในภาคสนาม

กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์

(1) ชุดตรวจสอบหายาด้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างน้ำนม “AM-Test”
(Antimicrobial Test)

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและบริษัท แกรนด์สยาม จำกัด (ซึ่งเป็นผู้จัดทำชุดตรวจสอบหายาด้านจุลชีพตกค้างที่ได้พัฒนาขึ้น) ได้จัดการประชุมเสนอผลงานเรื่อง ชุดตรวจสอบหายาด้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างน้ำนม “AM-Test” เมื่อวันที่ 26 พฤศจิกายน พ.ศ. 2545 ณ โรงแรมรามารักษ์ตันท์ โดยมีผู้เข้าร่วมฟังจากสหกรณ์โคนมและบริษัทแปรรูปน้ำนมพร้อมดื่มจำนวนประมาณ 30 คน

ทั้งนี้ ชุดตรวจสอบหายาด้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างน้ำนม “AM-Test” ได้ดำเนินการผลิตในเชิงพาณิชย์มาตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2545 และปัจจุบันมีผู้ใช้เฉลี่ยประมาณ 4,000 ชุด ตรวจสอบต่อเดือน ซึ่งผู้ใช้หลักได้แก่ สหกรณ์โคนมต่างๆ โดยบริษัท แกรนด์สยาม จำกัด มีแผนดำเนินการประชาสัมพันธ์และจัดการประชุมในส่วนภูมิภาคต่างๆ ในเดือนมีนาคมและเมษายน พ.ศ. 2546 ซึ่งคาดว่าจะสามารถเพิ่มจำนวนผู้ใช้ชุดตรวจสอบ“AM-Test” ได้ถึง 10,000 ชุดตรวจสอบต่อเดือน ภายใต้งบกลางปี พ.ศ. 2546

(2) ชุดตรวจสอบหายาด้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างเนื้อสัตว์ ชูริ้มและปลาสวาะ
“CM-Test” (Clean Meat Test)

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและบริษัท แกรนด์สยาม จำกัด ได้กำหนดจัดการประชุมเสนอผลงานเรื่อง ชุดตรวจสอบหายาด้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างเนื้อสัตว์ “CM-Test” ในวันที่ 25 มีนาคม พ.ศ. 2546 ณ โรงแรมราเวลการ์เด็นท์ โดยจะทำการเชิญผู้เกี่ยวข้องจากโรงงานแปรรูปเนื้อสัตว์เพื่อการส่งออก กรมปศุสัตว์และกรุงเทพมหานครมาฟังการเสนอผลงานวิจัยและร่วมให้ข้อคิดเห็นหรือเสนอแนะ ทั้งนี้ คาดการณ์ว่าชุดตรวจสอบหายาด้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างเนื้อสัตว์ “CM-Test” จะสามารถเริ่มการผลิตในเชิงพาณิชย์ได้ปลายเดือนมีนาคม พ.ศ. 2546

ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้และกิจกรรมที่ดำเนินการมาและผลที่ได้รับตลอดโครงการ

กิจกรรมที่วางแผนไว้	กิจกรรมที่ดำเนินการมาและผล
(1) การพัฒนาชุดตรวจสอบยาด้านจุลชีพตกค้างในเนื้อไก่และสุกร “KS-9S” เพื่อผลิตในเชิงพาณิชย์เพื่อผลิตในเชิงพาณิชย์	(1) เนื่องจากมีปัญหาในการอ้างผลงานของชุดตรวจสอบยาด้านจุลชีพตกค้างในน้ำนมโค “KS-9” และอาจมีปัญหาต่อเนื่องถึงการพัฒนาชุดตรวจสอบ “KS-9S” เพื่อผลิตในเชิงพาณิชย์ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงดำเนินการวิจัยและพัฒนาวิธีการเตรียมเชื้อ และสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อขึ้นใหม่ และเป็นที่มาของชุดตรวจสอบยาด้านจุลชีพตกค้างในน้ำนมโค “AM-Test” และชุดตรวจสอบยาด้านจุลชีพตกค้างในเนื้อไก่และสุกร รวมทั้งในตัวอย่างชูริ้มและปลาสวาะ “CM-Test”

กิจกรรมที่วางแผนไว้	กิจกรรมที่ดำเนินการมาและผล
(2) การพัฒนาวิธีการสกัดยาต้านจุลชีพจากเนื้อไก่และสุกร	(2) ได้พบวิธีการใช้กระดาษกรองชั้นนำเนื้อซึ่งคั้นจากตัวอย่างเนื้อด้วยผ้ากรองและหีบกระเทียม เพื่อการทดสอบหายาต้านจุลชีพตกค้างในหลอดชุดตรวจสอบ “CM-Test”
(3) การหาสารที่ใช้แทนสารสกัดจากเนื้อปลอดยาต้านจุลชีพเพื่อใช้เป็นหลอดควบคุม (Negative control)	(3) สามารถหาสารทดแทนสารสกัดจากเนื้อปลอดยาต้านจุลชีพเพื่อใช้เป็นหลอดควบคุม (Negative control) ซึ่งคือ สารสกัดโปรตีนที่หีบเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการทั่วไป ดังนั้น จึงหาง่ายและมีราคาไม่แพง
(4) การทดสอบใช้ชุดตรวจสอบในห้องปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์เพื่อการส่งออก	(4) ได้ทำการทดสอบการใช้ชุดตรวจสอบในห้องปฏิบัติการของฟาร์มเพื่อการส่งออก รวมทั้งในภาคสนามทั้งฟาร์มโคนม ฟาร์มไก่เนื้อ และฟาร์มสุกร
(5) การจัดทำแท่นให้ความร้อน (Heater block)	(5) ได้จัดทำแท่นให้ความร้อน (Heater block) เพื่อใช้ในการ อบเพาะชุดตรวจสอบ (ต้นทุน 3,200 บาท) โดยมีราคาจำหน่ายที่ผู้ประกอบการจะสามารถจัดซื้อได้

นอกจากนี้จากการกำหนดในแบบเสนอโครงการวิจัย ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบความน่าเชื่อถือของชุดตรวจสอบ “CM-Test” ในไก่เนื้อและสุกรขุน รวมทั้ง เพิ่มแนวทางการใช้ชุดตรวจสอบ “CM-Test” ในการเฝ้าระวังการปนเปื้อนของยาต้านจุลชีพในอาหารที่ใช้เลี้ยงสัตว์ และการตรวจจากสุกรแม่และบัสสาวะของสุกรในขณะที่มีชีวิต

ผลที่ได้รับตลอดโครงการวิจัยนี้ คือ ชุดตรวจสอบยาต้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างน้ำนมโคเนื้อไก่และสุกร รวมทั้งในสุกรแม่และบัสสาวะที่ใช้ง่าย มีประสิทธิภาพและความน่าเชื่อถือไม่ด้อยกว่าชุดตรวจสอบของต่างประเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการลดขั้นตอนในการสกัดยาต้านจุลชีพตกค้างจากตัวอย่างเนื้อโดยไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง รวมทั้งการใช้แผ่นกระดาษกรองที่หุ้มด้วยตัวอย่างน้ำที่คั้นจากตัวอย่างเนื้อ ตัวอย่างสุกรแม่หรือบัสสาวะวางลงในหลอดชุดตรวจสอบเป็นวิธีการที่เห็นหลักการ Disk diffusion method ร่วมกับ Tube diffusion method ซึ่งเป็นรายงานแรกในโลกและคาดว่าจะได้รับการยอมรับและอาจมีการพัฒนาการใช้อย่างกว้างขวางต่อไป