บทที่ 2

วรรณกรรมปริทัศน์

ในปัจจุบันมีวิธีการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะและยาซัลฟาตกค้างในเนื้อเยื่อของสัตว์หลายวิธีและหลายระดับ วิธีการตรวจสอบเบื้องต้นเพื่อต้องการทราบว่ามียาตกค้างหรือไม่ ได้แก่ วิธีการตรวจสอบแยกกลุ่มของยา และวิธีการตรวจสอบยืนยันชนิดและปริมาณตกค้างของยาจุดประสงค์ของการตรวจสอบเพื่อการคุ้มครองผู้บริโภคให้มีความปลอดภัยในการบริโภคเนื้อเยื่อและผลิตภัณฑ์ของสัตว์ การพัฒนาวิธีการตรวจสอบยาปฏิชีวนะและยาซัลฟาตกค้างในเนื้อเยื่อและผลิตภัณฑ์ของสัตว์มีดังนี้

การตรวจหายาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพในเนื้อเยื่อและผลิตภัณฑ์ของสัตว์

หลักการที่ใช้ตรวจยาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพในเนื้อเยื่อของสัตว์แบ่งได้เป็น 4 กลุ่มคือ

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

1. การทดสอบโดยอาศัยหลักการยับยั้งการแบ่งตัวของจุลินทรีย์ (Microbial Inhibition Disk assays)

เป็นวิธีการตรวจโดยใช้แบคทีเรียที่ไวต่อยาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพเป็นตัวทดสอบ สามารถทำได้หลายวิธีโดยใช้การเจริญของเชื้อในชุดทดสอบหลังจากเติมตัวอย่างเนื้อเยื่อสกัดของสัตว์ที่ต้องการทดสอบและบ่ม (Incubate) ไว้ในอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อเป็นตัวบ่งชี้ผลการทดสอบ ถ้าเชื้อสามารถเจริญได้ภายหลังการเติมตัวอย่างเนื้อเยื่อสกัดของสัตว์และบ่มไว้ในอุณหภูมิที่เหมาะสม แสดงว่าในเนื้อเยื่อสกัดของสัตว์ที่ทดสอบนั้นปราศจากสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อหรือปราศจากยาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพ เชื้อจุลินทรีย์

มาตรฐานที่ใช้ทดสอบมีหลายชนิดเช่น *Bacillus stearothermophilus var. calidolactis Streptococcus thermophilus, Escherichia coli* และเชื้ออื่น ๆ (Heechen, 1993)

ตัวอย่างจุลินทรีย์มาตรฐานที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการตรวจหายาต้านจุลชีพตกค้างโดยอาศัยหลักการยับยั้งการแบ่งตัวของจุลินทรีย์ คือ

1. *Bacillus cereus var.mycoides* ATCC 11778
2. *Bacillus megaterium* ATCC 9885
3. *Bacillus stearothermophilus var. calidolactis C 953* (ATCC 10149 ,NIZO)
4. *Bacillus subtilis ATCC 6633*
5. *Escherichia coli ATCC 10536*
6. *Klebsiella pneumoniae ATCC 10031*
7. *Lactobacillus bulgaricus*
8. *Sarcina subflava ATCC 7468*
9. *Sarcina lutea ATCC 9341*
10. *Sarcina lutea* resistant to dihydrostreptomycin *ATCC 9341a*
11. *Sarcina lutea* resistant to neomycin *ATCC 12692*
12. *Staphylococcus aureus ATCC 6538p*
13. *Staphylococcus aureus* resistant to dihydrostreptomycin *ATCC 6538-DR*
14. *Staphylococcus aureus* resistant to novobiocin *ATCC 12692*
15. *Staphylococcus epidermidis ATCC 12228*
16. *Pseudomonas pyocynea ATCC 25619*

การทดสอบโดยอาศัยหลักการการยับยั้งการแบ่งตัวของจุลินทรีย์ แบ่งออกเป็นวิธีต่างๆ ดังนี้

