รายงานผลการวิจัย
ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

เรื่อง

ประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ Delvotest-P^{R} และ Microbial Inhibition Disk Method ในการตรวจหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมในประเทศไทย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

615.952
93
ธ117ป

โดย

ธงชัย เฉลิมชัยกิจ
ศุภชัย เนื่อนวลสุวรรณ

ธันวาคม 2538

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลงานวิจัย

ประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ Delvotest-P®

และ Microbial Inhibition Disk Method

ในการตรวจหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมในประเทศไทย

โดย

ธงชัย เฉลิมชัยกิจ

ศุภชัย เนื้อนวลสุวรรณ

ธันวาคม 2538

16 พ.ย. 2548

I 3c|21398

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนเงินทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช ประจำปีงบประมาณ 2537 นายสัตวแพทย์ และเจ้าหน้าที่องค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย (อ.ส.ค) และ น.สพ.รัตน์ โกมลบุตร บริษัท อุตสาหกรรมนมมวกเหล็ก จ.สระบุรี ที่อำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่างน้ำนม คุณสุกุมา ชัยสิทธิ์ดำรง ภาควิชาอายุรศาสตร์ คุณไฉไล คูวัฒนานุกูล คุณวลาศินี รักขาว และบุคลากรภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และคุณวิโรจน์ คงเกลี้ยง ที่ช่วยเหลือในการปฏิบัติงานวิจัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย : ประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ Delvotest-P^{R} และ Microbial Inhibition Disk Method ในการตรวจหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมในประเทศไทย

ชื่อผู้วิจัย : ธงชัย เฉลิมชัยกิจ และ ศุภชัย เนื้อนวลสุวรรณ

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ : ธันวาคม 2538

บทคัดย่อ

การตรวจสอบหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมพร้อมดื่มพาสเจอร์ไรซ์ 323 ตัวอย่าง ยูเอชที 330 ตัวอย่าง น้ำนมดิบจากถังนมรวมของเกษตรกร 515 ตัวอย่าง จากโคนมปกติ 200 ตัวอย่าง และจากโคนมที่มีอาการเต้านมอักเสบก่อนให้การรักษา 50 ตัวอย่าง โดยวิธี Microbial inhibition disk method และใช้ชุด ตรวจสอบ Delvotest-P^{R} พบว่าอัตราการให้ผลบวกลดลง 42.1-100% หลังจากการอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ 80 ^{O}C นาน 3 นาที ก่อนทำการตรวจสอบ แสดงว่าผลบวกเท็จที่เกิดขึ้นน่าจะมีสาเหตุจากสารยับยั้งการแบ่งตัวของแบคทีเรียตามธรรมชาติในน้ำนม (Natural inhbitors) เช่น Lysozyme และ Lactoferrin เป็นต้น โดยที่สารเหล่านี้ไม่สามารถทนความร้อนได้ ดังนั้น การอุ่นน้ำนมก่อนการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะโดยวิธีทั้งสองดังกล่าวจึงเป็นการเพิ่มความน่าเชื่อถือในการตรวจสอบ อย่างไรก็ดีพบว่าการอุ่นน้ำนมอาจทำให้เกิดผลลบเท็จได้เช่นกัน ซึ่งการศึกษานี้พบว่าอัตราการผลลบเท็จเกิดขึ้น 12.8-13.6 % ในตัวอย่างน้ำนมที่มีอาการเต้านมอักเสบและกำลังรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ ปริมาณของ Somatic cell count (SCC) ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับผลการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะโดยวิธีทั้งสองดังกล่าวในการศึกษานี้ แต่การอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่มี SCC สูงก่อนการตรวจสอบสามารถลดอัตราการเกิดผลบวกเท็จได้เช่นกัน ทั้งนี้ ในการทดสอบประสิทธิภาพความน่าเชื่อถือของการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะพบว่าค่า Specificity ของทั้งสองวิธีเท่ากันคือ 92.50 % แต่ Microbial inhibition disk method มีค่า Sensitivity เท่ากับ 98.85 % สูงกว่าของ Delvotest-P^{R} ซึ่งเท่ากับ 93.10 %

Project Title : Efficacy of Delvotest-P^{R} and Microbial Inhibition Disk Method for Detecting Antibiotic Residues in Dairy Milk in Thailand.

Name of the Investigators : Thongchai Chalermchaikit and Supachai Nuanuansuwon

Year : December 1995

Abstract

Microbial inhibition disk method and Delvotest-P^{R} were used for detecting antibiotic residues in pasteurized milk 323 samples, U.H.T. milk 330 samples, raw milk from the bulking cans 515 samples, raw milk from healthy cows 200 samples and mastitic milk before treatment 50 samples. The positive test results were decreased 42.1-100% after heating the samples at 80 ^{O}C 3 minute prior to be tested. These finding indicated that natural inhibitors in milk (eg.Lysozyme, Lactoferrin, etc.) interfered with the test results and caused numbers of false positive. Since the natural inhibitors are heat-labile substance, heating the milk samples before testing will reduce the incidence of false positive. However, this study found 12.8-13.6 % of false negative samples after heat-treatment. The somatic cell count (SCC) had been reported to be associated with false positive test results but this correlation was not found in this study. However, the reducing of false positive after heating of high SCC mastitic milk samples was found in this study. The screening test for antibiolic residues in milk by Microbial inhibition disk method has higher sensitivity (98.85 %) than Delvotest-P^{R} (93.10 %), but both has the same specificity (92.50 %).

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ i

บทคัดย่อ (ภาษาไทย) ii

บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ) iii

รายการตารางประกอบ v

รายการภาพประกอบ vii

บทนำ 1

การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

วิธีการวิจัย 4

ตัวอย่างน้ำนมและการเก็บตัวอย่าง 4

วิธีการทดสอบหาการตกค้างของยาปฏิชีวนะ 6

การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ Somatic cell count 8

การวิเคราะห์ข้อมูล 9

ผลการวิจัย 10

การอภิปรายผล 26

ข้อสรุป 30

ข้อเสนอแนะ 31

ส่วนอ้างอิง 32

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ

หน้า

ตารางที่ 1	แสดงผลการตรวจหาสารปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมในประเทศไทย ในช่วงปี 2531-2538	3
ตารางที่ 2	แสดงรายละเอียดของเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ	6
ตารางที่ 3	TWO BY TWO TABLE	9
ตารางที่ 4	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมพร้อมดื่มพาสเจอไรซ์ โดยวิธี Microbial inhibition disk assay และ Delvotest-P^{R}	13
ตารางที่ 5	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมพร้อมดื่มยูเอชที โดยวิธี Microbial inhibition disk assay และ Delvotest-P^{R}	14
ตารางที่ 6	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมดิบจากถังนมรวมของเกษตรกรที่ส่งมาโรงรับนม โดยวิธี Microbial inhibition disk assay และ Delvotest-P^{R}	15
ตารางที่ 7	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมดิบจากโคนมปกติที่ไม่มีการใช้ยาปฏิชีวนะ โดยวิธี Microbial inhibition disk assay และ Delvotest-P^{R}	16
ตารางที่ 8	จำนวนตัวอย่างที่บวกจากการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมดิบจากเต้านมที่มีอาการเต้านมอักเสบและกำลังรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ โดยวิธี Microbial inhibition disk assay และ Delvotest-P^{R}	17
ตารางที่ 9	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมดิบจากเต้านมที่ไม่มีอาการเต้านมอักเสบ (Composite Quarters) ของโคนมที่กำลังรักษาอาการเต้านมอักเสบของเต้าอื่นโดยการฉีดยาเข้าเต้า โดยวิธี Microbial inhibition disk assay และ Delvotest-P^{R}	18

รายการตารางประกอบ

หน้า

ตารางที่ 10 จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมดิบจากเต้านมที่มีอาการเต้านมอักเสบก่อนให้ยาปฏิชีวนะโดยวิธี Microbial inhibition disk assay และ Delvotest-P^{R} 19

ตารางที่ 11 ค่าเฉลี่ย ($x \pm SD$) ปริมาณ Somatic cell count ($x10^{3}$) ของตัวอย่างน้ำนมดิบจากโคนมที่มีอาการเต้านมอักเสบและโคนมที่มีสุขภาพปกติ ซึ่งให้ผลการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะโดยวิธี Microbial inhibition disk assay 23

ตารางที่ 12 ค่าเฉลี่ย ($x \pm SD$) ปริมาณ Somatic cell count ($x10^{3}$) ของตัวอย่างน้ำนมดิบจากโคนมที่มีอาการเต้านมอักเสบและโคนมที่มีสุขภาพปกติ ซึ่งให้ผลการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะโดยวิธี Delvotest-P^{R} 23

ตารางที่ 13 ผลการตรวจสอบยาปฏิชีวนะตกค้างในตัวอย่างน้ำนมดิบจากโคนมที่กำลังรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ (Treated mastitic cows) และโคนมที่ไม่ได้รับยาใด ๆ (Healthy cows) โดยวิธี Microbial inhibition disk assay ก่อนการอุ่นตัวอย่างน้ำนม 25

ตารางที่ 14 ผลการตรวจสอบยาปฏิชีวนะตกค้างในตัวอย่างน้ำนมดิบจากโคนมที่กำลังรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ (Treated mastitic cows) และโคนมที่ไม่ได้รับยาใด ๆ (Healthy cows) โดยวิธี Delvotest-P^{R} ก่อนการอุ่นตัวอย่างน้ำนม 25

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

หน้า

ภาพที่ 1 Chromatogram ของ HPLC แสดงการตรวจพบ Sulfamethazine 1,496 ng/ml ในตัวอย่างน้ำนมพร้อมดื่มพาสเจอร์ไรซ์ 20

ภาพที่ 2 Chromatogram ของ HPLC แสดงการตรวจพบ Benzyl Penicillin 1,780 ng/ml ในตัวอย่างน้ำนมดิบจากถังนมรวมของเกษตรกรที่มาส่งโรงนม 21

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ Delvotest-P® และ Microbial Inhibition Disk Method ในการตรวจหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมในประเทศไทย

บทนำ

เป็นที่ทราบกันดีว่า ปัจจุบันในประเทศไทยยังมีการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาและป้องกันโรคต่าง ๆ ในสัตว์ปศุสัตว์อย่างแพร่หลาย เนื่องจากเกษตรกรหรือผู้เลี้ยงสัตว์สามารถหาซื้อยาเหล่านี้ได้โดยเสรี ดังนั้นโอกาสของยาปฏิชีวนะตกค้างในอาหาร และผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้มาจากสัตว์เหล่านี้จึงน่าจะมีอุบัติการสูง หากไม่มีการหยุดการใช้ยาปฏิชีวนะในเวลาที่เหมาะสมก่อนนำมาสู่ผู้บริโภค การตกค้างของยาปฏิชีวนะในอาหาร และผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้มาจากสัตว์เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญมากปัญหาหนึ่ง เนื่องจากอาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภคเช่น อาการแพ้ยา (Allergy) การเป็นพิษต่อผู้บริโภคหรือลูกในครรภ์ รวมทั้งอาจเป็นสาเหตุของโรคมะเร็งและก่อปัญหาเชื้อโรคดื้อยาเกิดขึ้น (Coleman, 1986 ; Huber, 1986)

การตกค้างของยาปฏิชีวนะในอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากสัตว์ทุกชนิดอาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้เท่าเทียมกัน แต่การตกค้างของยาปฏิชีวนะในน้ำนมโคมักได้รับความสนใจมากกว่าในผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากสัตว์อื่น ๆก่อน เนื่องจากกลุ่มผู้บริโภคน้ำนมโคส่วนใหญ่คือ เด็ก สตรีมีครรภ์ และผู้ป่วยพักฟื้น ซึ่งเป็นกลุ่มประชาชนที่อ่อนแอกว่าผู้ใหญ่ปกติ ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะในน้ำนมโคจนสามารถผลิตออกมาจำหน่ายในรูปแบบของชุดตรวจสอบเบื้องต้น(Antibiotic-residue screening test kits) เช่น Agri-Screen®(Neogen Corp.), BR Test®(Glengarry Biotech), CharmCowside®, CharmFarm®(Charm Sciences, Inc.), CITE Probe® (IDEXX Corp.), Delvotest-P®(Gist Brocade, Inc.), EZ-Screen®(Environmental Diagnostics, Inc.); LacTek®(Idetek, Inc.), Penzyme®, Penzyme III® และ Signal®(Smithkline Beecham) เป็นต้น(Bishop et al.,1991) เนื่องจากชุดทดสอบเหล่านี้สามารถทำการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะได้ทันทีโดยบอกผลภายในไม่กี่นาทีถึงไม่เกิน 3 ชั่วโมง และยังสามารถนำไปใช้ในฟาร์มหรือในภาคสนามได้ ไม่จำเป็นต้องอาศัยห้องปฏิบัติการ จึงทำให้ได้รับความนิยมใช้กันแพร่หลายมากกว่าวิธีการของ Microbial inhibition disk assay หรือ High-performance liquid chromatography (HPLC)

