เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 2561; 16(1): 27-36. DOI: 10.14456/cmvj.2018.4

เชียงใหม่สัตวแพทยสาร

Chiang Mai Veterinary Journal

ISSN; 1685-9502 (print) 2465-4604 (online)

Website; www.vet.cmu.ac.th/cmvj

บทความต้นฉบับ

ประสิทธิภาพของชุดทดสอบยาต้านจุลชีพตกค้างในเนื้อสัตว์ โดยใช้หลักการยับยั้งเชื้อจุลชีพ

วรางคณา ไชยชาววงษ์[1,*] ชุลีพร ศักดิ์สง่าวงษ์[2] รวิศา วรินทร์[3] รัชฎาพร บริพันธุ์[3] จำรัส เลิศศรี[4] และมนทิรา อินต๊ะนอน[1]

[1]ภาควิชาชีวศาสตร์ทางสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ต.แม่เหียะ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50100

[2]ภาควิชาสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น ต.ในเมือง อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

[3]คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ต.แม่เหียะ อ. เมือง จ. เชียงใหม่ 50100

[4] ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนบน กรมปศุสัตว์ ต. เวียงตาล อ. ห้างฉัตร จ. ลำปาง 52190

บทคัดย่อ ยาต้านจุลชีพตกค้างในเนื้อสัตว์ก่อให้เกิดผลเสียต่อผู้บริโภค โดยเฉพาะการดื้อยาที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขทั่วโลก วัตถุประสงค์ของงานวิจัยเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของชุดทดสอบยาต้านจุลชีพตกค้างที่ผลิตขึ้น โดยใช้หลักการยับยั้งเชื้อ ผลการวิจัยพบว่า ขีดจำกัดของยากลุ่มเตตราไซคลินที่ชุดทดสอบสามารถตรวจพบได้คือ 400 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อนำชุดทดสอบไปตรวจหายาต้านจุลชีพตกค้างในเนื้อสัตว์ที่วางจำหน่ายในจังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 150 ตัวอย่าง พบผลบวกจำนวน 8 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 5.33 โดยให้ผลสอดคล้องกับ CM®test และไม่สอดคล้องกับ Premi®test เมื่อนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกมาตรวจหาปริมาณยาในกลุ่มเตตราไซคลิน ด้วยวิธี High performance liquid chromatography พบว่ามี 2 ตัวอย่างที่พบการตกค้างของยา ได้แก่ ออกซีเตตราไซคลินร่วมกับคลอเตตราไซคลิน และ เตตราไซคลินร่วมกับออกซีเตตราไซคลิน ในปริมาณ 141, 128, 154, 145 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ชุดทดสอบนี้สามารถใช้ตรวจเบื้องต้นเพื่อเฝ้าระวังยาต้านจุลชีพตกค้างในเนื้อสัตว์ได้ตามขีดจำกัดในการตรวจพบดังกล่าวข้างต้น ชุดทดสอบนี้มีราคาถูกและมีขั้นตอนในการทดสอบไม่ซับซ้อน นอกจากนี้ ผลวิจัยแสดงถึงสถานการณ์ยาต้านจุลชีพตกค้างในเนื้อสัตว์ที่บ่งชี้ถึงความเสี่ยงต่อมนุษย์และต้องการความตระหนักและร่วมมือกันจากทุกฝ่ายในการแก้ไขปัญหา

คำสำคัญ ชุดทดสอบ ยาต้านจุลชีพตกค้าง ยับยั้งเชื้อจุลชีพ เตตราไซคลิน ค่าต่ำสุดที่ตรวจจับได้ เนื้อสัตว์

* **ผู้รับผิดชอบบทความ** วรางคณา ไชยชาววงษ์ ภาควิชาชีวศาสตร์ทางสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ต.แม่เหียะ อ. เมือง จ. เชียงใหม่ 50100โทรศัพท์ 053-948083 ต่อ 109 อีเมล์ warangkhana.chai@cmu.ac.th

ข้อมูลบทความ *วันที่ได้รับบทความ 6 พฤศจิกายน พ.ศ.2560 วันที่ได้รับการตีพิมพ์ 12 มกราคม พ.ศ.2561 วันที่ตีพิมพ์ออนไลน์ 18 มกราคม พ.ศ.2561*

Original Article

Performance of test kit for antimicrobial residue in meats using microbial inhibition assay

Warangkhana Chaisowwong[1,*], Chuleeporn Saksangawong[2], Ravisa Warin[3], Ratchadaporn Boripun[3], Jamras Lerdsri[4] and Montira Intanon[1]

[1] *Department of Veterinary Biosciences and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Mae Hia, Muang, Chiang Mai. 50100*

[2] *Department of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, KhonKaen University, Nai-Muang, Muang District, Khon Kaen 40002*

[3] *Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Mae Hia, Muang, Chiang Mai, 50100*

[4] *Veterinary Research and Development Center (Upper Northern Region) Lampang Hang Chat, Lampang, 52190*