1 .1 Disk diffusion method

เป็นการทดสอบหายาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพ ในเนื้อเยื่อสกัดของสัตว์โดยอาศัยหลักการยับยั้งการแบ่งตัวของแบคทีเรียจากการซึมกระจายของยาจากแผ่นกระดาษกรอง (paper disk) ซึ่งทำโดยนำเอากระดาษกรองแผ่นกลม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10 มิลลิเมตร จุ่มในเนื้อเยื่อสกัดของสัตว์แล้ววางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบผสมอยู่ (seed agar) นำจานเพาะเชื้อดังกล่าวบ่มที่อุณหภูมิ และระยะเวลาที่เหมาะสม สำหรับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ ส่วนใหญ่เชื้อเกือบทุกชนิด บ่มที่ 30 - 45 $^{\circ}$C นาน 18-24 ชั่วโมง ยกเว้นเชื้อ *B. stearothermophilus* ซึ่งบ่มที่ 65 $\pm$ 1°C นาน 18-24 ชั่วโมง หลังจากบ่มเชื้อแล้วนำจานเลี้ยงเชื้อออกมาอ่านผล ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อในจานมีลักษณะขุ่น หรือมีโคโลนีของแบคทีเรียเป็นจุดเล็กกระจายทั่วไป ยกเว้นตรงบริเวณกระดาษกรอง และรัศมีโดยรอบมีลักษณะใส (inhibition clear zone) วัดเส้นผ่าศูนย์กลางได้เกิน 12 มิลลิเมตร แสดงว่าในเนื้อเยื่อที่ทดสอบนั้นมีสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อหรือมียาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพปนเปื้อนอยู่

จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นเชื้อทดสอบมีหลายชนิดได้แก่ *B. stearothermophilus*, *B. subtilis* *B. megaterium*, *B. cereus*, *Sarcina lutea*, *Streptococcus thermophilus* และ *E. coli* เป็นต้น ถ้าทำการทดสอบโดยใช้เชื้อมากกว่า 1 ชนิด เช่น Three - plate test , Six -plate test หรือ European Four Plate Test จะทำให้การตรวจมีความถูกต้องแม่นยำ (accuracy) เพิ่มมากขึ้น การตรวจหายาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพในเนื้อเยื่อโดยวิธี Disk diffusion เป็นวิธีการที่นิยมใช้มานานกว่า 30 ปีจนถึงปัจจุบัน ในห้องปฏิบัติการตรวจหายาปฏิชีวนะตกค้างทั่วโลกเช่น ประเทศสหรัฐอเมริกา แคนาดา ออสเตรเลีย และกลุ่มประเทศยุโรป ได้กำหนดให้วิธี Disk diffusion เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจหายาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพในเนื้อเยื่อและผลิตภัณฑ์จากสัตว์ โดยเฉพาะกลุ่มประเทศยุโรป นิยมใช้วิธี European Four Plate Test ในการตรวจสอบยาปฏิชีวนะ และยาซัลฟาตกค้างในเนื้อ และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ เนื่องจากวิธีนี้มีข้อดีคือสามารถตรวจสอบหายาได้หลายกลุ่ม (Broad spectrum) จากรายงานของ Okerman *et al.* (1998) พบว่า Plate ที่ 1. Testagar pH 6.0 เติมเชื้อ *B. subtilis* มีความไวมากที่สุดในการตรวจสอบหายากลุ่ม Beta-lactam Plate ที่ 2. Testagar pH 7.2 เติมเชื้อ *B. subtilis* และ Trimethoprim มีความไวมากที่สุดในการตรวจสอบหายากลุ่ม Sulfonamides Plate ที่ 3.

Testagar pH 8.0 เติมเชื้อ *B. subtilis* มีความไวมากที่สุดในการตรวจสอบหายากลุ่ม Aminoglycosides และ Plate ที่ 4. Testagar pH 8.0 เติมเชื้อ *M. luteus* มีความไวมากที่สุดในการตรวจสอบหายากลุ่ม Macrolides แต่มีข้อเสียคือการตรวจวิธีนี้ค่อนข้างยุ่งยาก เหมาะสำหรับเป็นการทดสอบในห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาที่มีอุปกรณ์ครบถ้วนเท่านั้น และใช้ระยะเวลาในการทดสอบนานกว่า 18 ชั่วโมง จึงจะสามารถรู้ผลการทดสอบได้ นอกจากนี้มีรายงานของ Nouws *et al* (1988) พบว่ามีการใช้ยากลุ่ม Beta-lactam, Sulfonamides, Aminoglycosides และ Macrolides ในฟาร์มเลี้ยงสัตว์กันอย่างแพร่หลายมากในกลุ่มประเทศยุโรป จึงเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้กลุ่มประเทศดังกล่าวนิยมใช้วิธี European Four Plate Test เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจสอบเบื้องต้น (Screening test) สำหรับการตรวจหายาปฏิชีวนะ และยาซัลฟาตกค้างในเนื้อ และผลิตภัณฑ์จากสัตว์