ในประเทศไทยอุตสาหกรรมการเลี้ยงโคนมได้พัฒนาเติบโตอย่างรวดเร็ว จากจำนวนโคนมทั้งประเทศประมาณ 30,000 ตัว ในปี พ.ศ. 2530 ได้เพิ่มจำนวนขึ้นถึง 5 เท่าในปี พ.ศ. 2535 (ธุรกิจอาหารสัตว์,2535) ซึ่งเป็นแม่โคที่สามารถให้น้ำนมได้ 93,653 ตัว และด้วยในปัจจุบันรัฐบาลได้มีนโยบายส่งเสริมการเลี้ยงโคนมเพิ่มขึ้น จึงเป็นที่คาดคะเนว่าจะมีแม่โคที่สามารถให้น้ำนมได้ 140,971 ตัวในปี 2539 และเพิ่มเป็น 156,429 ตัวในปี 2540 (มติชน, 2537) ทั้งนี้ในเรื่องความปลอดภัยของผู้บริโภคก็ได้รับความสนใจเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน ดังเช่น สหกรณ์โคนมและโรงงานนมหลายแห่งได้มีการตรวจสอบคุณภาพของน้ำนมดิบก่อนการรับซื้อ

จากเกษตรกร สำหรับการตรวจสอบยาปฏิชีวนะตกค้างนั้นได้มีการนำชุดตรวจสอบ Delvotest-P^R มาใช้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็วและบริษัทผู้ผลิตได้รายงานประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบนี้ว่าจะมีความผิดพลาดให้ผลบวกเท็จ (False positive) เพียง 0.02% เท่านั้น

เนื่องจากอุตสาหกรรมน้ำนมโคในประเทศไทยนิยมใช้ชุดตรวจสอบ Delvotest-P^R สำหรับอีกวิธีการหนึ่งคือ Microbial inhibition disk assay ดังที่มีรายงานการตรวจหาสารต้านจุลชีพในน้ำนมในประเทศไทย(ตารางที่ 1) ทั้งนี้วิธีการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะในน้ำนมโดยวิธีดังกล่าวอาจให้ผลบวกเท็จได้ และมีสมมติฐานว่าน้ำนมโคในบ้านเราอาจให้ผลบวกเท็จสูงกว่าในน้ำนมโคในต่างประเทศ เนื่องจากอาจมีปริมาณของเม็ดโลหิตขาวสูงกว่า เป็นต้น ดังนั้น จึงควรมีการศึกษาประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ Delvotest-P^R และ Microbial inhibiton disk assay ในการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะในน้ำนม รวมทั้งความสัมพันธ์ของผลบวกเท็จจากการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะตกค้างของทั้งสองวิธีกับองค์ประกอบ natural inhibitors ในน้ำนม และความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์ในน้ำนม (Somatic cell count) ในน้ำนมโคกับผลของการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยมีดังต่อไปนี้

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพความน่าเชื่อถือในการตรวจหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนม โดยใช้ชุดตรวจสอบ Delvotest-P^R และวิธี Microbial inhibition disk assay

2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราของผลบวกเท็จจากการตรวจหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมโดยทั้งสองวิธีดังกล่าวกับ Natural inhibitors ในน้ำนมและปริมาณของ Somatic cell count

3. เพื่อพัฒนาวิธีการในการตรวจสอบยืนยัน (Confirming test) ผลการตรวจหายาปฏิชีวนะเบื้องต้นโดยวิธี Bioassays ทั้งสองวิธีนี้ โดยการใช้ความร้อนทำลาย Natural inhibitors ในน้ำนม และ/หรือการใช้วิธี High performance liquid chromatography (HPLC)

4. เพื่อทราบสถานภาพที่แท้จริงของอุบัติการการตกค้างของยาปฏิชีวนะในน้ำนมโค หากวัตถุประสงค์ในข้อ 1 ถึง 3 บรรลุเป้าหมาย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัยนี้คือ

1. ทราบความน่าเชื่อถือของการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมโค ตามวิธี Bioassays จากการใช้ชุดตรวจสอบ Delvotest-P^R และวิธี Microbial inhibition disk assay

2. ทราบเงื่อนไขหรือองค์ประกอบในน้ำนมโคในประเทศไทยที่อาจเป็นสาเหตุทำให้ผลการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมเกิดผลบวกเท็จขึ้น และทราบแนวทางปฏิบัติเพื่อลดอุบัติการของการเกิดผลบวกเท็จจากการตรวจสอบโดยวิธีดังกล่าว

3. ทราบสถานภาพที่เป็นจริงของการตกค้างของยาปฏิชีวนะในน้ำนมโคในประเทศไทยเพื่อใช้เป็นข้อมูลที่ถูกต้องในการแก้ไขปัญหาการใช้ยาปฏิชีวนะในโคนมต่อไป

ตารางที่ 1 แสดงผลการตรวจหาสารปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมในประเทศไทย ในช่วงปี 2531-2538

ผู้รายงานหรือแหล่งข้อมูล	ปีที่ศึกษาหรือรายงาน	น้ำนมดิบที่ฟาร์ม	น้ำนมดิบที่โรงนม	น้ำนมพาสเจอร์ไรซ์	น้ำนมยูเอชที	นมผง	วิธีทดสอบ
ธีระพงศ์ และคณะ	2535	28/300 (9.3%)	12/30 (40.0%)	84/180 (46.7%)	0/108 (0%)	-	Delvotest-P^R
Amonsin et al	2534-2535	51/1822 (2.79%)	-	-	-	-	MIDA
ขวัญชาย และคณะ	2536	-	-	80/300 (26.7%)	22/200 (11%)	14/54 (25.9)	MIDA
พรศิริ และปราโมช	2536-2537	-	197/794 (24.8%)	-	-	-	Delvotest-SP^R

หมายเหตุ MIDA : วิธี Microbial Inhibition Disk Assay

การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปี ค.ศ. 1991, Bishop และคณะได้รายงานผลการทดสอบชุดตรวจสอบหายาปฏิชีวนะในน้ำนมหลายชนิดรวมทั้ง Delvotest-P^R ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพ และความไวดีมากจากการตรวจสอบในน้ำนมหรือนมผงคืนรูปซึ่งเติมยาปฏิชีวนะชนิดและปริมาณต่าง ๆ ลงไป การทดสอบประสิทธิภาพและความไวของชุดตรวจสอบเหล่านี้ในน้ำนมธรรมชาติหรือในสถานการณ์จริงอาจให้ผลที่แตกต่างออกไป ดังเช่นการศึกษาของ Sischo และ Burns (1993) ได้ทำการทดสอบชุดตรวจสอบ 5 ชนิด ในโคนม 199 ตัวจากฟาร์ม 2 แห่งซึ่งทราบประวัติการใช้ยาปฏิชีวนะ พบว่าชุดตรวจสอบเหล่านั้นให้ผลบวกเท็จ 5-22 %

การให้ผลบวกเท็จของชุดตรวจสอบอาจมีสาเหตุจากสารต้านจุลชีพที่พบใน น้ำนมปกติ (Natural inhibitors) เช่น Lactoferin, Lysozyme, Polymorphonuclear leukocytes (Cullor,1992) ดังนั้นในการตรวจสอบยืนยัน หายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมโดยวิธี Microbial inhibition disk assay จึงแนะนำให้อุ่นน้ำนมที่อุณหภูมิ 82^{o}C นาน 3 นาที เพื่อทำลาย Natural inhibitors ก่อนการตรวจสอบ(Oliver et al., 1990) ซึ่งควรจะได้นำมาพิจารณาใช้กับชุดตรวจสอบต่าง ๆ เหล่านี้เช่นกันเพราะอาจลดหรือขจัดปัญหาการให้ผลบวกเท็จที่เกิดขึ้นได้

ผลจากการศึกษาของธีรพงศ์ ธีรภัทรสกุล และคณะ (2535) ในการตรวจสอบยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมโดยการใช้ชุดตรวจสอบ Delvotest-P^R พบว่ามียาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมดิบจากฟาร์ม 9.3% ในถังรวมน้ำนมดิบของโรงงาน 40.0% และในนมสดพาสเจอไรซ์ 46.7% (ตารางที่ 1) สหกรณ์โคนมหนองโพก็ได้รายงานพบผลบวกจากการใช้ชุดตรวจสอบ Delvotest-P^R ในการตรวจน้ำนมดิบที่รับซื้อจากเกษตรกรประมาณ 30% (ข้อมูลไม่ได้ตีพิมพ์) ซึ่งถ้าหากจำนวนผลบวกจากการศึกษานี้เป็นผลจริงก็นับว่าสถานภาพยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนม

ในบ้านเราน่าวิตกมากในเรื่องความปลอดภัยต่อผู้บริโภค และ อาจมีผลกระทบต่อเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนม ตลอดจนการรณรงค์ส่งเสริมให้มีการบริโภคน้ำนมเพิ่มขึ้น

การตรวจสอบหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมดิบ 1822 ตัวอย่าง จาก 150-167 ฟาร์มในประเทศไทยโดยการใช้วิธี Microbial inhibition disk assay (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus stearothermophilus var carlidolactis* 593 และ *Micrococcus luteus* ATCC 9431) พบว่าการตรวจเบื้องต้น(Screening test) ให้ผลบวก 10.3% (Amonsin et al., 1994) ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานของธีรพงศ์ ธีรภัทรสกุล และคณะ (2535) แต่หลังจากทำการอุ่นตัวอย่างนมที่อุณหภูมิ 80°C นาน 5 นาทีแล้ว พบว่าตัวอย่างน้ำนมดิบที่ให้ผลบวก 10.3% ลดลงเหลือเพียง 3% เท่านั้น แสดงว่าตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากการตรวจเบื้องต้นเป็นผลบวกเท็จ (หรือ Conversion rate จากผลบวกกลายเป็นผลลบ สูงถึง 72%) ซึ่งต่างจากรายงาน การศึกษาในประเทศสหรัฐอเมริกา โดย Oliver et al. (1990) ซึ่งพบ Conversion rate ในกรณีนี้เพียง 8% สมมติฐานที่พบผลบวกเท็จในเปอร์เซ็นต์ที่ต่างกันมากเช่นนี้ อาจเนื่องจากน้ำนมโคในประเทศไทยมีองค์ประกอบอื่นนอกเหนือจาก Natural inhibitors เช่น มีปริมาณของ Somatic cell count สูงกว่า เนื่องจากโคมีอาการ Subclinical mastitis ก็อาจเป็นไปได้

วิธีการวิจัย

1) **ตัวอย่างน้ำนมและการเก็บตัวอย่าง**

1.1 **น้ำนมพาสเจอร์ไรซ์ (Pasteurized Milk)**

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำนมพาสเจอร์ไรซ์ก่อนวันหมดอายุจากตู้แช่ที่มีอุณหภูมิประมาณ 0-4 ^{0}C จากตลาด Supermarket ในเขตกรุงเทพมหานคร เดือนละประมาณ 25 ตัวอย่าง แล้วนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 ^{0}C ในช่วงก่อนการทดสอบหาการตกค้างของยาปฏิชีวนะ รวมทั้งสิ้น 323 ตัวอย่าง การเก็บตัวอย่างน้ำนมพาสเจอร์ไรซ์ได้คำนึงถึงเลขที่ผลิตเพื่อให้ได้ตัวอย่างที่แตกต่างกัน และมาจากหลายผู้ผลิตได้แก่ชื่อการค้าดังต่อไปนี้ ไทย-เดนมาร์ค หนองโพ เมจิ โชคชัย ดัชมิล อิมพีเรียล ดาร์น่อน เกษตร และออร์คิด

1.2 **น้ำนมยูเอชที (UHT Milk)**

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำนมยูเอชทีก่อนวันหมดอายุจากตู้แช่ที่มีอุณหภูมิประมาณ 0-4 ^{0}C จากตลาด Supermarket ในเขตกรุงเทพมหานคร เดือนละประมาณ 30 ตัวอย่าง แล้วนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 ^{0}C ในช่วงก่อนการทดสอบหาการตกค้างของยาปฏิชีวนะ รวมทั้งสิ้น 330 ตัวอย่าง การเก็บตัวอย่างน้ำนมยูเอชทีได้คำนึงถึงเลขที่ผลิตเพื่อให้ได้ตัวอย่างที่แตกต่างกัน และมาจากหลายผู้ผลิตได้แก่ชื่อการค้าดังต่อไปนี้ ฟอร์โมสต์ มะลิ ไทย-เดนมาร์ค หนองโพ เมจิ โชคชัย สโนว์ เนสท์เล่ คาร์เนชั่น และออร์คิด

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3 น้ำนมดิบจากถังนมรวมของเกษตรกร

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำนมจากถังนมรวมของเกษตรกร ณ ศูนย์รับซื้อน้ำนมดิบองค์การส่งเสริมกิจการโคนม (อ.ส.ค.) อ.มวกเหล็ก จ.นครราชสีมา เดือนละครั้ง ครั้งละประมาณ 50 ตัวอย่าง โดยเก็บรักษาตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ 5-10 ^{0}C แล้วทำการทดสอบการตกค้างของยาปฏิชีวนะภายใน 24 ชม.หลังจากการเก็บตัวอย่าง รวมจำนวนตัวอย่างทั้งสิ้น 515 ตัวอย่าง