Abstract Antimicrobial residue in meats causes negative effects to consumer especially antimicrobial resistance which is public health problem worldwide. The research aims to study a performance of the test kit that has been developed using microbial inhibition assay. The test kit had Limit of Detection (LOD) for tetracyclines at 400 µg/kg. One hundred-fifty meat samples that sold in Chiang Mai province were tested and 8 (5.33%) samples showed positive result which was concordant to CM® test and discordant to Premi® test. Drug concentration of positive samples were analysed using High performance liquid chromatography. Two samples were found a combination of drug residues including oxytetracycline with chlortetracycline and tetracycline with oxytetracycline at 141, 128, 154, and 145 µg/kg respectively. The test kit can be applied for screening of tetracyclines in meats under the limit of detection as mentioned. It is not expensive and do not require a complicated protocol. Furthermore, this study showed a situation of antimicrobial residue in meats which identified risk to human and needs recognition and collaboration from every stakeholder for solutions.

Keywords: test kit, antimicrobial residue, microbial inhibition, tetracycline, limit of detection, meats

*Corresponding author: Warangkhana Chaisowwong Department of Veterinary Biosciences and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Mae Hia, Meung, Chiang Mai. 50100 Tel: 053-948083 ext. 109; email: warangkhana.chai@cmu.ac.th

Article history; *received manuscript: 6 November 2017, accepted manuscript: 12 January 2018, published online: 18 January 2018*

บทนำ

การเลี้ยงปศุสัตว์ในปัจจุบันมีการพัฒนาให้มีจำนวนสัตว์ต่อพื้นที่มากขึ้นเพื่อให้ได้ผลผลิตสูงเพื่อคุ้มค่ากับการลงทุน และมีการใช้ยาต้านจุลชีพผสมน้ำและอาหารเพื่อควบคุมป้องกันโรคและเพิ่มการเจริญเติบโตนอกเหนือไปจากการรักษาโรค (Stolker, 2005) การใช้ยาต้านจุลชีพอย่างไม่ถูกต้อง ไม่คำนึงถึงขนาดของยาและไม่มีระยะหยุดยาที่เหมาะสม ส่งผลให้ยาต้านจุลชีพนั้นสามารถตกค้างในเนื้อสัตว์และส่งต่อถึงผู้บริโภคได้

ยาต้านจุลชีพที่นิยมใช้ในการเลี้ยงปศุสัตว์นั้นมีหลากหลายกลุ่ม กลุ่มยาเตตราไซคลิน (tetracycline) เป็นยาต้านจุลชีพกลุ่มหนึ่งที่มีการใช้อย่างแพร่หลายในการเลี้ยงปศุสัตว์ทั่วโลก (Economou and Gousia, 2015) รวมถึงประเทศไทย ยากลุ่มนี้ใช้เพื่อรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรีย เช่น โรคปอดอักเสบ (pneumonia) โรคทางเดินอาหารอักเสบ (enteritis) รวมถึงใช้ผสมอาหารเพื่อควบคุมป้องกันโรคและเพิ่มการเจริญเติบโตในการเลี้ยงสุกร โคนม และสัตว์ปีก (Sooksai et al., 2016) เมื่อมีการใช้ยากลุ่มนี้โดยปราศจากความรู้ความเข้าใจและขาดการปฏิบัติที่ดีจะส่งผลให้ยาตกค้างในเนื้อสัตว์และเข้าสู่ร่างกายผู้บริโภคได้ ผลข้างเคียงของยากลุ่มเตตราไซคลิน สามารถสะสมบริเวณฟันและกระดูกทำให้ฟันเปลี่ยนสี กระดูกไม่แข็งแรง โดยเฉพาะในเด็กและหญิงมีครรภ์ ผลข้างเคียงที่สำคัญคือ การเกิดภาวะดื้อยา การศึกษาในผู้ป่วยโรคปอดอักเสบ พบอุบัติการณ์ของเชื้อ *Streptococcus pneumonia* ที่ดื้อยากลุ่มเตตราไซคลินถึงร้อยละ 39.1 (Sangthawan et al., 2003) เมื่อเกิดภาวะดื้อยาหลายชนิดของเชื้อในผู้ป่วยแล้ว จะทำให้ยาที่ใช้ในการรักษาที่มีอยู่ในปัจจุบันอาจไม่สามารถรักษาได้อีกต่อไป และนำไปสู่การเสียชีวิตของผู้ป่วยได้ ดังนั้นการให้ความรู้ความเข้าใจในการใช้ยาต้านจุลชีพแก่เกษตรกรผู้เลี้ยงปศุสัตว์ จึงมีความสำคัญไม่น้อยกว่าการตรวจเฝ้าระวังการตกค้างของยาต้านจุลชีพในอาหารก่อนถึงผู้บริโภคเพื่อความปลอดภัยในอาหาร วิธีการตรวจหายาต้านจุลชีพแบ่งออกเป็นสองประเภทหลักคือวิธีการตรวจเบื้องต้นและวิธีตรวจยืนยัน วิธีตรวจคัดกรองเบื้องต้น (screening method) เช่น การตรวจโดยหลักการยับยั้งเชื้อ (microbial inhibition assay) การตรวจทาง immuno-assay และการตรวจสอบโดยวิธี microbial receptor assay ซึ่งการตรวจหายาต้านจุลชีพวิธีนี้ต้องการความรวดเร็ว ง่ายต่อการใช้ และมีราคาถูกเนื่องจากต้องการตรวจตัวอย่างให้มากที่สุด วิธีตรวจยืนยัน (confirmation test) เช่น High Performance Liquid Chromatography (HPLC) หรือ Liquid Chromatography –tandem mass spectrometry (LC/MS-MS) เป็นวิธีตรวจยืนยันการหาปริมาณของสารตกค้างซึ่งมีค่าใช้จ่ายที่สูงมากและต้องอาศัยเครื่องมือเฉพาะอีกทั้งผู้ตรวจต้องมีความชำนาญในการตรวจวิเคราะห์