1.2 Tube diffusion methods

1.2.1. Tube diffusion test

เป็นการทดสอบหายาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพตกค้างในเนื้อเยื่อสกัดของสัตว์โดยอาศัยหลักการยับยั้งการแบ่งตัวของแบคทีเรียเช่นเดียวกับวิธี Disk diffusion การทดสอบทำโดยหยอดตัวอย่างเนื้อเยื่อสกัดของสัตว์ที่ต้องการทดสอบและเม็ดอาหารเลี้ยงเชื้อ (nutrient tablet) ลงในหลอดทดลองขนาดเล็กหรือ ampoule ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 8 มิลลิเมตร ซึ่งภายในบรรจุสปอร์ของ *B. stearothermophilus* ผสมกับ agar gel และ Bromcresol purple ซึ่งใช้เป็นอินดิเคเตอร์วัดความเปลี่ยนแปลง ความเป็นกรด - ด่างที่เกิดขึ้น จากนั้นปิดชุดทดลองให้สนิท บ่มที่อุณหภูมิ 65 $\pm 1^{\circ}C$ นาน 3 - 4 ชั่วโมง อ่านผลโดยสังเกตุการเปลี่ยนสีของ Bromcresol purple ในอาหารเลี้ยงเชื้อ;ในกรณีที่ตัวอย่างเนื้อเยื่อสกัดของสัตว์ปราศจากสารใดๆ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย กรดที่เกิดขึ้นขณะจากการเจริญของเชื้อแบคที่เรียจะทำให้ความเป็นกรดด่าง (pH) ในระบบลดลง Bromcresol purple จะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง แต่ถ้าการเจริญของเชื้อถูกยับยั้งโดยสารในตัวอย่างเนื้อเยื่อสกัดของสัตว์ที่ทดสอบ pH ในระบบจะคงเดิม Bromcresol purple จึงไม่เปลี่ยนสี การทดสอบวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก สามารถปฏิบัติได้ทั้งในห้องปฏิบัติการและภาคสนาม ปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีนี้เป็นชุดตรวจสอบสำเร็จรูป

ทางการค้า (Commercial Kit) หลายยี่ห้อ ได้แก่ Delvotest-P® Delvotest SP®(Gist - Brocades, Inc., Netherlands) และชุดตรวจ ADM® (COPAN,Italy) ชุดตรวจ Delvotest -P ® และ Delvotest SP® เป็นชุดตรวจสอบที่กลุ่มประเทศยุโรปนิยมใช้สำหรับการทดสอบหายาตกค้างในระดับเบื้องต้น (Suhren, 1993; Anonymous,1989b)

1.2.2 Brilliant Black Reduction test

เป็นการทดสอบแบบ Tube diffusion method อีกวิธีหนึ่ง แต่เปลี่ยนอินดิเคเตอร์เป็น Brilliant Black แทน Bromcresol purple และทดสอบใน Microtiter plate ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อผสมกับเชื้อ *B . stearothermophilus* แทนการทดสอบใน Tube หรือ ampoule ถ้า Brilliant Black ไม่เปลี่ยนสีหลังจากการเติมตัวอย่างเนื้อเยื่อสกัดของสัตว์และบ่มที่ 65±1°C นาน 2-3 ชั่วโมง แสดงว่าในตัวอย่างนั้นมีสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อหรือมียาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพปะปนอยู่ แต่ถ้าในตัวอย่างสกัดของสัตว์ไม่มีสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ Brilliant Black จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเนื่องจากกรดที่เกิดขึ้นขณะเชื้อเจริญ ชุดตรวจสอบสำเร็จรูปที่ใช้หลักการนี้ได้แก่ชุดทดสอบ BR Test® (Glengarry Biotech, Germany) ซึ่งได้รับความนิยมมากในประเทศออสเตรเลีย แคนาดา เยอรมัน สวีเดน และแอฟริกาใต้ (Suhren,1993)

1.3 Accusphere method

เป็นการทดสอบโดยใส่เม็ดเชื้อ *Streptococcus thermophilus* ที่ถูกทำให้แห้งแบบเยือกแข็งร่วมกับ Bromcresol purple ลงในหลอดทดลองที่บรรจุตัวอย่างเนื้อเยื่อสกัดของสัตว์ที่ต้องการทดสอบ นำไปบ่มที่ 65 °± 1°C นาน 3 - 4 ชั่วโมง ถ้าในตัวอย่างเนื้อเยื่อสกัดนั้นมีสารที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อตกค้างอยู่ Bromcresol purple จะไม่เปลี่ยนสีหลังการบ่ม แต่ถ้าในตัวอย่างเนื้อเยื่อสกัดของสัตว์ไม่มีสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อตกค้างอยู่ Bromcresol purple จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเนื่องจากกรดที่เกิดขึ้นจากการเจริญของเชื้อ (Suhren,1993)