1.4 น้ำนมดิบจากโคนมปกติที่ไม่มีการใช้ยาปฏิชีวนะ

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำนมจากโคนมในฟาร์มของ อ.ส.ค. และจากโคนมในความดูแลของบริษัท อุตสาหกรรมนมมวกเหล็ก จำกัด จ.นครราชสีมา ซึ่งมีบันทึกการให้ยาปฏิชีวนะและมีนายสัตวแพทย์ควบคุมการใช้ยาอย่างใกล้ชิดว่า ไม่มีการให้ยาปฏิชีวนะในช่วงระยะเวลา 21 วันที่ผ่านมา โดยทำการเก็บตัวอย่างเดือนละ 1-2 ครั้ง ครั้งละประมาณ 10-20 ตัวอย่าง ตัวอย่างน้ำนมจะเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5-10 ^{0}C แล้วทำการทดสอบการตกค้างของยาปฏิชีวนะภายใน 24 ชม. หลังจากการเก็บตัวอย่าง รวมจำนวนตัวอย่างทั้งสิ้น 200 ตัวอย่าง

1.5 น้ำนมดิบจากโคนมที่มีอาการเต้านมอักเสบและกำลังรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำนมจากโคนมที่มีอาการเต้านมอักเสบและกำลังรักษาด้วยยาปฏิชีวนะประเภท Kanamycin หรือ Dihydrostreptomycin หรือ Penicillins หรือ Erythromycin เป็นส่วนประกอบหลักสำหรับฉีดเข้าเต้านม(Intramammary infusion) ในฟาร์มที่ระบุไว้ในหัวข้อ 1.4 เดือนละ 1-2 ครั้ง โดยเก็บตัวอย่างจากทั้งสี่ส่วนของเต้านม (quarters) แยกกัน ตัวอย่างน้ำนมจะเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5-10 ^{0}C แล้วทำการทดสอบการตกค้างของยาปฏิชีวนะภายใน 24 ชม. หลังจากการเก็บตัวอย่าง รวมจำนวนตัวอย่างน้ำนมจากเต้านมที่ได้รับการวินิจฉัยว่ามีอาการอักเสบโดยสัตวแพทย์ประจำฟาร์มด้วยวิธี California Mastitis Test (CMT) และกำลังให้การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ 87 ตัวอย่าง สำหรับตัวอย่างน้ำนมจากเต้านมข้างเคียง (Composite quarters) ที่ไม่มีอาการอักเสบ 219 ตัวอย่าง

1.6 น้ำนมดิบจากโคนมที่มีอาการเต้านมอักเสบก่อนการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำนมจากโคนมที่มีอาการเต้านมอักเสบ และยังไม่ได้ทำการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะในฟาร์มที่ระบุไว้ในหัวข้อ 1.4 เดือนละ 1-2 ครั้ง โดยเก็บตัวอย่างเฉพาะเต้านม (quarters) ที่มีอาการอักเสบจากการวินิจฉัยของสัตวแพทย์ประจำฟาร์มด้วยวิธี CMT ตัวอย่างน้ำนมจะเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5-10 ^{0}C แล้วทำการทดสอบการตกค้างของยาปฏิชีวนะภายใน 24 ชม. หลังจากการเก็บตัวอย่าง รวมจำนวนตัวอย่าง 50 ตัวอย่าง

2) วิธีการทดสอบหาการตกค้างของยาปฏิชีวนะ

2.1 วิธี **Microbial Inhibition Disk Assay** การทดสอบเริ่มต้นด้วยการจุ่มกระดาษกรอง (Steriled Filter Paper Disk; Advantec Toyo) เส้นผ่าศูนย์กลาง 10 มิลลิเมตร ลงในตัวอย่างน้ำนมให้กระดาษกรองดูดซับพอหมาด ๆ แล้วจึงนำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม (Inoculate) ด้วยเชื้อแบคทีเรีย (ตารางที่ 2) โดยแต่ละตัวอย่างน้ำนมจะต้องใช้ทั้งหมด 6 plates และทิ้งไว้ในตู้เย็นประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้สารตกค้างที่มีอยู่ได้ซึม (Diffuse) เข้าสู่อาหารเลี้ยงเชื้อก่อนจะนำเข้าอบ (Incubate) (IDF,1987; Tsai and Kondo,1993)

ตารางที่ 2 แสดงรายละเอียดของเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ

ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย	ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ(Media)	อุณหภูมิและระยะเวลาอบเพาะเชื้อ
Bacillus stearothermophilus	Assay Medium (AM) pH 7	ประมาณ 55 °C
var calidolactis C935		นาน 18 ชั่วโมง
Bacillus subtilis ATCC 6633	Minimum Medium (MM) pH 6,7.2,8	ประมาณ 30 °C
	Mueller Hinton Agar (MHA) pH 6,7.2,8	นาน 18 ชั่วโมง
Micrococcus luteus ATCC 9341	Mueller Hinton Agar (MHA) pH 8	ประมาณ 37 °C
		นาน 18 ชั่วโมง

การอ่านผล : โดยวัดเส้นผ่านจุดศูนย์กลางความกว้างของส่วนใส (Clear zone of inhibition) รอบกระดาษกรอง (หน่วยเป็นมิลลิเมตร) โดยใช้ Vernier calipers

การแปลผล :

ผลบวก = วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Clear zone ได้ตั้งแต่ 12 มิลลิเมตรขึ้นไป

ผลลบ = วัดเส้นผ่านจุดศูนย์กลางของ Clear zone ได้ไม่เกิน 12 มิลลิเมตร

ตัวอย่างน้ำนมที่ให้ผลบวก จะนำตัวอย่างน้ำนมนั้นมาอุ่นที่อุณหภูมิ 80 °C นาน 3 นาที ก่อนการทดสอบซ้ำ

2.2 **Delvotest-P**^{R} โดยการใช้ชุดตรวจสอบยาปฏิชีวนะในน้ำนมสำเร็จรูป Delvotest-P^{R} (Gist brocades,Inc., Netherlands) ซึ่งประกอบด้วย หลอดพลาสติกใส(Ampule) ขนาดเส้นผ่านจุดศูนย์กลาง 1 ซม. สูง 4 ซม. บรรจุส่วนผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อสปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus stearothermophilus var calidolactis* และ Indicator การทดสอบเริ่มต้นด้วยการเติมตัวอย่างน้ำนมลงไปในหลอดประมาณ 0.1 มล. แล้วนำไปอบเพาะเชื้อ(Incubate) ในตู้อบเพาะเชื้อ(Incubator) ที่อุณหภูมิ 64 °C นานประมาณ 2 ชั่วโมงครึ่ง ตัวอย่างน้ำนมที่ให้ผลบวก อาหารเลี้ยงเชื้อจะยังคงสีม่วงอยู่ ในขณะที่ตัวอย่างน้ำนมที่ให้ผลลบ อาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง เนื่องจาก เชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้และผลิตกรดขึ้น ภาวะความเป็นกรดจะไปเปลี่ยนสีของ Indicator ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้ Delvotest-P^{R} ในการตรวจตัวอย่างน้ำนมที่ให้ผลบวกกับวิธี Microbial Inhibition Disk Assay มาแล้ว และตัวอย่างน้ำนมที่ให้ผลบวก จะนำตัวอย่างน้ำนมนั้นมาอุ่นที่อุณหภูมิ 80 ^{0}C นาน 3 นาที ก่อนการทดสอบซ้ำ

2.3 การตรวจสอบยืนยัน (Confirmation test) การพบยาปฏิชีวนะตกค้างในตัวอย่างน้ำนมโดยวิธี **High-performane liquid chromatography**

ตัวอย่างน้ำนมที่ให้ผลบวกทั้งหมดทั้งก่อนและหลังการอุ่นที่ 80^{0}C จะเก็บรักษาที่อุณหภูมิ - 20^{0}C เพื่อรอการตรวจวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะด้วยวิธี High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) ดังนี้ คือ

วิธีการสกัดยาปฏิชีวนะจากตัวอย่างน้ำนม

- เติม Acetonitrile 4 ml ลงในตัวอย่างน้ำนม 2 ml เก็บแยกส่วนใสไว้ (Supernatant)

- เติม Acetonitrile 2 ml ลงในตะกอน เขย่าด้วย Vortex mixer แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงให้ตกตะกอน (Centrifugation) รวม supernatant กับการสกัดครั้งแรก

- เติม Diethyl ether 6 ml ลงใน Supernatant แล้วเขย่าด้วย Vortex mixer ตั้งทิ้งไว้ 2-3 นาที สารละลายจะแยกเป็น 2 ชั้น ใช้ Pasteur pipette ดูดสารละลายชั้นล่างทิ้งไป

- ทำการระเหยสารละลาย (ส่วนชั้นบน) โดยแช่หลอดลงใน Waterbath ที่ 40 ^{0}C แล้วเป่าให้แห้งด้วยกาซไนโตรเจนบริสุทธิ์

- หลังจากสารละลายแห้งแล้วเติม Methanol และน้ำกลั่นลงไปอย่างละ 200 µl. ทำการเขย่าด้วย Vortex mixer แล้วฉีดสารละลายที่ได้ 20-50 µl. เข้าเครื่อง HPLC เพื่อวิเคราะห์ชนิดของยาปฏิชีวนะ

ระบบการวิเคราะห์ของ **HPLC** ประกอบด้วย

- HPLC Pump (880-PU, Jasco Co., Japan), UV Spectrophotometric Detector (875-UV, Jasco Co., Japan) และ Integrator (Chromatocorder 12, SIC., USA.)

- HPLC Column คือ µ-Bondapak^{TM}, 4.6 x 250 mm (Waters, Millipore Corporation, USA.)

- Mobile phase คือ Acetonitrile : 20mM KH_2PO_4 และ 30 µM EDTA (23:77) ใช้ Flow rate 1 ml/นาที

- ตั้งค่า UV Absorbance ที่ 230 nm สำหรับการตรวจวิเคราะห์ยา Penicillins, Sufamethazine, Sulfadiazine และ Trimethoprim ค่า Minimal detection limits เท่ากับ 50, 20, 20 และ 25 ng/ml ตามลำดับ

- สำหรับการตรวจวิเคราะห์ยา Oxytetracycline, Tetracycline และ Chloramphenicol ให้ปรับค่า pH ของ Mobile phase เป็น 2.3-2.5 ด้วย Phosphoric acid และ

ตั้งค่า UV Absorbance ที่ 330 nm ซึ่งค่า Minimal detection limit เท่ากับ 25, 50 และ 20 ng/ml ตามลำดับ

2.4 การตรวจสอบหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมโดยวิธี **Charm II Test**

ตัวอย่างน้ำนมซึ่งตรวจไม่พบยาปฏิชีวนะตกค้างโดยวิธี HPLC เนื่องจากอาจมีปริมาณของยาตกค้างต่ำกว่า Minimal detection limit ของวิธี HPLC จะนำมาตรวจวิเคราะห์หายาตกค้างโดยวิธี Charm II Test (Charm Science Inc., Massachusetts, USA.) ซึ่งเป็นการตรวจสอบหายาตกค้างโดยหลักการ Competitive microbial receptor assay ระหว่างยาปฏิชีวนะในน้ำนมกับยาปฏิชีวนะในชุดตรวจสอบซึ่งติดฉลากสารกัมมันตภาพรังสี C^{14} และ H^{3} แล้วทำการอ่านผลจากการวัดสารกัมมันตภาพรังสีในตัวอย่างน้ำนม เทียบกับตัวอย่างที่ไม่มียาปฏิชีวนะ (Zero control) และกับตัวอย่างที่ทราบว่ามียาปฏิชีวนะ (Positive control) ด้วยเครื่อง Scintillation counter ชุดตรวจสอบที่ใช้ในการศึกษามีชุดตรวจสอบยาในกลุ่มของยาซัลฟา, β-Lactam, Tetracycline, Aminoglycosides และ Erythromycin

3) การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ **Somatic cell count (SCC)**

ทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ Somatic cell count (SCC) ในตัวอย่างน้ำนมดิบจากโคนมที่มีอาการเต้านมอักเสบ จากเต้าข้างเคียง(Composite quarters) และจากโคนมที่มีสุขภาพปกติ ด้วยเครื่อง Coulter Counting^{R} (Coulter Electronic Inc., USA.) ดังนี้คือ

- เติม Fixative solution(10 ml 35% Formaldehyde solution + 0.02 g Eosine - น้ำกลั่น 90 ml) 0.2 ml ลงในตัวอย่างน้ำนมดิบ 10 ml ภายในเวลา 15 นาที หลังจากการเก็บตัวอย่าง
- แล้วทำการอุ่นที่อุณหภูมิ 30±1 ^{0}C นาน 15-18 ชม. หรือที่อุณหภูมิ 18-25 ^{0}C นาน 22-26 ชม.
- หลังจากอุ่นตัวอย่างตามที่กำหนด ดูดตัวอย่าง 0.1 ml ผสมกับ 9.9 ml Emulsifier mixture (20 ml Triton-X + 125 ml 96% Ethanol + 855 ml 0.9% Normal saline)
- จากนั้นทำการอุ่นที่อุณหภูมิ 80±1 ^{0}C นาน 10 นาที
- เมื่อตัวอย่างเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง (15-25 ^{0}C) ทำการตรวจวัดปริมาณ SCC ด้วยเครื่อง Coulter Counting^{R}

4) การวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ Delvotest-P^{R} และ Microbial inhibition disk assay โดยทำการเปรียบเทียบผลการตรวจสอบจากตัวอย่างที่รู้ว่ามีการใช้ยาปฏิชีวนะกับไม่ได้ใช้ยาปฏิชีวนะ โดยใช้ TWO BY TWO TABLE เพื่อหาค่า Sensitivity และ Specificity รวมทั้งค่า Predictive value of positive test และ Predictive value of negative test ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 TWO BY TWO TABLE