วิธีตรวจสอบโดยใช้หลักการการยับยั้งเชื้อ เป็นวิธีดั้งเดิมสำหรับการตรวจหายาต้านจุลชีพและยังเป็นวิธีที่นิยมใช้อย่างแพร่หลาย (Pikkemaat, 2009) หลักการคือการใส่ตัวอย่างที่คาดว่ามีการตกค้างของยาต้านจุลชีพลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานที่ไม่ทนต่อยาต้านจุลชีพและไม่เจริญในอุณหภูมิต่ำกว่า 43 องศาเซลเซียสเช่น *Geobacillus stearothermophilus* และ *Bacillus subtitis* พร้อมกับการผสมสีที่เป็นสารบ่งชี้ขีดความเป็นกรด เมื่อบ่มไว้ที่อุณหภูมิที่พอเหมาะสปอร์ของแบคทีเรียจะเริ่มเจริญเติบโตและผลิตกรดซึ่งจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสี แต่ถ้าหากมียาต้านจุลชีพตกค้างจะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ทำให้ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสีหรือเกิดการเปลี่ยนสีล่าช้า คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ได้พัฒนาและผลิตชุดทดสอบยาต้านจุลชีพตกค้างโดยใช้หลักการยับยั้งเชื้อ โดยทำการทดสอบประสิทธิภาพการตรวจยา

ต้านจุลชีพตกค้างในกลุ่มเตตราไซคลินในน้ำผึ้ง (Saksangawong et al., 2013)

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นเองดังกล่าวในการตรวจหายาต้านจุลชีพตกค้างกลุ่มเตตราไซคลินในเนื้อสัตว์ เพื่อพัฒนาเป็นชุดทดสอบการตกค้างของยาต้านจุลชีพเบื้องต้นแก่เกษตรกรและหน่วยงานที่เกี่ยวข้องในเขตจังหวัดภาคเหนือตอนบนเพื่อเฝ้าระวังยาต้านจุลชีพตกค้างในเนื้อสัตว์หรือผลิตภัณฑ์จากสัตว์

อุปกรณ์และวิธีการ

การผลิตชุดทดสอบ

แบคทีเรีย *Geobacillus stearothermophilus* DMST 8041 (จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย) ที่เก็บไว้ภายใต้อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส มาเพิ่มจำนวนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (Oxoid, Hamshiere, England) ที่อุณหภูมิ 65±1องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่ใช้อากาศ หลังจากนั้นทำการเลือกโคโลนีเดี่ยวแล้วย้ายโคโลนีลงในอาหารเหลว Nutrient broth (Oxoid, Hamshiere, England) บ่มที่อุณหภูมิ 65±1องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นปั่นเซลล์ในอาหารเหลวที่บ่มแล้วโดยใช้ความเร็ว 2,192 g ที่ 25องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จากนั้นล้างเซลล์ด้วยสารละลายน้ำเกลือร้อยละ 0.85 จำนวน 3 ครั้ง นำเชื้อแบคทีเรียที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 95±1องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นทำการปั่นเซลล์ที่บ่มแล้วโดยใช้ความเร็ว 2,192 g ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วนำเชื้อมาเจือจางกับสารละลายน้ำเกลือจนได้ความเข้มข้น 10^8-10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร ยืนยันจำนวนเชื้อด้วยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar แล้วนับจำนวนโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ นำเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการเจือจางเชื้อจนได้ความเข้มข้น 10^8-10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 400 ไมโครลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเตรียมตามวิธีของ Saksangawong et al. (2013) ซึ่งมีองค์ประกอบของ Yeast extract, Peptone, Tween 80, Glucose, NaCl, K_2HPO_4, Agar, Starch และสีย้อม Bromocresol purple ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร รอให้สารละลายในชุดทดสอบแข็งตัวประมาณ 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การหาค่าต่ำสุดที่ชุดทดสอบสามารถตรวจจับได้