1.4 Acidification method

Acidification method เป็นการทดสอบการสร้างกรด (การเจริญ) ของเชื้อ *Streptococcus thermophilus* ภายหลังการเติมเชื้อลงในตัวอย่างเนื้อเยื่อสกัดของสัตว์ ที่ต้องการทดสอบและบ่มที่ 45°C นาน 2 ชั่วโมง 30 นาที โดยเติม Yeast extract เป็นตัวเร่งการเจริญและ Bromcresol purple เป็นอินดิเคเตอร์ ถ้า Bromcresol purple ไม่เปลี่ยนสีหลังการบ่ม แสดงว่าการเจริญของเชื้อถูกยับยั้งโดยสารต้านจุลชีพในเนื้อเยื่อสกัดของสัตว์ (Suhren,1993) ชุดตรวจสอบ Charm AIM 96® และ Charm farm Test ®(Charm Sciences Inc., USA) เป็นชุดทดสอบที่พัฒนามาจากหลักการดังกล่าว โดยเปลี่ยนสารเร่งการเจริญเติบโต เปลี่ยนชนิดอินดิเคเตอร์และใช้เชื้อ *B. stearothermophilus* แทนการใช้ *Streptococcus thermophilus* ชุดทดสอบทั้งสองถูกพัฒนาขึ้นเพื่อให้มีความสะดวกในการใช้งานภาคสนามและสามารถอ่านผลได้ในระยะเวลาสั้น รวมทั้งมีความสามารถในการตรวจหายาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพได้หลายชนิด Charm AIM 96® เป็นวิธีที่สะดวกในกรณีที่มีตัวอย่างที่ต้องการทดสอบเป็นจำนวนมาก เพราะทดสอบใน 96 - well microtiter plate สามารถตรวจได้ครั้งละ 94 ตัวอย่าง (Suhren,1993)

การทดสอบโดยใช้หลักการยับยั้งการแบ่งตัวของจุลินทรีย์ วิธีต่าง ๆ เหล่านี้ยกเว้น Disk Diffusion เป็นที่นิยมใช้ทั่วไปในการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาการตกค้างของยาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพในเนื้อเยื่อสกัดของสัตว์โดยเฉพาะอย่างยิ่งชุดตรวจสอบทางการค้าต่าง ๆ เนื่องจากให้ผลการตรวจสอบได้รวดเร็ว วิธีการไม่ยุ่งยาก และสามารถนำไปใช้ในภาคสนามได้ อย่างไรก็ตามการตรวจสอบด้วยวิธีเหล่านี้ไม่สามารถระบุชนิดหรือกลุ่มของยาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพที่ตกค้างและมีโอกาสที่จะให้ผลบวกเท็จได้ รวมทั้งความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพที่ตรวจพบได้ 100 % ของแต่ละวิธีก็มีค่าต่างกัน (Suhren,1993)

2. การทดสอบทางอิมมิวโน (Immuno assays)

คือวิธีการตรวจโดยอาศัยหลักการให้โมเลกุลของยาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพจับกับโมเลกุลของตัวรับ (Receptor) ซึ่งถูกสร้างให้มีส่วนเชื่อมรับหรือมีแขนที่สามารถจับกับโมเลกุลของยาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดได้โดยเฉพาะ แล้วอ่านผลจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น เช่น วิธี Enzyme - linked Immunosorbent assays (ELISA) วิธีการทดสอบทาง Immuno มีข้อดีคือสามารถระบุชนิดของยาตกค้างได้ จึงอาจใช้เป็นการตรวจสอบยืนยัน (Confirmation test)

และบางวิธีการสามารถทำการตรวจสอบในภาคสนามได้ แต่ข้อด้อยคือวิธีนี้มีspecificity ต่ำ ถ้าตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ตรวจสอบมียาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพชนิดอื่นๆที่ไม่จำเพาะกับชุดตรวจสอบก็จะให้ผลการตรวจเป็นลบได้ (Suhren,1993)

3. **การทดสอบโดยวิธีไมโครเบียลรีเซฟเตอร์** (Microbial receptor assays)

เป็นการทดสอบการแย่งจับ (Compettitive binding) ระหว่างยาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพที่มีอยู่ในตัวอย่างเนื้อเยื่อสกัดกับยาที่ติดฉลากกัมมันตภาพรังสีชนิดคาร์บอน 14(^{14}C) หรือทริเทียม (^{3}H) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารกัมมันตภาพรังสีที่วัดได้จากการทดสอบตัวอย่างเนื้อเยื่อสกัดของสัตว์ กับปริมาณสารกัมมันตภาพรังสีที่วัดได้จากการทดสอบ Negative control ก็จะสามารถบอกได้ว่าในตัวอย่างเนื้อเยื่อสกัดของสัตว์ที่ทดสอบมียาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพที่ต้องการตรวจหาหรือไม่ การทดสอบอาศัยหลักการที่ให้โมเลกุลของยาตกค้างในเนื้อเยื่อสกัดของสัตว์จับกับส่วนรับ (Receptor site) ของแบคทีเรีย (Microbial binber) ซึ่งมีความจำเพาะกับยาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพที่ต้องการตรวจหา และชุดทดสอบสำเร็จรูปที่ใช้หลักการดังกล่าวคือ Charm II Test ® การตรวจวิธีนี้มีทั้งความไวสูง (High sensitivity) และสามารถตรวจหายาปฏิชีวนะหรือต้านจุลชีพตกค้างได้หลายกลุ่มยา (Zomer and Charm, 1993)

4. **วิธีการทางเคมี - ฟิสิกส์** (Physicochemical Method)

เป็นวิธีการตรวจโดยอาศัยคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ที่จำเพาะของยาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดที่จะถูกแยกออกจากสารอื่น ๆ เมื่อให้ตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบผ่านตัวกลางที่มีอำนาจการดูดซับ (absorbant) โมเลกุลของสารแต่ละชนิดไม่เท่ากัน ดังนั้นสารแต่ละชนิดจะหลุด ออกมาจากตัวกลางในเวลาต่าง ๆ กัน ซึ่งสามารถตรวจวัดได้ด้วยเครื่องตรวจวัด (detector) เมื่อทำการตรวจสอบตัวอย่างเนื้อเยื่อและสารมาตรฐาน (ยาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพ) แล้วพบว่ามีสารในตัวอย่างเนื้อเยื่อสกัดของสัตว์ที่ผ่านตัวกลางออกมาในระยะเวลาเดียวกับสารมาตรฐานก็แสดงว่าน่าจะเป็นสารชนิดเดียวกัน จากภาพ Chromatogram ที่บันทึกด้วยเครื่องตรวจรับจะสามารถคำนวณหาปริมาณสารในตัวอย่างเนื้อเยื่อสกัดของสัตว์ที่ทดสอบได้ด้วยการเปรียบเทียบกับภาพที่ได้จากการตรวจสอบสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณ การตรวจทางเคมี - ฟิสิกส์ที่นิยมใช้ในการตรวจหายาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพในเนื้อเยื่อสกัดของสัตว์คือวิธี

Thin layer Chromatography (TLC) และวิธี High - performance liquid chromatography (HPLC) การตรวจทางเคมี - ฟิสิกส์เป็นวิธีที่มีความแม่นยำสูงสามารถระบุชนิดของยาที่มีในตัวอย่างเนื้อเยื่อสกัดของสัตว์และหาปริมาณยาที่ตกค้างได้ชัดเจน แต่เป็นวิธีที่ยุ่งยากทั้งขั้นตอนในการสกัดยาที่จากเนื้อเยื่อของสัตว์ และขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อทำการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งยาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพแต่ละกลุ่มหรือแต่ละชนิดจะใช้วิธีการสกัดและการเตรียมตัวอย่างที่แตกต่างกัน เป็นวิธีทดสอบที่ใช้เวลานานและต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาสูง จึงใช้ในกรณีที่ต้องการยืนยันชนิดของยาและปริมาณยาที่ตกค้างอยู่ในตัวอย่างเนื้อเยื่อสกัดของสัตว์เท่านั้น (Verification and quantification test) (Ueno and Aoki,1995; Zomer et al.,1995; Zomer, Saul and Charm,1992)

การตกค้างของยาปฏิชีวนะและยาซัลฟาในเนื้อเยื่อและผลิตภัณฑ์จากสัตว์เป็นปัญหาที่มีผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค และมีผลกระทบต่อการค้าระหว่างประเทศก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ และความเชื่อมั่นในคุณภาพของสินค้า จึงมีความจำเป็นที่จะต้องวางมาตรการเพื่อป้องกันและแก้ไขปัญหาการตกค้างดังกล่าว การศึกษาและพัฒนาวิธีการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะและยาต้านจุลชีพตกค้างทั้งในน้ำนมโค เนื้อเยื่อและผลิตภัณฑ์จากสัตว์ก็เป็นแนวทางหนึ่งของมาตรการป้องกันและแก้ไข ปัญหายาตกค้าง ในปัจจุบันถึงแม้จะมีวิธีการตรวจสอบหลายแบบ ซึ่งมีความแม่นยำ ความยากง่าย และความไวในการอ่านผล แตกต่างกันไป แต่วิธีการทดสอบหายาต้านจุลชีพโดยอาศัยหลักการยับยั้งการแบ่งตัวของจุลินทรีย์ (MIA) ยังเป็นวิธีที่ใช้สำหรับการตรวจกรองเพื่อหายาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพตกค้างในเนื้อเยื่อสกัดของสัตว์ในระดับเบื้องต้น อย่างไรก็ตามวิธีการทดสอบที่อาศัยหลักการ MIA นี้มีข้อจำกัดหลายประการคือไม่สามารถระบุชนิดและปริมาณยาที่ตกค้างได้ชัดเจน และมีขีดจำกัดในความสามารถของการตรวจ กล่าวคือวิธีนี้สามารถตรวจพบการตกค้างในเนื้อเยื่อในระดับที่ต่ำกว่าหรือใกล้เคียงกับค่ายอมรับให้มีได้ (MRL) เฉพาะยากลุ่มBeta-lactam และbacitracin เท่านั้น ส่วนยาต้านจุลชีพกลุ่มอื่น ๆ เช่น aminoglycosides, tetracyclines, macrolides, chloramphenicol และ sulfonamides วิธีการเหล่านั้นสามารถตรวจพบได้ในได้ในระดับความเข้มข้นที่สูงกว่าค่าที่ยอมรับให้มีได้ (MRL) (Tennant,1990) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอีกหลายประการ เช่น ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐาน ปริมาณเชื้อ และวิธีการเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ รวมทั้งองค์ประกอบและความระดับความเป็นกรด - ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการตรวจสอบด้วยวิธี Disk diffusion จึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการพัฒนาวิธีการเหล่านี้ให้ดียิ่งขึ้น และเหมาะสมกับการ

นำไปใช้เป็นการตรวจสอบเบื้องต้น เนื่องจากวิธี Tube diffussion มีข้อดีคือใช้เวลาไม่นานในการบ่มเพาะเชื้อ จึงทำให้สามารถรู้ผลการตรวจได้อย่างรวดเร็ว มีขั้นตอนการทดสอบที่ไม่ยุ่งยาก และไม่ต้องการเครื่องมืออุปกรณ์ราคาแพง ทำให้สามารถทำการตรวจสอบได้ที่ฟาร์มหรือนอกห้องปฏิบัติการได้ ดังนั้นจึงมีการพัฒนาวิธีนี้ขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยมีความเป็นมาดังนี้ (Arret *et al.*, 1971 ; Tsai and Kondo, 1993)

Bugyei และ คณะ(1993) ได้ทำการทดลองในไก่น้ำหนัก 1.5-2.1 กิโลกรัม โดยให้ยา Oxytetracycline ขนาด 25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ติดต่อกันนาน 4 วัน หลังจากสิ้นสุดการทดลอง ได้ฆ่าไก่ตามระยะเวลาที่กำหนด คือ 0.5, 1,2, 4, 6 และ 8 ชั่วโมง เก็บตับ ไต กล้ามเนื้อและซีรั่มไก่แต่ละตัวมาทดสอบหายา Oxytetracycline ตกค้างโดยใช้ชุดตรวจสอบ Delvotest -P® พบว่าในตับ ไต กล้ามเนื้อของไก่ และซีรั่ม มีการตกค้างของ Oxytetracyclineอยู่ในช่วง 0.5-8 ชั่วโมง หลังสิ้นสุดการทดลอง พบมากในช่วงชั่วโมงที่ 1-2 มีการตกค้างของยา Oxytetracycline ในปริมาณสูงสุดที่ไต และพบได้น้อยมากที่กล้ามเนื้อ ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของ Oxytetracycline ที่ชุดตรวจสอบ Delvotest -P® สามารถตรวจพบได้คือ 0.62 ไมโครกรัม/กรัม ของตับและไต ซึ่งเป็นระดับที่สูงกว่าค่าที่ยอมรับให้มีได้ (MRL) ของยา Oxytetracycline (MRL) ซึ่งคณะกรรมาธิการ Codex กำหนดไว้ที่ 0.3 และ 0.6 ไมโครกรัม/ กรัม ในตับและไตของไก่ตามลำดับ (Codex, 1993) ต่อมา Bugyei และคณะ (1995) ทำการทดลองในไก่น้ำหนัก 1.5-2.1 กิโลกรัม ให้ยา Sulfamethazine ขนาด 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยผสมน้ำให้กิน ติดต่อกันนาน 5 วัน หลังจากสิ้นสุดการทดลอง ได้ฆ่าไก่ตามระยะเวลาที่กำหนด คือ1, 3, 6, 8, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง แล้วตรวจหาการตกค้างของยา Sulfamethazine ในตับ ไต กล้ามเนื้อ และซีรั่ม ด้วยชุดตรวจสอบ Delvotest -SP® ซึ่งเป็นชุดตรวจสอบที่เติม Trimethoprim เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจหายากลุ่ม Sulfonamides พบว่ามีการตกค้างของยาอยู่ในช่วง 1 ถึง 24 ชั่วโมง หลังการทดลองและพบการตกค้างในปริมาณที่ค่อนข้างสูง โดยเฉพาะในซีรั่ม ผลการศึกษาพบว่า Delvotest-SP® มีประสิทธิภาพในการตรวจหายา Sulfamethazine ตกค้างในระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจพบได้ 100% ที่ 1.0 และ 0.5 ไมโครกรัม/ กรัม ในตับและไต ตามลำดับ ในการตรวจพบการตกค้างของ Delvotest-SP® สูงกว่าค่าที่ยอมรับให้มีได้ (Tolerance level) ของยา Sulfamethazine ที่กำหนดไว้โดยประเทศสหรัฐอเมริกาที่ 0.1 ไมโครกรัม/ กรัม ในตับและไตของไก่ (Sundlof *et al*, 1992)

ธงชัย และคณะ (2537) ศึกษาดัดแปลงวิธีการใช้ชุดตรวจสอบ Delvotest -P® ในการตรวจหายาตกค้างในน้ำนมโดยอุ่นน้ำนมที่อุณหภูมิ 80° C นาน 3 นาที เพื่อทำลายสารยับยั้งแบคทีเรียที่มีอยู่ในน้ำนมตามธรรมชาติเช่น Lactoferrin และ Lysozymes มีผลต่อการตรวจสอบของชุดตรวจสอบ ผลการศึกษาพบว่าการอุ่นน้ำนมนี้ ให้ผลเพิ่มประสิทธิภาพความน่าเชื่อถือของชุดตรวจสอบ Delvotest -P® โดยลดการให้ผลบวกเท็จจาก 22.03% เป็น 4.42 %

ธงชัย และคณะ (2539) ได้นำวิธีการอุ่นน้ำนมดังกล่าวมาใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจสอบยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมด้วยวิธี Delvotest -P® และDisk diffnsion ว่าการอุ่นน้ำนมที่อุณหภูมิ 80° C นาน 3 นาที มีผลเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจสอบของทั้ง 2 วิธี โดยลดการให้ผลบวกเท็จได้ถึง 42.1 -100 % แต่อย่างไรก็ตามการอุ่นน้ำนมก็อาจทำให้ผลลบเท็จได้ถึง 12.8 - 13.6 % ซึ่งข้อมูลนี้สอดคล้องกับข้อมูลที่รายงาน ไว้โดยสมภพ และคณะ (2539) ว่าการอุ่นน้ำนมก่อนการตรวจหายากานามัยซินตกค้างด้วยวิธี Disk diffusion ทำให้ความเข้มข้นของกานามัยซินของตัวอย่างลดลงซึ่งประเมินผลได้จากการวัดความยาวของเส้นผ่าศูนย์กลางของส่วนใสรอบโคโลนีของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC6633 ที่ เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hilton Agar ที่ความเข้มข้นของยากานามัยซินในระดับต่างๆ

เกรียงศักดิ์ และธงชัย (2541ก) พัฒนาชุดตรวจสอบ KS-9 ขึ้นเพื่อใช้ตรวจหายาปฏิชีวนะและยาซัลฟาในน้ำนมในประเทศไทย โดยอาศัยหลักการเดียวกับชุดตรวจสอบ Delvotest -P® คือวิธี Tube diffusion ที่ผสมสปอร์ของเชื้อ *B. stearothermophilus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม แล้วบรรจุในหลอดทดลองขนาดเล็กมี ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 11x40 มิลลิเมตร ปิดด้วยอลูมินัมฟอยล์ บ่มที่อุณหภูมิ 64±2° C อ่านผลได้ภายในเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที จากการสังเกตุการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ และจากการทดสอบประสิทธิภาพพบว่าชุดตรวจสอบ KS-9 มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะและยาซัลฟาตกค้างในน้ำนมได้ดีมากโดยสามารถตรวจพบยาในกลุ่ม Beta-lactam และ Bacitracin ในระดับที่ยอมรับให้มีได้ (MRL) และตรวจยาปฏิชีวนะชนิดอื่นได้หลายกลุ่มในระดับที่ใกล้เคียงกับค่า MRL และจากการทดสอบความน่าเชื่อถือของชุดตรวจสอบ KS - 9 พบว่ามีค่าความไว ความจำเพาะ และความแม่นยำสูง เกือบ 100 % ในการตรวจน้ำนมดิบ นอกจากนี้พบว่าการอุ่นน้ำนมดิบที่อุณหภูมิ 98± 2°C นาน 5 นาที ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ KS-9 ได้มากขึ้น เพราะความร้อนจะ