		Sick Animal ได้รับยาปฏิชีวนะ	Well Animal ไม่ได้รับยาปฏิชีวนะ	
ผลการตรวจสอบ	+ ve	A (True positive)	B (False positive)	A+B
	- ve	C (False negative)	D (True negative)	C+D
		A+C	B+D	

Sensitivity = $\frac{A}{A+C} \times 100\ \%$ คือ ประสิทธิภาพในการให้ผลบวกถ้ามีการใช้ยาปฏิชีวนะจริง

Specificity = $\frac{D}{B+D} \times 100\ \%$ คือ ประสิทธิภาพในการให้ผลลบถ้าไม่มียาปฏิชีวนะตกค้างจริง

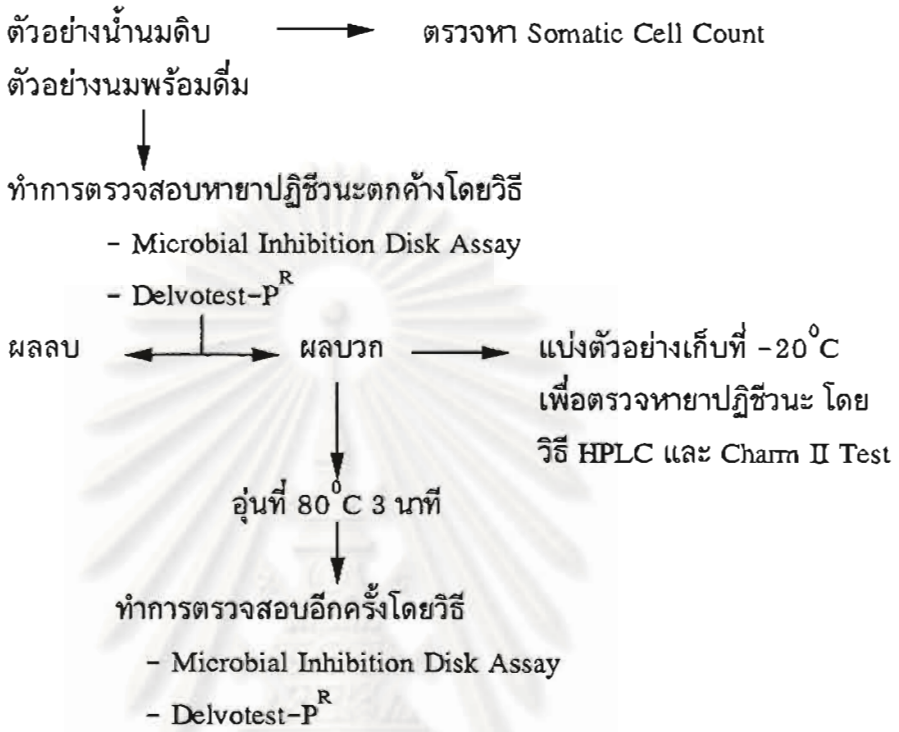
Predictive value (positive test) = $\frac{A}{A+B} \times 100\ \%$ คือ สัดส่วนของผลการทดสอบที่ให้ผลบวกจริงต่อผลการทดสอบบวกทั้งหมด

Predictive value (negative test) = $\frac{D}{C+D} \times 100\ \%$ คือ สัดส่วนของผลการทดสอบที่ให้ผลลบจริงต่อผลการทดสอบลบทั้งหมด

4.2 การวิเคราะห์หาอัตราของผลการตรวจสอบที่ให้ผลบวกก่อนการอุ่นน้ำนมกลับเป็นผลลบหลังการอุ่นน้ำนมที่ 80 ^{o}C นาน 3 นาที(Conversion rate) โดยเหตุผลว่าอุณหภูมิและเวลาดังกล่าวสามารถทำลาย Natural inhibitors ในน้ำนมที่อาจทำให้เกิดผลบวกเท็จแต่อุณหภูมิและเวลาดังกล่าวไม่สามารถทำลายยาปฏิชีวนะได้

4.3 การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของผลการตรวจสอบกับปริมาณของ Somatic cell count โดยการเปรียบเทียบหาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของ Somatic cell count ระหว่างตัวอย่างน้ำนมจากเต้านมอักเสบกับน้ำนมปกติที่ให้ผลบวกและผลลบ ก่อนและหลังการอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่ 80 ^{o}C นาน 3 นาที ใช้การเปรียบเทียบทางสถิติ ANOVA และ T-Test

แผนภูมิแสดงวิธีการดำเนินการวิจัยโดยสรุป



ผลการวิจัย

จำนวนตัวอย่างน้ำนมที่ให้ผลบวกก่อนและหลังการอุ่นที่ 80 °C นาน 3 นาที :

จากจำนวนตัวอย่างน้ำนมพาสเจอร์ไรซ์ 323 ตัวอย่าง ทดสอบโดยวิธี Microbial inhibition disk assay (MIDA) พบว่า ตัวอย่างที่ให้ผลบวกก่อนอุ่นตัวอย่างน้ำนมมีจำนวน 13 ตัวอย่าง (4.02%) และเมื่อนำตัวอย่างน้ำนมไปอุ่นแล้วนำมาทดสอบซ้ำพบว่า ให้ผลบวกเหลือเพียง 1 ตัวอย่าง (0.31%) เท่านั้น อย่างไรก็ตาม เมื่อนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกจำนวน 13 ตัวอย่างนี้ นำมาทดสอบต่อโดยวิธี Delvotest-P^R พบว่า ตัวอย่างน้ำนมทั้งก่อนและหลังอุ่นน้ำนมให้ผลบวก 1 ตัวอย่างเท่ากัน (ตารางที่ 4) แสดงว่าจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกกลับเป็นลบ (Conversion rate) หลังจากการอุ่นน้ำนมมีจำนวน 12 ตัวอย่าง ซึ่งเท่ากับ 92.3% ด้วยวิธี MIDA จากการตรวจสอบยืนยันการตรวจพบยาปฏิชีวนะตกค้างด้วยวิธี HPLC ในตัวอย่างน้ำนมพาสเจอร์ไรซ์ พบยา Sulfamethazine จากหนึ่งตัวอย่างที่ให้ผลบวกหลังการอุ่นสูงถึง 1,496 ng/ml จำนวนตัวอย่างอีก 12 ตัวอย่างได้ทำการตรวจสอบด้วยวิธี Charm II Test พบยาในกลุ่มซัลฟา 1 ตัวอย่าง ยาในกลุ่ม Tetracycline 1 ตัวอย่าง และยาในกลุ่ม β-Lactam 2 ตัวอย่าง

ตัวอย่างน้ำนมยูเอชทีจำนวน 330 ตัวอย่าง ทดสอบโดยวิธี MIDA พบว่า ตัวอย่างน้ำนมที่ให้ผลบวกก่อนอุ่นน้ำนมมีเพียง 2 ตัวอย่าง (0.61%) และเมื่อนำน้ำนมนั้นมาทดสอบซ้ำ

หลังการอุ่นน้ำนม ก็ไม่พบว่ามีตัวอย่างน้ำนมที่ให้ผลบวกเลย นอกจากนี้ ตัวอย่างน้ำนมที่ให้ผลบวกจำนวน 2 ตัวอย่าง นำมาทดสอบโดยวิธี Delvotest-P^{R} ปรากฏว่า ให้ผลไม่แตกต่างกับวิธี Microbial inhibition disk assay (ตารางที่ 5) แสดงว่าจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกกลับเป็นลบ (Conversion rate) เท่ากับ 100% จากการตรวจสอบยืนยันการตรวจพบยาปฏิชีวนะตกค้างด้วยวิธี HPLC และวิธี Charm II Test ในน้ำนมยูเอชที ซึ่งให้ผลบวกก่อนการอุ่นตัวอย่างน้ำนม 2 ตัวอย่าง ไม่พบยาปฏิชีวนะตกค้าง

ตัวอย่างน้ำนมดิบจากถังนมรวมของเกษตรกรจำนวน 515 ตัวอย่าง ทดสอบโดยวิธี MIDA และ Delvotest-P^{R} พบว่าตัวอย่างที่ให้ผลบวกก่อนอุ่นน้ำนมมี 56 ตัวอย่าง (10.9%) และ 19 ตัวอย่าง (3.7%) ตามลำดับ และเมื่อนำน้ำนมมาทดสอบซ้ำหลังการอุ่นน้ำนมจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกลดลงเหลือ 19 ตัวอย่าง (3.7%) และ 11 ตัวอย่าง (2.1%) ตามลำดับ (ตารางที่ 6) แสดงว่าจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกกลับเป็นลบ (Conversion rate) หลังการอุ่นน้ำนมมีจำนวน 37 ตัวอย่าง (66.1%) ในการทดสอบด้วยวิธี MIDA และ 8 ตัวอย่าง (42.1%) ในการทดสอบด้วย Delvotest-P^{R} การตรวจสอบยืนยันการตรวจพบยาปฏิชีวนะตกค้างด้วยวิธี HPLC ในตัวอย่างน้ำนมดิบจากถังนมรวมของเกษตรกรซึ่งให้ผลบวกก่อนการอุ่นตัวอย่างน้ำนมจำนวน 56 ตัวอย่าง พบว่ามียาปฏิชีวนะ Benzyl penicillin ในน้ำนมดิบที่ให้ผลบวกหลังการอุ่นตัวอย่าง 5 ตัวอย่าง ในปริมาณ 50,178,285,357 และ 1780 ng/ml สำหรับตัวอย่างน้ำนมอีก 51 ตัวอย่าง ได้ทำการตรวจสอบด้วยวิธี Charm II Test พบยาตกค้างในตัวอย่างที่ให้ผลบวกหลังการอุ่นตัวอย่างที่เหลืออีก 11 ตัวอย่างจาก 14 ตัวอย่าง เป็นยาในกลุ่ม β-Lactam 8 ตัวอย่างยาในกลุ่ม Tetracycline 2 ตัวอย่าง และยาในกลุ่ม Erythromycin 1 ตัวอย่าง สำหรับตัวอย่างน้ำนมที่ให้ผลบวกก่อนการอุ่นอีก 37 ตัวอย่าง เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี Charm II Test พบว่ามียาในกลุ่ม Tetracycline 5 ตัวอย่าง และ β-Lactam 5 ตัวอย่าง

ตัวอย่างน้ำนมดิบจากโคนมที่มีสุขภาพปกติจำนวน 200 ตัวอย่าง ทดสอบโดยวิธี MIDA และ Delvotest-P^{R} พบว่าตัวอย่างที่ให้ผลบวกก่อนการอุ่นน้ำนมมี 15 ตัวอย่าง (7.5%) ทั้งสองการทดสอบ และเมื่อนำน้ำนมมาทดสอบซ้ำหลังการอุ่นน้ำนม จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกลดลงเหลือ 2 ตัวอย่าง (1.0%) และ 5 ตัวอย่าง (2.5%) ตามลำดับ (ตารางที่ 7) แสดงว่าจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกกลับเป็นผลลบ (Conversion rate) หลังการอุ่นน้ำนมมีจำนวน 13 ตัวอย่าง (86.7%) ในการทดสอบด้วยวิธี MIDA และ 10 ตัวอย่าง (66.7%) ในการทดสอบด้วย Delvotest-P^{R} จากการตรวจสอบยืนยันการตรวจพบยาปฏิชีวนะด้วยวิธี HPLC ในน้ำนมโคปกติที่ให้ผลบวกก่อนการอุ่นตัวอย่างน้ำนม จำนวน 15 ตัวอย่าง ไม่พบยาปฏิชีวนะตกค้าง แต่เมื่อทำการตรวจสอบด้วยวิธี Charm II Test พบว่ายาปฏิชีวนะตกค้างในตัวอย่างน้ำนมที่ให้ผลบวกหลังการอุ่นตัวอย่างน้ำนม เป็นยาในกลุ่ม β-Lactam 1 ตัวอย่าง และยาในกลุ่ม Tetracycline 1 ตัวอย่าง

ตัวอย่างน้ำนมดิบจากโคนมที่มีอาการเต้านมอักเสบและกำลังรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ จำนวน 87 ตัวอย่าง ทดสอบโดยวิธี MIDA และ Delvotest-P^{R} พบว่าตัวอย่างที่ให้ผลบวกก่อนการอุ่นน้ำนมมี 86 ตัวอย่าง (98.9%) และ 81 ตัวอย่าง (93.1%) ตามลำดับ และเมื่อนำน้ำนมมาทดสอบซ้ำหลังการอุ่นน้ำนม จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกลดลงเหลือ 75 ตัวอย่าง (86.2%) และ 70 ตัวอย่าง (80.5%) ตามลำดับ (ตารางที่ 8) แสดงว่าการอุ่นตัวอย่างที่ 80 ^{o}C นาน 3 นาที สามารถทำให้การตรวจสอบหายาปฏิชีวนะโดยวิธี MIDA และ Delvotest-P^{R} แสดงผลลบเท็จ (False negative) เพิ่มขึ้น 12.79% (11 ตัวอย่างจาก 86 ตัวอย่าง) และ 13.58% (11 ตัวอย่างจาก 81 ตัวอย่าง) ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างน้ำนมดิบจากเต้านมข้างเคียง (Composite quarters)จำนวน 219 ตัวอย่าง ของโคนมที่กำลังรักษาอาการเต้านมอักเสบของเต้าอื่นโดยการฉีดยาเข้าเต้า ทดสอบโดยวิธี MIDA และ Delvotest-P^{R} พบว่าตัวอย่างที่ให้ผลบวกก่อนการอุ่นตัวอย่างน้ำนมมี 54 ตัวอย่าง (24.7%) และ 42 ตัวอย่าง (19.2%) ตามลำดับ และเมื่อนำน้ำนมมาทดสอบซ้ำหลังการอุ่นน้ำนม จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกลดลงเหลือ 11 ตัวอย่าง (5.0%) และ 26 ตัวอย่าง(11.9%) ตามลำดับ (ตารางที่ 9) แสดงว่ายาปฏิชีวนะชนิดฉีดเข้าเต้านมสามารถตรวจพบในเต้านมข้างเคียง (composite quarters) ได้อย่างน้อย 5.0-11.9% จากการตรวจสอบยืนยันการตรวจพบยาปฏิชีวนะตกค้างด้วยวิธี HPLC พบยาที่ปฏิชีวนะที่สามารถตรวจสอบได้ตามวิธีการที่ใช้ในการศึกษานี้ Benzyl penicillin เกิน Detection limit 7 ตัวอย่าง อยู่ในปริมาณ 250, 852, 1299, 1330, 1375, 1550 และ 1800 ng/ml ตัวอย่างน้ำนมในกลุ่มนี้ ไม่ได้ทำการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะด้วยวิธี Charm II Test