ในการหาค่าต่ำสุดที่ชุดทดสอบสามารถตรวจจับได้ (detection limit) เตรียมสารละลายยากลุ่มเตตราซัยคลิน โดยใช้ยาต้านจุลชีพชนิดผงแบบละลายน้ำ ได้แก่ ตัวยา คลอร์เตตราซัยคลิน (Chlotetracycline, Genermycin®, Thailand) และออกซิเตตราไซคลิน (Oxytetracycline, Oxycline Soluble®, Thailand) ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยนำยากลุ่มเตตราไซคลินชนิดผงปริมาณ 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 100 มิลลิลตร จากนั้นทำการเตรียมสารละลายยาความเข้มข้นที่ 30, 10, 1, 0.8, 0.6, 0.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยใช้น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเป็นตัวทำละลาย

นำสารละลายยาแต่ละความเข้มข้นปริมาณ 100 ไมโครลิตร หยดลงบนดิสก์กระดาษสำหรับยาต้านจุลชีพ (Whatman®, Antibiotic assay disc) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร จากนั้นนำดิสก์กระดาษไปวางบนชุดทดสอบ และนำชุดทดสอบไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียส โดยทดสอบ 5 ซ้ำในแต่ละความเข้มข้น หยดสารละลายน้ำกลั่นปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงบนดิสก์กระดาษเพื่อใช้เป็นหลอดควบคุม (negative control) อ่านผลเมื่อหลอดควบคุมเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้งหลอด โดยอ่านผลทุก 1 ชั่วโมง (ใช้เวลาประมาณ 3-4 ชั่วโมง) การแปลผลเป็นบวก (พบ

ยาต้านจุลชีพตกค้าง) เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีม่วงมากกว่า 1 ใน 4 ส่วน เมื่อวัดจากส่วนบนของหลอด และแปลผลเป็นลบ (ไม่พบยาต้านจุลชีพตกค้าง) เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั่วทั้งหลอด ดังแสดงใน รูปที่ 1

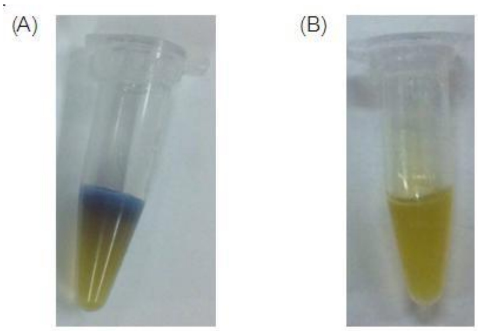

Figure 1 Interpretation for positive and negative results (A) Positive result (B) Negative result

ทดสอบผลรบกวนของน้ำเนื้อ (น้ำที่ได้จากการคั้นเนื้อสัตว์) ต่อชุดทดสอบ ด้วยการเปลี่ยนตัวทำละลายสำหรับยาต้านจุลชีพจากน้ำกลั่นเป็นน้ำที่ได้จากการคั้นเนื้อสัตว์ โดยนำสารละลายยาเตตราไซคลินความเข้มข้นเริ่มต้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เตรียมไว้มาเจือจางด้วยน้ำเนื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วและได้รับการรับรองว่าไม่มียาต้านจุลชีพตกค้างที่ความเข้มข้น 30, 10, 1, 0.8, 0.6, 0.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกับที่กล่าวมาข้างต้น โดยใช้น้ำที่ได้จากการคั้นเนื้อสัตว์เป็นตัวทำละลาย

การตรวจหายาต้านจุลชีพตกค้างจากตัวอย่างเนื้อสัตว์

การหาขนาดตัวอย่างและการเก็บตัวอย่าง

การคำนวณขนาดตัวอย่างตามวิธีของ Cochran (1953) โดยคาดว่าสัดส่วนของการพบยาต้านจุลชีพตกค้างในประชากร เท่ากับ 0.5 ระดับค่าความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 และระดับค่าความคลาดเคลื่อนที่ร้อยละ 10 จากการคำนวณขนาดตัวอย่าง ขนาดตัวอย่างที่ได้ควรมีค่ามากกว่า 97 ตัวอย่าง จึงเก็บตัวอย่างทั้งหมด 150 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างเนื้อสุกร เนื้อไก่และเนื้อโค จากตลาดสดจำนวน 17 แห่ง ในรัศมีรอบคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ ระยะทาง 25 กิโลเมตร เก็บตัวอย่างเนื้อสัตว์เฉพาะส่วนของกล้ามเนื้อ (muscle) ไม่รวมผิวหนัง (skin) หรือไขมัน (fat) อย่างน้อย 60 กรัมต่อตัวอย่าง บรรจุลงในถุงพลาสติกที่ปลอดเชื้อ ปิดปากถุงให้สนิท บรรจุตัวอย่างในกล่องทำความเย็น และส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ ณ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การตรวจหายาตกค้างในเนื้อสัตว์ด้วยชุดทดสอบ