ช่วยทำลายสารต้านจุลชีพที่มีอยู่ตามธรรมชาติในน้ำนมดิบได้ เกรียงศักดิ์ และธงชัย (2541ข) จึงได้ศึกษาผลของความร้อนที่ใช้ในการอุ่นตัวอย่างน้ำนมดิบต่อฤทธิ์การต้านจุลชีพธรรมชาติของยาปฏิชีวนะต่างๆ และยาซัลฟาโดยใช้ชุดตรวจสอบ KS-9 ผลการศึกษาพบว่าการอุ่นน้ำนมดิบที่อุณหภูมิ 83±1°C นาน 3 นาที และที่อุณหภูมิ 98±2°C นาน 5 นาที ก่อนการตรวจสอบด้วยชุดตรวจสอบ KS-9 ให้ผลเหมือนกันสำหรับยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ ที่ใช้ตรวจสอบ ยกเว้นการตรวจยา ampillin cephalocin cloxacilin และ framycitin พบว่าความร้อนให้ผลการตรวจสอบที่แตกต่าง และพบว่าชุดตรวจสอบ KS-9 ให้ประสิทธิภาพในการตรวจยา 4 ชนิดหลังนี้ได้ 100 % ที่ระดับความเข้มข้นของยาที่เท่ากับหรือมากกว่า 24, 20, 16 และ 200 ไมโครกรัม/ กิโลกรัม ตามลำดับ ทั้งก่อนและหลังการอุ่นน้ำนมที่อุณหภูมิทั้ง 2 ระดับ

เกรียงศักดิ์ และธงชัย (2541ค) ได้ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ KS-9 กับชุดตรวจสอบสำเร็จรูปอื่นๆ ที่นำเข้าจากต่างประเทศได้แก่ Charm II test®, Charm AIM-96, Charm disk assay, KS-9, ADM, Delvotest-P,® ,*Bacillus stearothermophilus* tablet disk assay และวิธี Disk diffusion โดยใช้เชื้อ *B. stearothermophilus* และ *B. subtilis* ทดสอบกับน้ำนมที่ผสมด้วยยาปฏิชีวนะและยาซัลฟา 12 ชนิด พบว่าชุดตรวจสอบทั้งหมดยกเว้น *Bacillus stearothermophilus* tablet disk assay มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบดีกว่าวิธี Disk diffusion method โดยชุดตรวจสอบ Charm II test® มีความไวดีที่สุด รองลงมาคือ Charm AIM-96, Charm disk assay, KS-9, ADM และ Delvotest-P® ตามลำดับ และเมื่อนำมาตรวจหายาตกค้างในน้ำนมดิบ และน้ำนมพาสเจอร์ไรซ์ ที่ไม่ได้เติมยาพบว่าชุดตรวจสอบสำเร็จรูปทุกชนิดสามารถตรวจพบสารต้านจุลชีพได้มากกว่าวิธี Disk diffusion โดยชุดตรวจสอบ KS-9 มีประสิทธิภาพในการตรวจพบสารต้านจุลชีพได้ดีที่สุด รองลงมาคือ Charm AIM-96, Delvotest-P® ADM, Charm II test® ตามลำดับ

เกรียงศักดิ์ และธงชัย (2542) ได้พัฒนาชุดตรวจสอบ KS-9 ซึ่งเป็นชุดตรวจสอบที่ไม่มีการเติม Trimethoprim ลงไปในชุดตรวจสอบ ทำให้มีความสามารถในการตรวจหายาซัลฟาตกค้างได้ต่ำ ทางคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการเติม Trimethoprim ลงในชุดตรวจสอบ KS-9 เพื่อช่วยเสริมฤทธิ์ยาซัลฟาที่ตกค้าง ให้ชื่อชุดตรวจสอบชนิดนี้ว่าชุดตรวจสอบ KS-9S พบว่าชุดตรวจสอบ KS-9S มีความสามารถในการตรวจหายาซัลฟาตกค้างได้ดีขึ้น และทางคณะผู้วิจัยได้ทำการทดสอบ

เปรียบเทียบประสิทธิภาพแบบ *In vitro* ของชุดตรวจสอบ KS-9 กับ KS-9S ในการตรวจหายา Sulfamethazine, Sulfathiazole, Sulfamethoxazole และ Sulfadiazine ที่ผสมในน้ำกลั่น ผลการทดสอบพบว่าชุดตรวจสอบ KS-9 จะให้ผลบวก 100 % เมื่อปริมาณของยาSulfamethazine, Sulfathiazole และ Sulfadiazine ที่ระดับความเข้มข้นมากกว่า 0.8 ไมโครกรัม/ กรัม และให้ผลบวก 100 % ที่ระดับความเข้มข้นของยา Sulfamethoxazole มากกว่า 0.4 ไมโครกรัม/ กรัม สำหรับชุดตรวจสอบ KS-9S สามารถตรวจพบยาซัลฟาทั้ง 4 ชนิดได้ 100 % ที่ระดับต่ำสุดคือ 0.05 ไมโครกรัม/ กรัม เท่ากัน ซึ่งเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่แสดงถึงประสิทธิภาพในการตรวจสอบหายาซัลฟาของชุดตรวจสอบ KS-9S ดีกว่าชุดตรวจสอบ KS-9