ตัวอย่างน้ำนมดิบจากเต้านมที่มีอาการอักเสบก่อนให้ยาปฏิชีวนะจำนวน 50 ตัวอย่าง ทดสอบโดยวิธี MIDA และ Delvotest-P พบว่าตัวอย่างที่ให้ผลบวกก่อนอุ่นน้ำนมมี 32 ตัวอย่าง (64.0%) และ 25 ตัวอย่าง (50.0%) ตามลำดับ และเมื่อนำน้ำนมมาทดสอบซ้ำหลังการอุ่นน้ำนม จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกลดลงเหลือ 4 ตัวอย่าง (8.0%) และ 2 ตัวอย่าง (4.0%) ตามลำดับ การตรวจสอบยืนยันการตรวจพบยาปฏิชีวนะตกค้างด้วยวิธี HPLC ไม่พบยาปฏิชีวนะชนิดที่ระบุไว้ในวิธีดำเนินการวิจัย แสดงว่าจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกกลับเป็นลบ (Conversion rate) หลังการอุ่นน้ำนมมีจำนวน 28 ตัวอย่าง (87.5%) ในการทดสอบด้วยวิธี MIDA และ 23 ตัวอย่าง (92.0%) ในการทดสอบด้วย Delvotest-P^{R}

ตารางที่ 4 จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมพร้อมดื่ม พาสเจอไรซ์โดยวิธี Microbial inhibition disk assay และ Delvotest-P®

ช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	Microbial inhibition disk assay		Delvotest-P®	
		Pre-Heat	Post-Heat	Pre-Heat	Post-Heat
กรกฎาคม 2537	9	0	0	0	-
สิงหาคม 2537	35	0	0	0	0
กันยายน 2537	36	4	0	1	1
ตุลาคม 2537	30	2	0	0	-
พฤศจิกายน 2537	36	0	0	-	-
ธันวาคม 2537	76	2	0	0	-
มกราคม 2538	38	4	1	0	-
กุมภาพันธ์ 2538	26	1	0	0	-
มีนาคม 2538	-	-	-	-	-
เมษายน 2538	-	-	-	-	-
พฤษภาคม 2538	16	0	0	-	-
มิถุนายน 2538	21	0	0	-	-
รวมจำนวน	323	13	1	1	1
%ผลบวก		4.02	0.31	0.31	0.31

(- คือ ไม่ได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำนม หรือ ไม่ได้ทำการตรวจวิเคราะห์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมพร้อมดื่มยูเอชทีโดยวิธี Microbial inhibition disk assay และ Delvotest-P®

ช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	Microbial inhibition disk assay		Delvotest-P®	
		Pre-Heat	Post-Heat	Pre-Heat	Post-Heat
กรกฎาคม 2537	19	0	0	0	-
สิงหาคม 2537	52	0	0	0	0
กันยายน 2537	36	0	0	0	0
พฤศจิกายน 2537	119	2	0	2	0
ธันวาคม 2537	65	0	0	-	-
มกราคม 2538	12	0	0	-	-
กุมภาพันธ์ 2538	-	-	-	-	-
มีนาคม 2538	-	-	-	-	-
เมษายน 2538	-	-	-	-	-
พฤษภาคม 2538	18	0	0	-	-
มิถุนายน 2538	9	0	0	-	-
รวมจำนวน	330	2	0	2	0
% ผลบวก	330	0.61	0.0	0.51	0.0

(- คือ ไม่ได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำนม หรือ ไม่ได้ทำการตรวจวิเคราะห์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมดิบจากถังนมรวมของเกษตรกรที่ส่งมาโรงรับนม โดยวิธี Microbial inhibition disk assay และ Delvotest-P®

ช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	Microbial inhibition disk assay		Delvotest-P®	
		Pre-Heat	Post-Heat	Pre-Heat	Post-Heat
กรกฎาคม 2537	33	0	0	-	-
สิงหาคม 2537	23	1	0	0	0
ตุลาคม 2537	36	1	1	1	1
พฤศจิกายน 2537	48	11	1	1	1
ธันวาคม 2537	74	23	4	5	2
มกราคม 2538	70	14	10	4	4
กุมภาพันธ์ 2538	32	0	0	-	-
มีนาคม 2538	48	0	0	2	0
เมษายน 2538	29	0	0	-	-
พฤษภาคม 2538	48	2	2	2	2
มิถุนายน 2538	74	4	1	4	1
รวมจำนวน	515	56	19	19	11
% ผลบวก		10.9	3.7	3.7	2.1

(- คือ ไม่ได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำนม หรือ ไม่ได้ทำการตรวจวิเคราะห์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมดิบจากโคนมปกติที่ไม่มีการใช้ยาปฏิชีวนะ โดยวิธี Microbial inhibition disk assay และ Delvotest-P®

ช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	Microbial inhibition disk assay		Delvotest-P®	
		Pre-Heat	Post-Heat	Pre-Heat	Post-Heat
สิงหาคม 2537	5	1	0	0	0
กันยายน 2537	15	0	0	0	0
ตุลาคม 2537	7	0	0	0	0
พฤศจิกายน 2537	2	1	1	1	1
กุมภาพันธ์ 2538	15	2	0	3	1
มีนาคม 2538	16	0	0	5	2
เมษายน 2538	44	3	0	3	0
พฤษภาคม 2538	51	5	0	0	0
มิถุนายน 2538	45	3	1	3	1
รวมจำนวน	200	15	2	15	5
% ผลบวก		7.5	1.0	7.5	2.5

(- คือ ไม่ได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำนม หรือ ไม่ได้ทำการตรวจวิเคราะห์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 จำนวนตัวอย่างที่บวกจากการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมดิบจากเต้านมที่มีอาการเต้านมอักเสบและกำลังรักษาด้วยยาปฏิชีวนะโดยวิธี Microbial inhibition disk assay และ Delvotest-P^{R}

ช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	Microbial inhibition disk assay		Delvotest-P^{R}	
		Pre-Heat	Post-Heat	Pre-Heat	Post-Heat
สิงหาคม 2537	12	12	12	12	12
ตุลาคม 2537	11	11	5	8	4
พฤศจิกายน 2537	6	6	5	4	2
ธันวาคม 2537	2	2	2	2	2
มกราคม 2538	10	10	10	10	9
กุมภาพันธ์ 2538	15	14	14	14	14
มีนาคม 2538	8	8	8	8	8
เมษายน 2538	7	7	6	7	6
พฤษภาคม 2538	9	9	6	9	6
มิถุนายน 2538	7	7	7	7	7
รวมจำนวน	87	86	75	81	70
% ผลบวก		98.9	86.2	93.1	80.5

(- คือ ไม่ได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำนม หรือ ไม่ได้ทำการตรวจวิเคราะห์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมดิบจากเต้านมที่ไม่มีอาการเต้านมอักเสบ (Composite Quarters) ของโคนมที่กำลังรักษาอาการเต้านมอักเสบของเต้าอื่นโดยการฉีดยาเข้าเต้าโดยวิธี Microbial inhibition disk assay และ Delvotest-P®

ช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	Microbial inhibition disk assay		Delvotest-P®	
		Pre-Heat	Post-Heat	Pre-Heat	Post-Heat
สิงหาคม 2537	36	21	5	14	10
พฤศจิกายน 2537	43	10	0	8	1
ธันวาคม 2537	14	8	2	-	-
กุมภาพันธ์ 2538	43	9	0	9	6
มีนาคม 2538	40	2	2	10	8
เมษายน 2538	21	3	1	0	0
พฤษภาคม	23	0	0	0	0
มิถุนายน	19	1	1	1	1
รวมจำนวน	219	54	11	42	26
% ผลบวก	219	24.7	5	19.2	11.9

(- คือ ไม่ได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำนม หรือ ไม่ได้ทำการตรวจวิเคราะห์)

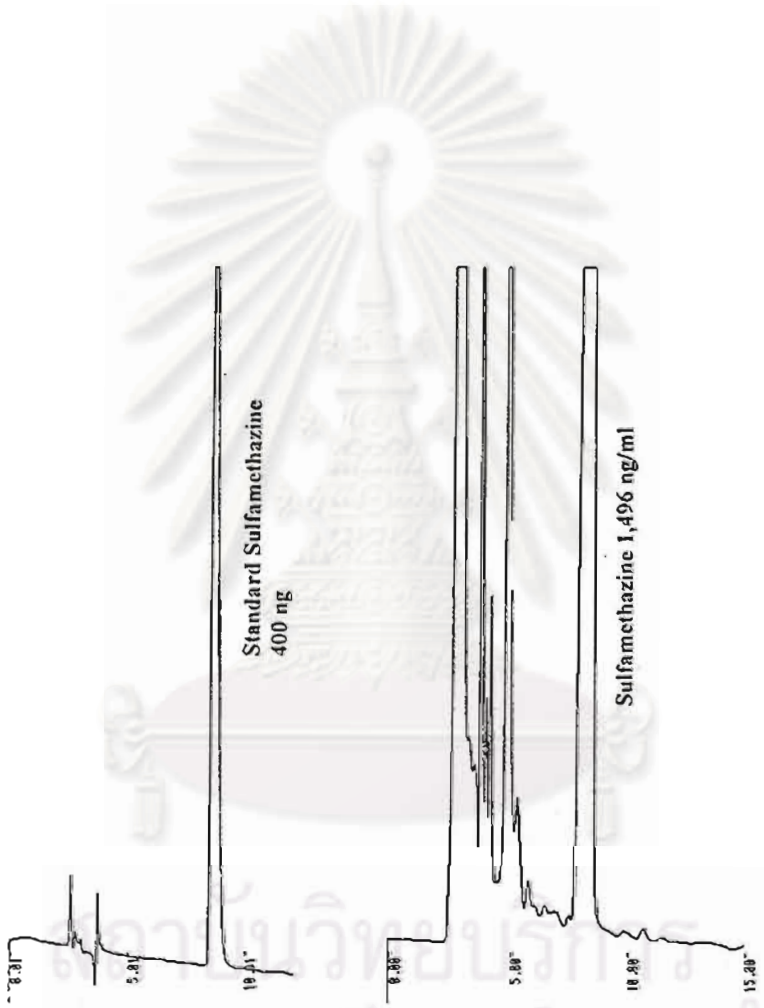
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมดิบจากเต้านมที่มีอาการเต้านมอักเสบก่อนให้ยาปฏิชีวนะโดยวิธี Microbial inhibition disk assay และ Delvotest-P^{R}

ช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	Microbial inhibition disk assay		Delvotest-P^{R}	
		Pre-Heat	Post-Heat	Pre-Heat	Post-Heat
ตุลาคม 2537	7	6	3	2	1
พฤศจิกายน 2537	3	0	0	1	1
มกราคม 2538	4	0	0	0	0
กุมภาพันธ์ 2538	5	2	1	1	0
มีนาคม 2538	-	-	-	-	-
เมษายน 2538	-	-	-	-	-
พฤษภาคม 2538	19	12	0	10	0
มิถุนายน 2538	12	12	0	11	0
รวมจำนวน	50	32	4	25	2
% ผลบวก		64	8	50	4