ตัดตัวอย่างเนื้อสัตว์เป็นชิ้นขนาดเล็ก ด้วยอุปกรณ์สำหรับบดและคั้นน้ำจากเนื้อสัตว์ จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อเอาเศษเนื้อออก จนได้น้ำจากเนื้อปริมาณ 0.5-1.0 มิลลิลิตรต่อตัวอย่าง หยดน้ำเนื้อที่คั้นได้ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงบนดิสก์กระดาษสำหรับยาต้านจุลชีพ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร จากนั้นนำดิสก์กระดาษไปวางบนชุดทดสอบ และนำชุดทดสอบไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียส โดยจะตรวจสองซ้ำ (duplication) หยดสารละลายยาเตตราไซคลิน ความเข้มข้น 0.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 100 ไมโครลิตรลงบนดิสก์กระดาษแล้ววางบนชุดทดสอบ เพื่อใช้เป็นหลอดควบคุมผลบวก (positive control) และ Brian Heart Infusion broth ปริมาณ 100 ไมโครลิตร เพื่อใช้เป็นหลอดควบคุมผลลบ อ่านผลเมื่อหลอดควบคุมผลลบเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้งหลอด โดยอ่านผลทุก 1 ชั่วโมง การแปลผลเป็นบวก เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีม่วงมากกว่า 1 ใน 4 ส่วน เมื่อวัดจากส่วนบนของหลอด และแปลผลเป็นลบ เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั่วทั้งหลอด ดังแสดงใน รูปที่ 1

การหาความสอดคล้องกับชุดทดสอบ Premi®test และ CM®test

ตัวอย่างจำนวน 49 ตัวอย่างจะถูกสุ่มแบบเป็นระบบ (systematic random sampling) โดยจะสุ่มทุก 3 ตัวอย่างตามลำดับการเก็บตัวอย่าง เพื่อทดสอบความสอดคล้องกับชุดทดสอบ Premi®test (r-biopharm®, Darmstadt, Germany) และชุดทดสอบ CM®test (Chalermchaikit et al., 2002) ที่มีวางจำหน่ายในเชิงพาณิชย์

การตรวจหาปริมาณยากลุ่มเตตราไซคลินด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography

ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นจะถูกนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านจุลชีพตกค้างด้วยวิธี HPLC ตามมาตรฐานของห้องปฏิบัติการชีวเคมีและพิษวิทยา ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนบน กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ โดยตรวจเชิงปริมาณของยาต้านจุลชีพ เตตราไซคลิน ออกซิเตตราไซคลิน คลอร์เตตราซัยคลิน และดอกซีไซคลิน (doxycycline)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

หาค่าความสอดคล้องระหว่างชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นกับชุดทดสอบ CM® test และ Premi® test โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์โคเฮนแคปปา (Cohen's kappa coefficient) โดยโปรแกรมทางสถิติ SPSS 16.0 (SPSS for Windows, Version 16.0. Chicago, SPSS Inc.) สำหรับการแปลผลค่าสัมประสิทธิ์โคเฮนแคปปา (Viera et al., 2005)

ผลการศึกษา

ผลการหาค่าต่ำสุดของยาที่ชุดทดสอบสามารถตรวจจับได้

พบว่าขีดจำกัดในการตรวจพบเตตราไซคลินที่ชุดทดสอบสามารถตรวจได้ (limit of detection; LOD) คือ ความเข้มข้นที่ 0.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือเท่ากับ 400 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งในการทดสอบผลรบกวนของน้ำเนื้อให้ผลเช่นเดียวกัน คือความเข้มข้นที่ 0.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือเท่ากับ 400 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยไม่มีความแตกต่างกัน

Table 1 Detection Limit of test kit for tetracycline concentration

Tetracycline concentration (μg/ml)	Detection result of test kit (Positive/Negative)
30.00	Positive (5/5)
10.00	Positive (5/5)
1.00	Positive (5/5)
0.80	Positive (5/5)
0.60	Positive (5/5)
0.40	Positive (5/5)
0.30	Negative (5/5)
0.20	Negative (5/5)
0.05	Negative (5/5)

ผลการตรวจหายาต้านจุลชีพตกค้างจากตัวอย่างเนื้อสัตว์

ผลการตรวจหายาตกค้างในเนื้อสัตว์โดยชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้น

พบตัวอย่างเนื้อสัตว์ที่มียาต้านจุลชีพตกค้างทั้งหมด 8 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 5.33 และเมื่อจำแนกตามชนิดเนื้อสัตว์พบว่ามียาต้านจุลชีพตกค้างในเนื้อสุกรจำนวน 4 ตัวอย่าง เนื้อไก่ 3 ตัวอย่าง และเนื้อโค 1 ตัวอย่าง โดยคิดเป็นร้อยละ 50, 37.5, และ 12.5 ของตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้งหมด ตามลำดับ สัดส่วนของการพบยาต้านจุลชีพตกค้างตามชนิดเนื้อสัตว์แสดงใน รูปที่ 2

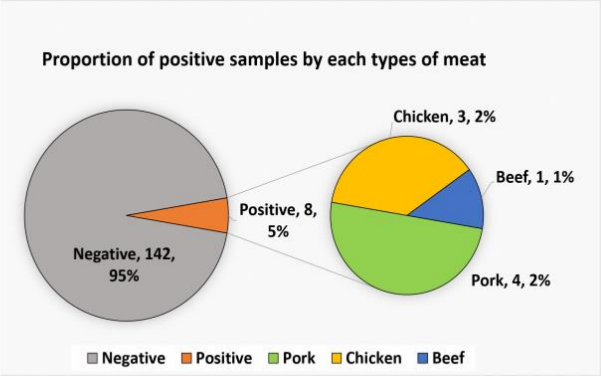

Figure 2 Number and proportion of positive samples by each types of meat

ผลการหาความสอดคล้องต่อชุดทดสอบ Premi® Test

ผลความสอดคล้องต่อชุดทดสอบ Premi®test แสดงในตารางที่ 2 จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลที่สอดคล้องกันซึ่งแสดงในช่อง A และ D จากตารางแสดงให้เห็นว่าไม่มีตัวอย่างที่แสดงผลบวกกับทั้งสองชุดทดสอบ และมีตัวอย่างที่แสดงผลเป็นลบกับทั้งสองชุดทดสอบจำนวน 44 ตัวอย่าง จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลไม่สอดคล้องกันซึ่งแสดงในช่อง B และ C มี 4 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้น แต่ชุดทดสอบ Premi® test ให้ผลเป็นลบ และมี 1 ตัวอย่างที่ชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นให้ผลเป็นลบ แต่ Premi®test ให้ผลเป็นบวก

Table 2 Concordance of results between developed test kit and Premi®test

		Premi® Test		
		Positive	Negative	Total
Test kit (This study)	Positive	0 (A)	4 (B)	4
	Negative	1 (C)	44 (D)	45
Total		1	48	49

ค่าความสอดคล้องโดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์โคเฮนแคปปา (Cohen's kappa coefficient) มีเท่ากับ -0.034 และ P value = 0.763 แปลผลได้ว่า ผลการทดลองจากชุดทดสอบ 2 ชุดไม่มีความสอดคล้องกัน

ผลการหาความสอดคล้องต่อชุดทดสอบ CM®Test

ผลความสอดคล้องของชุดทดสอบแสดงในตารางที่ 3 ทุกตัวอย่างที่นำมาทดสอบให้ผลที่มีความสอดคล้องกัน เมื่อนำมาหาค่าความสอดคล้องโดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์แคปปา พบว่ามีค่าสัมประสิทธ์ เท่ากับ 1.000 และ P value <0.000 แปลผลได้ว่า ชุดทดสอบ 2 ชุดมีความสอดคล้องกันสูง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P <0.05)

Table 3 Concordance of results between developed test kit and CM® test

		CM Test®		
		Positive	Negative	Total
Test kit (This study)	Positive	2 (A)	0 (B)	2
	Negative	0 (C)	45 (D)	45
Total		2	45	47

ผลการตรวจหาปริมาณยาต้านจุลชีพตกค้างกลุ่มเตตราไซคลินด้วยวิธี HPLC

จากการตรวจหาปริมาณยาต้านจุลชีพตกค้างของยาเตตราไซคลิน ออกซิเตตราไซคลิน คลอร์เตตรา-ซัยคลิน และดอกซีไซคลิน ในตัวอย่างที่ให้ผลบวกจำนวน 8 ตัวอย่าง พบยากลุ่มเตตราไซคลินได้ใน 2 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 4 โดยพบยาตกค้างร่วมกัน 2 ชนิดในทั้งสองตัวอย่าง ตัวอย่างที่ 5 ตรวจพบออกซิ-เตตราไซคลิน ร่วมกับคลอร์เตตราซัยคลินในปริมาณ 128 และ 145 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และตัวอย่างที่ 8 ตรวจพบ เตตราไซคลินร่วมกับออกซิเต-ตราไซคลิน ในปริมาณ 141 และ 154 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับ

Table 4 Tetracyclines drug residue concentration

Sample number	Test kit (+ / -)	Tetracyclines drug residues concentration (µg/kg)*			
		Tetracycline	Oxytetracycline	Chlortetracycline	Doxycycline
1	Positive	-	-	-	-
2	Positive	-	-	-	-
3	Positive	-	-	-	-
4	Positive	-	-	-	-
5	Positive	-	128	145	-
6	Positive	-	-	-	-
7	Positive	141	154	-	-
8	Positive	-	-	-	-

* The HPLC –PDA detector that has detection limit at 0.025 ppm. (25 µg/kg)

วิจารณ์

หนึ่งในวิธีทดสอบประสิทธิภาพของชุดทดสอบ โดยอ้างอิงมาจาก Decision 2002/657/EC (European Commission, 2002) คือการหา detection capability (CCβ)/sensitivity หรือการหาขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) (Hoff et al., 2011) โดยจะเทียบค่าเหล่านี้กับค่าปริมาณยาตกค้างสูงสุดที่ยอมรับได้ (Maximum Residue Limits: MRL) ซึ่งอ้างอิงมาจาก European Commission (2010) ผลของงานวิจัยนี้พบว่าค่า LOD ของเตตราไซคลินคือ 400 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งมีค่าสูงกว่าค่า MRL ที่กำหนดในเนื้อสัตว์เท่ากับ 200 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ดังนั้นชุดทดสอบนี้ยังคงต้องการการพัฒนาและทดสอบให้มีค่า LOD ให้ต่ำกว่าค่า MRL และยังต้องการการทดสอบประสิทธิภาพในยากลุ่มอื่นต่อไป เมื่อเปรียบเทียบผลรบกวนจากน้ำเนื้อ โดยใช้น้ำเนื้อเป็นตัวทำละลายยาต้านจุลชีพ ให้ผลการทดสอบเช่นเดียวกับการใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายยา แสดงให้เห็นว่าไม่มีการรบกวนจากสารที่อยู่ในน้ำเนื้อต่อชุดทดสอบ อย่างไรก็ตามชุดทดสอบที่ใช้หลักการยับยั้งเชื้อนั้นมีข้อจำกัดคือเป็นชุดทดสอบเพื่อการตรวจหายาต้านจุลชีพในเบื้องต้นเท่านั้น โดยให้ผลในเชิงคุณภาพเช่นผลบวกและลบ หากต้องการผลการตรวจในเชิงปริมาณจะต้องตรวจยืนยันด้วยวิธีที่ระบุตามมาตรฐาน เช่นการตรวจหาปริมาณสารด้วยวิธี HPLC

จากการวิเคราะห์ความสอดคล้องของชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นและPremi®Test พบว่า ผลของทั้งสองชุดทดสอบไม่มีความสอดคล้องกัน Premi®Test ซึ่งเป็นชุดทดสอบที่ได้รับการรับรองจากหน่วยงาน AOAC (Association of Official Analytical Chemists) และได้รับการรับรองจากหน่วยงาน AFNOR (Association Française de Normalisation French Standardization Association) โดยพบว่ามีตัวอย่างที่แสดงผลไม่สอดคล้องกัน 5 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 49 ตัวอย่าง และเมื่อนำ 4 ตัวอย่างที่แสดงผลบวกต่อชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้น แต่ชุดทดสอบ Premi®Test ให้ผลเป็นลบ ไปตรวจหาปริมาณของยากลุ่มเตตราไซคลินด้วยวิธี HPLC พบว่า ตัวอย่างทั้งหมดไม่พบยากลุ่มเตตราไซคลินตกค้างในตัวอย่าง ถึงแม้จะเป็นไปได้ว่าชุดทดสอบที่ผลิตขึ้นนี้จะให้ผลบวกปลอม (false positive) แต่เนื่องจากในการศึกษานี้ใช้ HPLC เพื่อตรวจเพียงยาในกลุ่มเตตราไซคลินเท่านั้น จึงไม่สามารถตัดประเด็นที่ว่า ชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจจับยาต้านจุลชีพในกลุ่มยาอื่นนอกเหนือจากยากลุ่มเตตราไซคลินเนื่องจากชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นโดยใช้หลักการยับยั้งเชื้อนั้น สามารถตรวจหายาต้านจุลชีพตกค้างอื่นที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ เมื่อนำไปหาค่าความสอดคล้องกับชุดทดสอบ CM®Test ซึ่งนิยมนำมาทดสอบหายาต้านจุลชีพตกค้างในเชิงพาณิชย์และใช้ทดสอบกันอย่างแพร่หลายในประเทศ

ไทย พบว่าสอดคล้องกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

จะเห็นได้ว่าจากการตรวจสอบเบื้องต้นของการตกค้างของยาต้านจุลชีพ ชุดทดสอบที่ผลิตขึ้นสามารถตรวจพบการตกค้างของยาต้านจุลชีพในตัวอย่างทั้งหมด ร้อยละ 5.33 และจำแนกตามชนิดเนื้อสัตว์พบการตกค้างของยาต้านจุลชีพในเนื้อสุกร เนื้อไก่และเนื้อโค ร้อยละ 50, 37.5, และ 12.5 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าแนวโน้มการพบยาตกค้างในเนื้อสัตว์โดยเฉพาะสุกรและสัตว์ปีกยังคงเป็นปัญหาสำคัญที่ต้องเร่งป้องกันและแก้ไข จากการศึกษาของ Sooksai et al. (2016) พบว่าเกษตรกรมีการใช้ยาต้านจุลชีพในฟาร์มปศุสัตว์มาถึงร้อยละ 98 และเกษตรกรยังคงมีการใช้ยาต้านจุลชีพอย่างไม่สมเหตุผล โดยในฟาร์มสุกรและสัตว์ปีกจะมีการใช้ยาออกซิเตตราไซคลิน ทุกครั้งหลังสัตว์ได้รับวัคซีนและให้เพื่อการป้องกันโรคเมื่อสัตว์แสดงภาวะที่ผิดปกติไปจากเดิม แสดงให้เห็นถึงความเสี่ยงของการตกค้างของยาในเนื้อสัตว์และนำไปสู่ปัญหายาต้านจุลชีพตกค้างและเกิดเชื้อดื้อยาได้ ทั้งนี้ควรมีการสื่อสารความเสี่ยงนี้กับผู้เกี่ยวข้องทุกฝ่าย และมีการเฝ้าระวังการใช้ยาและการมีระยะหยุดยาที่เหมาะสมในการเลี้ยงสัตว์

เมื่อนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้ง 8 ตัวอย่าง มาตรวจหาปริมาณยาตกค้างในกลุ่มเตตราไซคลินด้วยวิธี HPLC สามารถตรวจพบปริมาณของยากลุ่ม เตตราไซคลิน 2 ตัวอย่าง และอาจเป็นไปได้ว่าใน 6 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากการตรวจสอบเบื้องต้น มีการปนเปื้อนกลุ่มยาต้านจุลชีพตกค้างชนิดอื่นที่ไม่ใช่ยากลุ่มเตตราไซคลินอย่างไรก็ตาม แม้ชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นจากหลักการยับยั้งเชื้อจะเป็นเพียงการทดสอบเบื้องต้นสามารถบอกผลได้ในเชิงคุณภาพว่าพบหรือไม่พบยาต้านจุลชีพตกค้าง แต่ชุดทดสอบเบื้องต้นนี้ถูกพัฒนาให้มีราคาถูก สะดวกในการใช้งานในพื้นที่ สามารถรู้ผลเบื้องต้นได้ว่ามีหรือไม่มียาตกค้าง และยังลดค่าใช้จ่ายในการตรวจยืนยันเพื่อหาปริมาณสารตกค้างในเนื้อสัตว์

สรุป

ชุดทดสอบที่ผลิตขึ้นเองนี้สามารถใช้เป็นชุดทดสอบคัดกรองเบื้องต้นสำหรับการตรวจหายาต้านจุลชีพตกค้างในกลุ่มเตตราไซคลินโดยมีขีดจำกัดในการตรวจพบคือ 400 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยผ่านการทดสอบว่าสามารถใช้ทดสอบในเนื้อสัตว์ ได้แก่ เนื้อสุกร เนื้อโค และเนื้อไก่ โดยไม่มีผลรบกวนจากน้ำเนื้อ จากผลของการสำรวจยาต้านจุลชีพในเนื้อสัตว์ พบความเสี่ยงของการตกค้างของยาในเนื้อสัตว์และอาจนำไปสู่ปัญหายาต้านจุลชีพตกค้างและเกิดเชื้อดื้อยาได้

กิตติกรรมประกาศ

บริษัทฮูเวฟาร์มา (ประเทศไทย) จำกัด สนับสนุนทุนวิจัย คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ในการอนุเคราะห์เสถานที่ในการดำเนินงานวิจัย คุณจำรัส เลิศศรี นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ และสัตวแพทย์หญิง ดร.พัชรี ทองคำคูณ ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนบน กรมปศุสัตว์ สำหรับอนุเคราะห์การตรวจด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

เอกสารอ้างอิง

Chalermchaikit, T., Poonsook, K., Dangprom., K., Lertworapreecha, M., Jotisakulratana, K., 2002. Efficiency of antimicrobial residue screening test kit for meat "CM-Test". Agricultural Sci. J. 33 (Suppl.), 376-379. (in Thai)

Cochran, W.G., 1953. Sampling techniques. Wiley, New York.

Economou, V., Gousia, P., 2015. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. Infect Drug Resist. 8, 49-61.

European Commission. 2002. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002: implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Off J Eur Commun. L221:8–36.

European Commission. 2010. Commission Regulation 37/2010 of 22 December 2009: on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. Off J Eur Commun. L15:1–72

Hoff, R., Ribarcki, F., Zancanaro, I., Castellano, L., Spier, C., Barreto, F., Fonseca, S.H., 2011. Bioactivity-based screening methods for antibiotics residues: a comparative study of commercial and in house developed kits. Food Addit Contam: part A: Chem Anal Control Expo Risk Assess 29, 577-586.

Pikkemaat, M.G., 2009. Microbial screening methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals. Anal Bioanal Chem 395, 893-905.

Saksangawong, C., Intipunya, P., Pinthong, R., Kanongnooch, C., 2013. Development and evaluation of a screening test kit for detection of tetracycline group residues in honey. CMU.J. Nat. Sci. 12, 13-24.

Sangthawan, P., Chantaratchada, S., Chanthadisai, N., Wattanathum, A., 2003. Prevalence and clinical significance of community-acquired penicillin-resistant pneumococcal pneumonia in Thailand. Respirology 8, 208-212.

Sooksai, N., Ratbamroong, N., Suwannaprom, P., Chowwanapoonpohn, H., 2016. The use of antibiotics in livestock farms: case study in Chiang Mai province. Thai J Pharm Pract 8. (in Thai)

Stolker, A.A.M., 2005. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals—a review. J Chromatogr A. 1067, 15–53.

Viera, A.J., Garrett, J.M., 2005. Understanding Interobserver Agreement: The Kappa Statistic. Fam. Med. 37, 360-363.