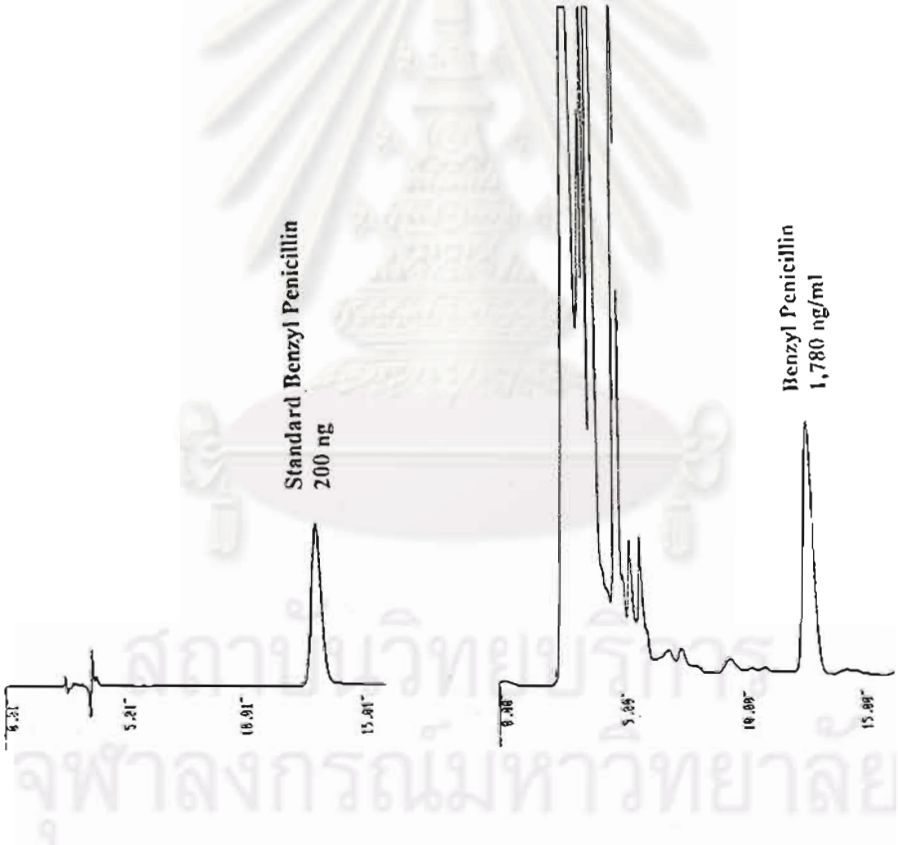
(- คือ ไม่ได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำนม หรือ ไม่ได้ทำการตรวจวิเคราะห์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 1 Chromatogram ของ HPLC แสดงการตรวจพบ Sulfamethazine 1,496 ng/ml ในตัวอย่างน้ำนมพร้อมดื่มพาสเจอร์ไรซ์

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 2 Chromatogram ของ HPLC แสดงการตรวจพบ Benzyl Penicillin 1,780 ng/ml ในตัวอย่างน้ำนมดิบจากถังนมรวมของเกษตรกรที่มาส่งโรงนม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปริมาณของ Somatic cell count ต่อผลการตรวจสอบยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนม ด้วยวิธี Microbial inhibition disk assay และ Delvotest-P^{R} :

ตัวอย่างน้ำนมดิบจากโคนมที่มีอาการเต้านมอักเสบก่อนการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ 37 ตัวอย่าง ตัวอย่างน้ำนมดิบที่กำลังรักษาด้วยยาปฏิชีวนะชนิดฉีดเข้าเต้านม (Intramammary infusion) 41 ตัวอย่าง และตัวอย่างน้ำนมดิบจากเต้านมข้างเคียง(Composite quarters) 109 ตัวอย่าง รวมทั้งตัวอย่างน้ำนมดิบจากโคนมปกติที่ไม่มีการใช้ยาใด ๆ ในระยะ 21 วันที่ผ่านมา 134 ตัวอย่าง เมื่อทำการแยกตัวอย่างน้ำนมแต่ละกลุ่มที่ทดสอบด้วย Microbial inhibition disk assay ให้ผลลบ ให้ผลบวกก่อนการอุ่นตัวอย่างที่ 80 ^{0}C นาน 3 นาที และที่ให้ผลบวกหลังจากการอุ่นตัวอย่าง แล้วทำการวิเคราะห์ด้วย ANOVA ผลปรากฏว่าปริมาณ Somatic cell count (SCC) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p = 0.15 ถึง 0.99) (ตารางที่ 11)

ในทำนองเดียวกันเมื่อทำการแยกตัวอย่างน้ำนมกลุ่มที่ทดสอบด้วย Delvotest-P^{R} แล้วทำการวิเคราะห์ด้วย ANOVA และ *t*-Test (สำหรับตัวอย่างน้ำนมจากโคนมที่มีอาการเต้านมอักเสบก่อนการรักษา) พบว่าปริมาณของ SCC ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน (p = 0.6 ถึง 0.79) (ตารางที่ 12)

แสดงว่าปริมาณของ SCC น่าจะไม่มีอิทธิพลต่อการให้ผลบวกเท็จหรือผลลบเท็จของการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมดิบ ด้วยวิธี Microbial inhibition disk assay และ Delvotest-P^{R}

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 ค่าเฉลี่ย (x ± SD) ปริมาณ Somatic cell count (x10 ^{3}) ของตัวอย่างน้ำนมดิบจากโคนมที่มีอาการเต้านมอักเสบและโคนมที่มีสุขภาพปกติ ซึ่งให้ผลการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะโดยวิธี Microbial inhibition disk assay

ชนิดของตัวอย่างน้ำนม	Microbial inhibition disk assay			p
	ผลลบ	ผลบวก (ก่อนอุ่น)	ผลบวก (หลังอุ่น)	
เต้านมอักเสบ (ก่อนการรักษา)	9045±10027 (n = 10)	7955±8540 (n = 26)	20000 (n = 1)	0.18
เต้านมอักเสบ (ระหว่างการรักษา)	11813 (n = 1)	11325±8401 (n = 6)	6613±7124 (n = 34)	0.19
เต้านมช้างเคียง (Composite quarters)	2640±4793 (n = 90)	3326±6813 (n = 15)	2633±4903 (n = 4)	0.15
โคนมปกติ	1038±1614 (n = 120)	1028±2062 (n = 13)	951 (n = 1)	0.99

ตารางที่ 12 ค่าเฉลี่ย (x ± SD) ปริมาณ Somatic cell count (x10 ^{3}) ของตัวอย่างน้ำนมดิบจากโคนมที่มีอาการเต้านมอักเสบและโคนมที่มีสุขภาพปกติ ซึ่งให้ผลการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะโดยวิธี Delvotest-P^{R}

ชนิดของตัวอย่างน้ำนม	Delvotest-P^{R}			p
	ผลลบ	ผลบวก (ก่อนอุ่น)	ผลบวก (หลังอุ่น)	
เต้านมอักเสบ (ก่อนการรักษา)	9853±7824 (n = 14)	11804±14212 (n = 22)	-	0.60
เต้านมอักเสบ (ระหว่างการรักษา)	12093±11183 (n = 6)	6791±6647 (n = 45)	7599±7680 (n = 41)	0.70
เต้านมช้างเคียง (Composite quarters)	2633±4903 (n = 81)	3744±3144 (n = 20)	4331±8371 (n = 15)	0.50
โคนมปกติ	1009±2278 (n = 49)	408±326 (n = 14)	355 (n = 1)	0.79

ประสิทธิภาพและความน่าเชื่อถือของการตรวจสอบยาปฏิชีวนะในน้ำนมโดยวิธี Microbial inhibition disk assay และ Delvotest-P^{R} :

การตรวจสอบหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมดิบจากโคนมที่มีอาการเต้านมอักเสบและกำลังรักษาด้วยยาปฏิชีวนะชนิดฉีดเข้าเต้านม (Intramammary infusion) จำนวน 87 ตัวอย่าง และในน้ำนมดิบจากโคนมที่มีสุขภาพปกติและไม่มีการใช้ยาปฏิชีวนะหรือยาชนิดอื่นใดในระยะเวลา 21 วันที่ผ่านมาจำนวน 200 ตัวอย่าง ทำการตรวจสอบโดยไม่ทำการอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่ 80 ^{o}C นาน 3 นาที วิธี Microbial inhibition disk assay พบว่าการทดสอบนี้มีค่า Sensitivity 98.85% และ Specificity 92.50% สำหรับ Predictive value of positive 85.15% และ Predictive valve of negative test 99.46% (ตารางที่ 13)

การตรวจสอบหายาปฏิชีวนะตกค้างในตัวอย่างน้ำนมดิบกลุ่มเดียวกัน โดยไม่ทำการอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่ 80 ^{o}C นาน 3 นาที วิธี Delvotest-P^{R} พบว่าการทดสอบนี้มีค่า Sensitivity ต่ำกว่าวิธี MIDA คือ 93.10% และ Specificity เท่ากับวิธี MIDA คือ 92.50% สำหรับ Predictive value of positive test และ Predictive value of negative test ต่ำกว่าวิธี MIDA คือ 84.38% และ 96.86% ตามลำดับ (ตารางที่ 14)

ดังนั้น ผลลบเท็จ (False negative) คำนวณจากค่า Sensitivity พบว่า Delvotest-P^{R} สูงกว่าวิธี MIDA คือ 6.90% (6 ตัวอย่างจาก 87 ตัวอย่าง) และ 1.15% (1 ตัวอย่างจาก 87 ตัวอย่าง) ตามลำดับ ส่วนการให้ผลบวกเท็จ (False positive) คำนวณจากค่า Specificity พบว่า MIDA เท่ากับ Delvotest-P^{R} คือ 7.5% (15 ตัวอย่างจาก 200 ตัวอย่าง)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 13 ผลการตรวจสอบยาปฏิชีวนะตกค้างในตัวอย่างน้ำนมดิบจากโคนมที่กำลังรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ (Treated mastitic cows) และโคนมที่ไม่ได้รับยาใด ๆ (Healthy cows) โดยวิธี Microbial inhibition disk assay (MIDA) ก่อนการอุ่นตัวอย่างน้ำนม

		Treated mastitis	Healthy cows	รวมจำนวน
ผลการตรวจสอบ MIDA	บวก	86	15	101
	ลบ	1	185	186
รวมจำนวนตัวอย่าง		87	200	287

MIDA :

Sensitivity = (86/87) * 100 = 98.85%

Specificity = (185/200) * 100 = 92.50%

Predictive value of + ve test = (86/101) * 100 = 85.15%

Predictive value of - ve test = (185/186) * 100 = 99.46%

ตารางที่ 14 ผลการตรวจสอบยาปฏิชีวนะตกค้างในตัวอย่างน้ำนมดิบจากโคนมที่กำลังรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ(Treated mastitic cows) และโคนมที่ไม่ได้รับยาใด ๆ (Healthy cows) โดยวิธี Delvotest-P^{R} ก่อนการอุ่นตัวอย่างน้ำนม

		Treated mastitis	Healthy cows	รวมจำนวน
ผลการตรวจสอบ Delvotest-P^{R}	บวก	81	15	96
	ลบ	6	185	191
รวมจำนวนตัวอย่าง		87	200	287

Delvotest-P^{R} :

Sensitivity = (81/87) * 100 = 93.10%

Specificity = (185/200) * 100 = 92.50%

Predictive value of - ve test = (81/96) * 100 = 84.38%

Predictive value of - ve test = (185/191) * 100 = 96.86%

I 20121398.

การอภิปรายผล

ผลของการอุ่นตัวอย่างน้ำนมก่อนการทดสอบหายาปฏิชีวนะในน้ำนม :

ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่า ตัวอย่างน้ำนมพร้อมดื่มพาสเจอร์ไรซ์ ยูเอชที ตัวอย่างน้ำนมดิบจากถังนมรวมของเกษตรกร จากโคนมที่มีสุขภาพปกติ และจากโคนมที่มีอาการเต้านมอักเสบที่มีอาการเต้านมอักเสบก่อนการรักษาให้ผลการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะ ด้วยวิธี Microbial inhibition disk assay และ Delvotest-P^{R} ว่าเป็นผลบวกลดลงหลังจากการอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ 80 ^{o}C นาน 3 นาที ดังผลที่แสดงในตารางที่ 4-7 และ 9-10 โดยตัวอย่างที่ให้ผลบวกกลับเป็นผลลบหลังการอุ่นตัวอย่าง (Conversion rate) เท่ากับ 92.3 %, 100 %, 42.1-66.1 %, 66.7-86.7 % และ 87.5-92.0 % ตามลำดับ

การให้ผลบวกเท็จนั้นอาจมีสาเหตุจากความบกพร่องในการทดสอบในห้องปฏิบัติการ เช่น อุณหภูมิใน Incubator หรือ Water bath ไม่สม่ำเสมอ หรือชุดตรวจสอบที่ใช้เสื่อมสมรรถภาพ เนื่องจากการเก็บรักษาไม่ถูกต้อง เป็นต้น ทั้งนี้ข้อบกพร่องที่อาจเกิดขึ้นเหล่านี้สามารถตรวจสอบและแก้ไขได้ เช่น โดยการมีตัวอย่างที่รู้แน่ชัดว่าไม่มียาปฏิชีวนะและตัวอย่างที่เติมยาปฏิชีวนะลงไป (Negative และ Positive controls) ร่วมในการตรวจสอบแต่ละครั้งเสมอ เป็นต้น การให้ผลบวกเท็จในการตรวจสอบยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมอาจจะมีสาเหตุจากสารธรรมชาติในน้ำนมที่เรียกว่า Natural inhibitors ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งเรื่องนี้ Okada (1986) ได้รายงานการทดสอบน้ำนมจากโคนมที่มีสุขภาพปกติ 540 ตัว โดยวิธี Microbial inhibitor disk assay พบว่าให้ผลบวก 10.2 % ซึ่งการเกิดผลบวกนี้มีสาเหตุจากระดับของ Lactoferrin ที่สูงกว่า 0.49±0.14 mg/ml ดังนั้น จึงได้มีการศึกษาและหาข้อสรุปได้ว่า การอุ่นน้ำนมที่ 80 ^{o}C นาน 3 นาที สามารถทำลาย Natural inhibitors ได้ (Oliver และคณะ, 1990) Amonsin และคณะ (1994) ก็ได้ทำการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะในน้ำนมดิบจำนวน 1,822 ตัวอย่าง โดยวิธี Microbial Inhibition Disk Assay พบว่าให้ผลบวก 10.3 % แต่หลังจากทำการอุ่นตัวอย่างน้ำนมดิบที่ 80 ^{o}C นาน 5 นาที แล้ว พบว่าตัวอย่างที่ให้ผลบวกลดเหลือเพียง 3 % เท่านั้น

ในการตรวจสอบการยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมโดยใช้ Delvotest-P^{R} ของ Carlson และคณะ (1989) ได้รายงานว่าปริมาณของ Lactoferrin และ Lysozyme ในน้ำนม ซึ่งคือ Natural inhibitors มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญในการให้ผลบวก ดังนั้น การอุ่นน้ำนมที่ 80 ^{o}C นาน 3 นาที เพื่อทำลาย Natural inhibitors ตามคำแนะนำของ Oliver และคณะ (1990) จึงน่าจะนำมาใช้ก่อนการตรวจสอบหาสารปฏิชีวนะในน้ำนมด้วยชุดตรวจสอบ Delvotest-P^{R} โดยที่อุณหภูมิและระยะเวลาดังกล่าวไม่มีผลต่อการเสื่อมสลายของยาปฏิชีวนะ

อย่างไรก็ดี เป็นที่น่าสังเกตว่า ตัวอย่างน้ำนมจากโคนมที่มีอาการเต้านมอักเสบ และกำลังรักษาด้วยยาปฏิชีวนะเมื่อทำการอุ่นตัวอย่างน้ำนมแล้วจะมีผลทำให้การทดสอบด้วยวิธี MIDA

และ Delvotest-P^{R} ให้มีผลลบเท็จ (False negative) เพิ่มขึ้นได้ถึง 12.8-13.6% (ตารางที่ 8) ดังนั้น การอุ่นตัวอย่างน้ำนมก่อนการทดสอบหายาปฏิชีวนะตกค้างอาจทำลายคุณสมบัติการยับยั้งแบคทีเรียของยาปฏิชีวนะที่ตกค้างในน้ำนมได้เช่นกัน

รวมทั้งตัวอย่างพาสเจอร์ไรซ์และตัวอย่างน้ำนมดิบจากถังนมรวมของเกษตรกรซึ่งให้ผลลบในการตรวจหายาปฏิชีวนะตกค้างจากการตรวจด้วยวิธี MIDA และ Delvotest-P^{R} หลังจากการอุ่นตัวอย่างน้ำนม แต่ให้ผลบวกจากการตรวจสอบด้วยวิธี Charm II Test อาจตั้งสมมุติฐานได้ว่า การอุ่นตัวอย่างน้ำนมสามารถทำลายยาปฏิชีวนะตกค้างบางส่วนจนต่ำกว่า Minimal detection limits ของ MIDA และ Delvotest-P^{R} แต่ยังสามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธี Charm II Test ถ้าผลบวกจากวิธี Charm II Test มิได้เกิดจากการตกตะกอนของโปรตีนในน้ำนมซึ่งอาจมีผลต่อการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีดังกล่าว สำหรับตัวอย่างน้ำนมที่ให้ผลบวกจากการตรวจด้วยวิธี MIDA และ Delvotest-P^{R} หลังจากการอุ่นตัวอย่างน้ำนม แต่ให้ผลลบจากการตรวจด้วยวิธี Charm II Test อีก 3 ตัวอย่าง อาจมียาปฏิชีวนะตกค้างในกลุ่มที่มิได้ทำการตรวจสอบ เช่น Chloramphenicol เป็นต้น

ปริมาณของ Somatic cell count ต่อผลการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะตกค้าง :

การให้ผลบวกเท็จอาจมีสาเหตุจากตัวอย่างน้ำนมที่ตรวจสอบนั้นมาจากโคนมที่กำลังมีปัญหาเต้านมอักเสบด้วยก็ได้ ซึ่ง Eenennaam และคณะ (1993) ได้ทดสอบชุดตรวจสอบหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนม 5 ชนิด รวมทั้ง Delvotest-P^{R} พบว่ากลุ่มตัวอย่างที่มีค่าเฉลี่ยปริมาณ Somatic cell count สูง จะมีอัตราของผลบวกเท็จสูงกว่า นอกจากนี้ Okada (1986) ก็เคยรายงานว่า พบผลบวกเท็จเพิ่มสูงขึ้นจากการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะในน้ำนมโดยใช้วิธี Microbial inhibition disk assay ถ้าน้ำนมที่ตรวจมีปริมาณ Somatic cell count เกิน 300,000/ml

เหตุผลที่สนับสนุนรายงานของ Eenennaam และคณะ (1993) และ Okada (1986) สามารถนำการศึกษาของ Korhonen (1977) ซึ่งพบว่าน้ำนมจากเต้านมอักเสบของโคจะมีปริมาณของ Natural inhibitors คือ Lysozyme 0.5-3 μg/ml และ Lactoferrin อาจสูงถึง 8,000 μg/ml (จากค่าในน้ำนมปกติ 0.1-0.2 μg/ml และ 20-350 μg/ml ตามลำดับ) ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าปริมาณของ Somatic cell count ไม่มีผลโดยตรงต่อการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะโดยวิธี Microbial inhibition disk assay และ Delvotest-P^{R} แต่เป็นผลจากปริมาณของ Natural inhibitors ซึ่งสูงขึ้นในเต้านมที่มีอาการอักเสบ

จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าปริมาณของ Somatic cell count ไม่สามารถแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มตัวอย่างน้ำนมดิบที่ให้ผลลบกับกลุ่มตัวอย่างที่ผลบวกก่อนการอุ่นและผลบวกหลังการอุ่นน้ำนม (ตารางที่ 11 และ 12) แต่สามารถยืนยันว่าการอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ 80 ^{o}C นาน 3 นาที เพื่อทำลาย Natural inhibiors จะสามารถลดผลการทดสอบที่อาจให้ผลบวกเท็จลงได้ 87.5% และ 92.0% ในตัวอย่างน้ำนมดิบจากโคนมที่มีอาการเต้านม

อักเสบก่อนการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ สำหรับการทดสอบโดยวิธี Microbial inhibition disk assay และ Delvotest-P^{R} ตามลำดับ

ประสิทธิภาพและความน่าเชื่อถือของ Microbial inhibition disk assay และ Delvotest-P^{R} :

การตรวจสอบหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมดิบโดยวิธี Microbial inhibition disk assay พบว่ามีค่า Sensitivity หรือ ประสิทธิภาพในการให้ผลบวกจริง 98.85% สูงกว่าการใช้ชุดตรวจสอบ Delvotest-P^{R} ซึ่งมีค่า Sensitivity 93.10% สำหรับค่า Specificity หรือประสิทธิภาพในการให้ผลลบจริงนั้นเท่ากันคือ 92.50% ทั้งนี้เนื่องจากวิธี Microbial inhibition disk assay ใช้เชื้อสำหรับการทดสอบมากชนิดกว่าและในอาหารเลี้ยงเชื้อหลายประเภทในสถานภาพต่าง ๆ หลายสถานภาพ และทำการอ่านผลบวกเมื่อมีปรากฏการณ์ของ Clear zone ในเชื้อใดเชื้อหนึ่งหรือในสถานภาพใดสถานภาพหนึ่ง ขณะที่ Delvotest-P^{R} ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus stearothermophilus* เพียงชนิดเดียวในการทดสอบ

Predictive value of posititive test คือ ความน่าจะเป็น (Probability) ของจำนวนตัวอย่างที่ทำการตรวจสอบพบว่าให้ผลบวกถ้ามีการใช้ยาปฏิชีวนะ ในการศึกษานี้พบว่า ทั้ง Microbial inhibition disk assay และ Delvotest-P^{R} ไม่มีความแตกต่างกันมากนัก คือเท่ากับ 85.15% และ 84.38% ตามลำดับ ส่วน Predictive value of negative test คือ ความน่าจะเป็น (Probability) ของจำนวนตัวอย่างที่ทำการตรวจสอบพบว่าให้ผลลบถ้าไม่มีการใช้ยาปฏิชีวนะ พบว่า Microbial inhibition disk assay มีค่านี้สูงกว่าการใช้ Delvotest-P^{R} คือ 99.46% และ 96.86% ตามลำดับ

ดังนั้น การตรวจสอบหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมโดยวิธี Microbial inhibition disk assay จึงน่าจะมีประสิทธิภาพและความน่าเชื่อถือสูงกว่าการใช้ Delvotest-P^{R} แต่ทั้งนี้ Delvotest-P^{R} จะมีความสะดวกรวดเร็วกว่า ซึ่งอาจจะเป็นวิธีการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมที่เหมาะสมกว่าวิธี Microbial inhibition disk assay ในกรณีที่อุบัติการ (Prevalence) ของยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมลดลง เนื่องจากโอกาสให้ผลลบเท็จจะลดลง

การพบผลบวกจากการตรวจสอบยืนยันด้วยวิธี Charm II Test ในน้ำนมโคปกติ 3 ตัวอย่าง อาจเป็นไปได้จากสาเหตุต่าง ๆ เช่น โคนมบางตัวมีระยะเวลาในการขับยาปฏิชีวนะออกจากร่างกายช้ากว่าปกติเกินระยะเวลาที่ให้หยุดทำการรีดนมเพื่อจำหน่าย (Withdrawal period) หรือเกิดการปนเปื้อนยาปฏิชีวนะในภาชนะเก็บน้ำนม เป็นต้น รวมทั้งอาจเป็นผลบวกเท็จจากการตรวจด้วยวิธี Charm II Test เนื่องจากตัวอย่างน้ำนมถูกแช่แข็งก่อนทำการตรวจ ทำให้เกิดการตกตะกอนของโปรตีนในน้ำนมซึ่งอาจมีผลต่อการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีดังกล่าว ดั้งนั้นด้วยเหตุผลประการหลังนี้ การคำนวณค่า Sensitivity และ Specificity จึงมิได้รวม 2 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกจาก Charm II Test ในกลุ่มของผลบวกจริง

สถานภาพการตกค้างของยาปฏิชีวนะในน้ำนม :

การตรวจพบยาปฏิชีวนะในน้ำนมดิบจากถังนมรวมของเกษตรกรที่นำมาส่งโรงนม 2.1-3.7% ในเขตการศึกษาดังกล่าวแสดงว่า มาตรการการลดหรือการป้องกันการตกค้างหรือการปนเปื้อนของยาปฏิชีวนะในน้ำนมยังจำเป็นต้องดำเนินการต่อไป โดยให้การศึกษาและสร้างจิตสำนึกความรับผิดชอบให้แก่เกษตรกรผู้เลี้ยงโคนม เช่น โครงการลดอุบัติการของโรคเต้านมอักเสบเพื่อลดการใช้ยาปฏิชีวนะ การจัดทำบันทึกการใช้ยาของโคนมในฟาร์มและการหยุดใช้ยาก่อนรีดนมเพื่อจำหน่าย เป็นต้น

สำหรับรายงานการตกค้างของยาปฏิชีวนะในน้ำนมพาสเจอร์ไรซ์ที่มีการตีพิมพ์จะอยู่ในช่วงระหว่าง 26.7% - 46.7% ซึ่งจะสูงกว่าของน้ำนมยูเอชทีซึ่งมีอุบัติการในช่วงระหว่าง 0-11% (ตารางที่ 1) จากตัวเลขเหล่านี้ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับการศึกษาครั้งนี้ พบว่า มีความแตกต่างกันมา ทั้งนี้มีปัจจัยที่ควรจะต้องพิจารณาอยู่หลายประการ คือ วิธีการตรวจการตกค้างของยาปฏิชีวนะ ซึ่งในแต่ละวิธีก็มีความไว และความจำเพาะ ในการตรวจที่แตกต่างกันไป หรือ ขึ้นกับความพร้อมของอุปกรณ์ที่ช่วยในการตรวจซึ่งอุปกรณ์บางชนิดมีราคาแพง การสุ่มและช่วงระยะเวลาการเก็บตัวอย่าง นอกจากนี้ ปัจจัยในเรื่องของ สารช่วยห้ามการเจริญเติบโตของจุลชีพตามธรรมชาติ (Natural inhibitors หรือ non-immunoglobulin protective proteins) เช่น Lactoferrin, Lysozyme, Lactoperoxidase และ Xanthine oxidase เป็นต้น(Harding,1993) สารเหล่านี้โดยธรรมชาติมีส่วนที่จะยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อแบคทีเรียได้ ดังนั้น จึงได้มีการแนะนำให้อุ่นตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ 80 ^{0}C นาน 3 นาที ก่อนการทดสอบ เพื่อลดโอกาสการเกิดผลบวกเท็จ (False positive) ทำให้อุบัติการณ์สูงกว่าที่เป็นจริงได้ (Oliver et al.,1990)

เป็นที่ทราบกันแล้วว่า น้ำนมพาสเจอร์ไรซ์ต้องผ่านกรรมวิธีฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 63 ^{0}C คงที่อุณหภูมินี้ไม่น้อยกว่า 30 นาที หรือ ที่อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 72 ^{0}C คงที่อุณหภูมินี้ไม่น้อยกว่า 16 วินาที และน้ำนมยูเอชทีผ่านความร้อนไม่ต่ำกว่า 133 ^{0}C ไม่น้อยกว่า 1 วินาที (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 26 และ 35, 2522; ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 1267, 2530) ซึ่งอุณหภูมิและระยะเวลาดังกล่าวน่าจะสามารถทำลาย Natural inhibitors ได้ทั้งหมด แต่ผลจากการศึกษาครั้งนี้ ทำให้ทราบว่า ยังอาจจะมี Natural inhibitors หลงเหลืออยู่ในน้ำนมได้แม้น้ำนมจะผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนจนมาเป็นน้ำนมพร้อมดื่ม

จากรายงานผลการตรวจหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมในประเทศไทย ระหว่าง พ.ศ. 2531-2538 (ตารางที่ 1) รวมทั้งการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าตัวอย่างน้ำนมยูเอชทีตรวจไม่พบยาปฏิชีวนะตกค้าง หรือมีอัตราการตรวจพบยาปฏิชีวนะตกค้างต่ำกว่าตัวอย่างน้ำนมชนิดอื่นๆ อาจตั้งสมมุติฐานได้ว่า เนื่องมาจากกระบวนการผ่านความร้อนที่ใช้ในการผลิตน้ำนมยูเอชทีสามารถทำลายยาปฏิชีวนะตกค้างได้ หรือเนื่องมาจากผู้ผลิตน้ำนมพร้อมดื่มได้ใช้นมผงในการผลิตน้ำนมยูเอชที เพราะปัจจุบันการผลิตน้ำนมดิบในประเทศยังไม่เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภค

จึงมีความจำเป็นในการนำเข้านมผงจากต่างประเทศมาทำการคืนรูปเป็นน้ำนมพร้อมดื่ม อย่างไรก็ดีสมมุติฐานข้อหลังนี้ยังไม่สามารถพิสูจน์ได้ เนื่องจากตัวอย่างน้ำนมยูเอชทีทั้งหมดที่ทำการตรวจในการศึกษานี้รวม 10 ชื่อการค้า ได้ระบุข้างกล่องบรรจุว่า ทำการผลิตจากน้ำนมโคสด 100 % สำหรับน้ำนมยูเอชทีชนิดจืด 97 % สำหรับน้ำนมยูเอชทีชนิดหวาน และ 94.0-94.9 % สำหรับน้ำนมยูเอชทีชนิดปรุงแต่ง กล่าวคือผู้ผลิตไม่ได้แจ้งว่าผลิตจากนมผงคืนรูปเลยใน 10 ชื่อการค้าของน้ำนมยูเอชทีที่ทำการศึกษาในครั้งนี้

ข้อสรุป

การศึกษาในครั้งนี้ พบว่าประสิทธิภาพของการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมโดยวิธี Microbial inhibition disk assay จะมีค่า Sensitivity (98.85%) สูงกว่าการใช้ชุดตรวจสอบ Delvotest-P^R ซึ่งค่า Sensitivity เท่ากับ 93.10% ทั้งนี้การอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ 80 ^{o}C เป็นเวลานาน 3 นาที ก่อนทำการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะโดยวิธี Microbial inhibition disk assay หรือใช้ชุดตรวจสอบ Delvotest-P^R สามารถลดอัตราการเกิดผลบวกเท็จ (False positive) หรือจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกกลับเป็นผลลบหลังการอุ่นแล้วทำการตรวจสอบใหม่ (Conversion rate) โดยในน้ำนมดิบจากถังนมรวมของเกษตรกร 66.1% และ 42.1% ตามลำดับ ในน้ำนมดิบจากโคนมปกติ 86.7% และ 66.7% ตามลำดับ และ Conversion rate นี้จะยิ่งสูงขึ้นในน้ำนมพร้อมดื่มพาสเจอร์ไรซ์และยูเอชที อย่างไรก็ตามการอุ่นตัวอย่างน้ำนมก่อนการตรวจสอบพบว่าอาจทำให้เกิดผลลบเท็จ (False negative) ได้เช่นกัน แต่โอกาสที่จะเกิดผลลบเท็จนี้น้อยกว่า คือ 12.8-13.6% ซึ่งน้อยกว่าโอกาสที่จะเกิดผลบวกเท็จมาก

ปริมาณของ Somatic cell count (SCC) ที่สูงขึ้นในกรณีเต้านมอักเสบไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับผลการตรวจหายาปฏิชีวนะโดยวิธี Microbial inhibition disk assay และ Delvotest-P^R อย่างไรก็ตามตัวอย่างน้ำนมจากโคนมที่มีอาการเต้านมอักเสบก่อนการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะพบว่า Conversion rate เท่ากับ 87.5% และ 92.0% เมื่อตรวจสอบซ้ำหลังการอุ่นตัวอย่างน้ำนมด้วย Microbial inhibition disk assay และ Delvotest-P^R ตามลำดับ แสดงว่าการอุ่นตัวอย่างน้ำนมสามารถช่วยเพิ่มความน่าเชื่อถือของการตรวจสอบโดยวิธีทั้งสองนี้

ในการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมพร้อมดื่มพาสเจอร์ไรซ์และยูเอชทีในช่วงระยะเวลา 1 ปีที่ผ่านมา พบเพียง 1 ตัวอย่าง(0.31%) ในน้ำนมพาสเจอร์ไรซ์จากการตรวจสอบยืนยันด้วยวิธี HPLC แสดงว่าอุบัติการของการพบยาปฏิชีวนะตกค้างลดน้อยลงในปัจจุบัน เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานอื่น ๆ ของการตรวจพบยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมในช่วง 8 ปีที่ผ่านมา

การตรวจสอบหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมโดยวิธี Microbial inhibition disk assay และการใช้ชุดตรวจสอบ Delvotest-P^R เป็นการตรวจสอบเบื้องต้น (Screening test) ถึงแม้ว่าจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพและความน่าเชื่อถือด้วยการอุ่นตัวอย่างน้ำนมที่อุณหภูมิ 80 ^{o}C นาน 3 นาทีก่อนการตรวจสอบ แต่ก็ยังมีโอกาสให้ผลบวกเท็จ หรือผลลบเท็จได้ ดังนั้น การสรุปผล

การตรวจสอบจึงควรพิจารณาร่วมกับองค์ประกอบอื่น ๆ หากเป็นไปได้ เช่น ถ้าน้ำนมดิบมาจากฟาร์มซึ่งมีการใช้ยาปฏิชีวนะน้อยมากเนื่องจากมีมาตรการการป้องกันโรคเต้านมอักเสบ ทำให้โคนมมีสุขภาพดี หรือมีการบันทึกและแยกโคนมที่กำลังรักษาด้วยยาปฏิชีวนะออกจากโรงรีดนมทำให้โอกาสการปนเปื้อนกับถังนมรวมที่จะส่งโรงงานลดลง โอกาสที่จะเกิดผลบวกเท็จก็จะมีสูงกว่า เป็นต้น

ข้อเสนอแนะ

การใช้ชุดตรวจสอบอื่น ๆ (ดังที่กล่าวไว้ในบทนำ) ในการหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมก็จะต้องคำนึงเช่นกันว่าเป็นการตรวจสอบเบื้องต้นเช่นกัน ผู้แปลผลการตรวจสอบควรจะต้องพิจารณาประสิทธิภาพและความน่าเชื่อถือของชุดตรวจสอบต่าง ๆ ก่อนตัดสินผล การพัฒนาการตรวจสอบยืนยัน เช่น วิธีการตรวจวิเคราะห์ด้วย High-performance liquid chromatography (HPLC) ที่สะดวกและรวดเร็วยิ่งขึ้น รวมทั้งสามารถวิเคราะห์หายาปฏิชีวนะในระดับต่ำตามที่กำหนดให้มีได้ (Maximum residue limit) ควรจะต้องพัฒนาต่อไป สำหรับวิธีการตรวจวัดระดับของยาปฏิชีวนะตกค้างโดยใช้ HPLC ที่พัฒนาขึ้นในการศึกษาครั้งนี้ยังมีข้อจำกัดเรื่องการตรวจหายาปฏิชีวนะในระดับต่ำมาก ๆ และในการตรวจหายาปฏิชีวนะบางกลุ่ม เช่น กลุ่ม Aminoglycosides เนื่องจากขาดเครื่องมือ Pre หรือ Post-column derivertization และ Fluorescence detector ซึ่งมีราคาสูง ดังนั้น ในการศึกษานี้จึงได้ทำการตรวจสอบยืนยันการตรวจพบยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมด้วยวิธี Charm II Test เพิ่มเติม แต่วิธี Charm II Test ก็มีข้อจำกัดในด้านราคาครุภัณฑ์ของเครื่อง Scintillation counter และจำเป็นต้องใช้ชุดตรวจสอบหายาปฏิชีวนะจากบริษัทผู้ผลิตซึ่งมีราคาประมาณ 200 บาทต่อการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะหนึ่งชนิด ดังนั้นจึงควรจะมีการพัฒนาชุดตรวจสอบ (Test kit) โดยอาศัยหลักการของ Microbial inhibition assay ให้มีประสิทธิภาพความน่าเชื่อถือยิ่งขึ้น และสามารถจำหน่ายในราคาที่ต่ำลงกว่าราคาชุดตรวจสอบที่มีใช้กันในปัจจุบัน ซึ่งมีราคาตั้งแต่ 50-200 บาทต่อการทดสอบหนึ่งตัวอย่าง ชุดตรวจสอบดังกล่าวนี้น่าจะเป็นสิ่งที่นักวิชาการไทยสามารถพัฒนาขึ้นมาได้ เพื่อตอบรับอุตสาหกรรมการเลี้ยงโคนมของประเทศไทยที่เติบโตขึ้น ควบคู่ไปกับความตระหนักในเรื่องความปลอดภัยของผู้บริโภค

เอกสารอ้างอิง

ขวัญชาย เครือสุคนธ์ และ ไทยเสรี จรูญภาค. 2537. อุบัติการณ์ของสารต้านจุลชีพในน้ำนมพาสเจอร์ไรซ์ น้ำนมยูเอชที และนมผงในเขตกรุงเทพมหานคร. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสพการณ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2537.

ธีรพงศ์ ธีรภัทรสกุล อุษุมา กู้เกียรตินันท์ ชลอ ไม้เลี้ยง และ รุจี ยุวดี. 2535. การตรวจสอบการตกค้างของยาปฏิชีวนะในนมดิบ นมสดพาสเจอร์ไรซ์ และ นมยูเอชที. สัตวแพทยสาร 43(4) : 21-39.

ธุรกิจอาหารสัตว์. 2535. ภาคสถิติ 2534 ; ตารางประชากรสัตว์, ปริมาณและอาหารสัตว์และการใช้วัตถุดิบปี 2535. ธุรกิจอาหารสัตว์ 28 (หน้า 28).

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 26 (พศ. 2522) เรื่อง กำหนดนมโคเป็นอาหารควบคุมเฉพาะและกำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานและวิธีการผลิต.

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 35 (พศ. 2522) เรื่อง กำหนดนมปรุงแต่ง(Flavoured Milk)เป็นอาหารควบคุมเฉพาะและกำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานและวิธีการผลิต ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 1267 (พศ. 2530) เรื่อง กำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม : นมสด.

พรศิริ ตั้งใจพัฒนา และปราโมช วีชะรังสรรค์. 2537. สำรวจยาตกค้างในน้ำนมดิบในเขตภาคกลางของประเทศไทย. (ยังไม่ได้ตีพิมพ์)

มติชน. 2537. สถานการณ์การผลิตโคนมและตลาดน้ำนมในประเทศ : รายงานพิเศษ, มติชน (รายวัน) ฉบับวันที่ 28 กุมภาพันธ์ 2537 (หน้า 26).

Amonsin, A., Saitanu, K. and Teeverapanya, S. 1994. Antibiotic residues in raw milk in Thailand. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. (In print)

Bishop, J.R., Duncan, S.E., Jones, G.M. and Whittier, W.D. 1991. Evaluation of animal drug residue detection methods.Virginia Polytechnic Institute and State University, VA. : 45 pages.

Carlson, A., Bjorck, A.L. and Persson, K. 1989. Lactoferrin and lysozymes in milk during acute mastitis and their inhibitory effect in Delvotest- R. J. Dairy Sci. 72: 3166-3175

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

Cullor, J.S. 1992. Antibiotic residue assays : Can they be used to test milk from individual cows? Vet. Med. 87(12): 1235-1241.

Eenennaam, Van A.L., Cullor J.S. and Perani, L. 1993. Performance of milk antibiotic residue screening tests in cattle with naturally occurring clinical mastitis. J. Dairy Sci. 76 : 3041-3053.

Harding, F.1993. Antibiotic testing in the United Kingdom : past and future. Bulletin of International Dairy Federation No.283/1993. Brussels. P.61-62

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

IDF (Bulletin of International Dairy Federation) NO.220/1987. Milk and milk products-Detection of inhibitors. Brussels. P.4-59.

Korhonen, H. 1977. Antimicrobial factors in bovine colostrum. J. Sci. Agric. Soc. Finl. 49:433-447. Cited by : Beukers R. 1993. Some special aspects of Delvotest-P^R. Bulletin of IDF 283 : 20-23.

Okada, Y. 1986. Bacterial inhibitiors in milk produced by cows treated with no antibiotics. J. Jap. Vet. Med. Assoc. 39 : 97-101.

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

Sischo, W.M. and Burns, C.M. 1993. Field trial of four cowside antibiotic residue screening tests. JAVMA 202 (8) : 1249- 1254.

Tsai, C.E. and Kondo. F. 1993. Evaluation of the sensitivity of 34 antimicrobial agents of various test organisms and media. Proceedings The 11th International Symposium of The World Association of Veterinary Food Hygienists. P.499-504.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย