Research Articles

Development of Test Kits for Antibiotics Determination in Poultry Feed by Microbiological Assay

Sutthiporn Phiriyayon*[1] Wantana Jantaramongkon[1] Sontaya Aimhun[1]

[1]Feed Quality Control Laboratory Division, Bureau of Quality Control of Livestock Products,
91 Moo.4 Tiwanon Rd. Bangkadi, Muang, Pathumthani 12000, Thailand
*Corresponding author, E-mail address: phiriyayon@gmail.com

Abstract

This study was to develop of test kit for antibiotics determination in Poultry feed by Microbiological assay with 5 standard cultures of *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P. The results showed that chlortetracycline, tetracycline, oxytetracycline, and erythromycin were sensitive to the lowest concentration at 0.97 mg/kg, spiramycin and tylosin were sensitive to the lowest concentration at 1.95 mg/kg. Whereas, zinc-bacitracin, monensin and lincomycin were sensitive to the lowest concentration at 3.90, 7.81 and 7.81 mg/kg respectively. One hundred and seventy one (171) of 406 samples (42.12%) were found the positive samples by microbiological assay and 71 samples (17.48%) were detected as chlotetracycline by using HPLC-UV. Some positive sample may be contaminated with other antibiotics without analysis. Furthermore, poultry feeds of 57 certified farms were not found the inhibition zone when applied to both of test plate and test tube methods. It was indicated that poultry feeds of certified farms were free from antibiotic residue. The comparative results of test plate and test tube methods showed the consistent result. The test kits can be analyzed in many kinds and groups of antibiotics in poultry feeds in one time. The microbiological assay with 4 standard cultures method were used to screen the antibiotic contaminated feed before analyzing with the high class instrument HPLC-UV. The test plate method was suitable for pellet or powder feed. Whereas, the test tube method was suitable for liquid (sample was extracted by solvent) or drinking water sample in farm. The study of stocking test kits in the refrigerator at 4°C showed that they can be used to detect antibiotics up to 21 days, but the sensitivity would be decreased. Therefore, these test kits can be used to monitor, control antibiotic in any field and also used as a primary indicator for free antibiotic farms.

Keywords: Antibiotics, Poultry feed, Microbiological test kit

การพัฒนาชุดตรวจสอบสารปฏิชีวนะในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูป สำหรับไก่ โดยวิธีทดสอบทางจุลชีววิทยา

สุทธิพร พิริยายน[1*] วันทนา จันทรมงคล[1] สนทยา เอี่ยมหุ่น[1]

[1]กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์
91 ม.4 ถ.ติวานนท์ ต.บางกะดี อ.เมือง จ.ปทุมธานี 12000
[*]ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: phiriyayon@gmail.com

บทคัดย่อ

จากการพัฒนาชุดตรวจสอบเพื่อหายาปฏิชีวนะในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับไก่โดยวิธีทดสอบทางจุลชีววิทยาด้วยเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน 5 ชนิด คือ *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Bacillus cereus* ATCC 11778 *Micrococcus luteus* ATCC 9341 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P พบว่ายาปฏิชีวนะชนิด Chlortetracycline Tetracycline Oxytetracycline และ Erythromycin มีความไวที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 0.97 mg/kg และมีความไวกับ Spiramycin และ Tylosin ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 1.95 mg/kg ในขณะที่ Zinc-Bacitracin Monensin และ Lincomycin มีความไวที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 3.90 7.81 และ 7.81 mg/kg ตามลำดับ ผลการใช้ชุดตรวจสอบด้วยเชื้อมาตรฐาน 4 ชนิด ในห้องปฏิบัติการกับตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับไก่จากฟาร์ม จำนวน 406 ตัวอย่าง พบผลบวกทั้งหมด 171 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 42.12 และตรวจพบ chlortetracycline จำนวน 71 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 17.48 ด้วยวิธี HPLC-UV จากการทดสอบใช้ชุดตรวจสอบทางจุลชีววิทยาในห้องที่กับตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับไก่จากฟาร์มทั้งหมด 57 แห่ง ไม่พบการเกิดโซนยับยั้งเชื้อกับชุดตรวจสอบทั้งแบบเพลทและหลอดทดสอบ จากการเปรียบเทียบผลชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นแบบเพลททดสอบและแบบหลอดทดสอบพบว่าให้ผลสอดคล้องกันและช่วยคัดกรอง ตัวอย่างที่ปนเปื้อนยาปฏิชีวนะเพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือชั้นสูง ซึ่งวิธีแบบเพลททดสอบเหมาะสมกับตัวอย่างที่เป็นเม็ดและผง และวิธีแบบหลอดทดสอบเหมาะสมในการตรวจกับตัวอย่างที่สกัดเป็นของเหลวหรือน้ำที่ใช้ในการเลี้ยงสัตว์ และจากการศึกษาการเก็บรักษาชุดตรวจสอบในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถใช้ตรวจสอบยาปฏิชีวนะได้ถึง 21 วัน แต่ความไวจะลดลง ชุดตรวจสอบนี้สามารถใช้เป็นเครื่องมือช่วยตรวจหาการใช้ยาปฏิชีวนะในฟาร์มได้อย่างรวดเร็วและทั่วถึงและใช้เป็นดัชนีบ่งบอกว่าเป็นฟาร์มเลี้ยงไก่แบบปลอดยาปฏิชีวนะตกค้างได้ดีระดับหนึ่ง

คำสำคัญ : ยาปฏิชีวนะ อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับไก่ ชุดตรวจสอบทางจุลชีววิทยา

บทนำ

ยาปฏิชีวนะ (Antibiotics) เป็นสารที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้น มีผลยับยั้งหรือฆ่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น (Guilfoile P.G., 2007) ยาปฏิชีวนะส่วนใหญ่ถูกนำมาใช้เพื่อวัตถุประสงค์ด้านการรักษาโรคติดเชื้อต่างๆ ในมนุษย์และสัตว์ แต่อย่างไรก็ตามยังมีการนำยาปฏิชีวนะมาใช้เป็นสารส่งเสริมหรือเร่งการเจริญเติบโตและป้องกันโรคในสัตว์ (Castanon.J. I. R.2007) แต่เนื่องจากความจำเป็นในการนำยาปฏิชีวนะมาใช้เพื่อป้องกันโรคและเพิ่มผลผลิตในการเลี้ยงสัตว์โดยขาดความรู้และการควบคุมการใช้อย่างเข้มงวด นอกจากนี้ยังมีการใช้ยาปฏิชีวนะติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน ทำให้ยาปฏิชีวนะตกค้างในผลิตภัณฑ์ที่เป็นอาหาร ซึ่งทำให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค อาจก่อให้เกิดอาการแพ้ยาและมีผลต่อแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหาร ทำให้เชื้อโรคเกิดการดื้อยา และบางชนิดเป็นสารก่อมะเร็ง (Ergin Kaya and Filazi, 2010) ปัจจุบันการตรวจหายาปฏิชีวนะด้านชนิดและปริมาณทำได้หลายวิธี เช่น ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) HPLC (High performance liquid chromatography) และ LC-MS/MS (Liquid chromatography-mass spectrophotometer/mass spectrophotometer) (ภิรมภรณ์ และคณะ 2554) ซึ่งแต่ละวิธีมีการวิเคราะห์ที่ซับซ้อน ใช้เครื่องมือราคาแพง ทำให้ต้นทุนการวิเคราะห์สูง จากแนวทางดังกล่าวจึงต้องมีการวิจัยเพื่อพัฒนาหาเทคนิคและการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะอย่างง่าย ราคาถูก เกษตรกรสามารถตรวจสอบได้เอง ซึ่งวิธีตรวจสอบยาปฏิชีวนะโดยวิธีทางจุลชีววิทยาเป็นเทคนิคที่อาศัยเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติถูกยับยั้งการเจริญด้วยยาปฏิชีวนะชนิดนั้น สามารถตรวจสอบยาปฏิชีวนะได้สะดวกและรวดเร็ว อีกทั้งยังตรวจได้ในระดับ mg/kg (ppm=part per million) และยังมีการประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวางทั้งทางด้านเภสัชวิเคราะห์ (Breiret *al.,* 2002; Mendez *et al.,* 2005; Souza *et al.,* 2006; Vaucheret *al.,* 2006) การวิเคราะห์ในน้ำนมดิบ (Gibertsonet *et al.,* 1995; Nouwset *et al.,* 1999) การวิเคราะห์ในเนื้อสัตว์ (ธงชัย และคณะ, 2545) การวิเคราะห์ในอาหารสัตว์ (Siwczynska M.P. and Kwiatek K., 2007) สำหรับประเทศไทยการเลี้ยงไก่เพื่อการส่งออกต้องปลอดยาและสารเคมีภัณฑ์ต้องห้ามทั้งหมด ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีการวิจัยและพัฒนาชุดตรวจสอบหายาปฏิชีวนะในอาหารสัตว์ด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา ซึ่งสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้จำนวนมากและสามารถตรวจสอบยาได้หลากหลายชนิดในคราวเดียวกัน เพื่อทำให้เกษตรกรมีความมั่นใจในคุณภาพอาหารสัตว์ว่าปราศจากยาปฏิชีวนะ นอกจากนี้ยังเป็นการวิเคราะห์เบื้องต้นเพื่อคัดกรองตัวอย่างก่อนนำไปวิเคราะห์ตรวจสอบด้วยเครื่องมือชั้นสูงในห้องปฏิบัติการ รวมถึงใช้เป็นเครื่องมือเพื่อหาแนวทางในการเฝ้าระวังและป้องกันการใช้ยาปฏิชีวนะในอาหารสัตว์ให้เป็นไปตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2525 เพื่อช่วยเหลือเกษตรกรในการป้องกันไม่ให้มียาปฏิชีวนะต้องห้ามตกค้างในสินค้าปศุสัตว์อีกด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

เครื่องมือและวัสดุ

1. เครื่องมือ : เครื่องชั่งละเอียด 5 ตำแหน่ง เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ เครื่องอบฆ่าเชื้อ ตู้อบเพาะเชื้ออุณหภูมิ 30, 37 และ 62 องศาเซลเซียส (± 1 องศาเซลเซียส) ตู้ปลอดเชื้อ เครื่องเซนตริฟิวจ์

2. อุปกรณ์ เครื่องแก้ว : หลอดทดลอง จานพลาสติกเพาะเลี้ยงเชื้อ (เพลท) ปิเปต หลอด centrifuge Roux flask ขวด Duran Vernier-caliper

3. สารเคมี : 20% Ethanol, 70% Ethanol และ 95% Ethanol 0.85% Sterile normal saline, Antimicrobial Susceptibility test discs (Oxoid, Difco) ชนิดยา Tetracycline 10 μg, Erythromycin 10 μg, Nitrofuratoin 30 μg, Zinc-Bacitracin 10 μg, Monensin 10 μg, Lincomycin 10 μg

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ : Antibiotic Medium No.1 (AM1), Antibiotic Medium No.5 (AM5), Antibiotic Medium No.8 (AM8), Antibiotic Medium No.11 (AM11), Test agar for the residue test acc. to KUNDRAT (KD), Tryptone Soy Agar

5. เชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน : *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Micrococus luteus* ATCC 9341 (Kocuria rhizophila ATCC 9341), *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P

6. สารมาตรฐานยาปฏิชีวนะ : Chlortetracycline (sigma Lot No : 78F-0022) Oxytetracycline (sigma Lot No : 063k06064) และ Tetracycline (sigma Lot No : 118F-0050) Tylosin (sigma Lot No : 115k14991) Spiramycin (sigma Lot No : 68F-0664) Zinc-Bacitracin (sigma Lot No : 19F06481) Erythromycin (sigma Lot No : 87F-

0539) Lincomycin (sigma Lot No : 112K0566) และ Monensin (sigma Lot No : 117k5006)

วิธีการ

1. การเตรียมเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน 5 ชนิด ตามวิธี AOAC Official method of Analysis 957.23. 2007

1.1 Bacillus subtilis ATCC 6633 และ *Bacillus cereus* ATCC 11778 : นำเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Bacillus cereus* ATCC 11778 มา subculture ติดต่อกัน 2 วัน เพื่อให้ได้เชื้อที่แข็งแรงล้าง slant เชื้อที่แข็งแรงด้วย 0.85% Normal Saline 1 ml ดูดใส่ roux flask ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ AM 1 เอียงขวดไปมาเพื่อให้เชื้อกระจายไปทั่วผิวอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน ล้าง roux flask ด้วย 0.85% Normal Saline 5 ml ดูดใส่ sterile centrifuge tube นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm นาน 10 นาที ใช้ปิเปตดูดส่วนใสทิ้ง เติม 20% Ethanol 5 ml นำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 3,000 rpm นาน 10 นาที ใช้ปิเปตดูดส่วนใสทิ้ง เติม 20% Ethanol 5 ml เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.2 *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953 : นำเชื้อ *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953 มา subculture ติดต่อกัน 2 วัน เพื่อให้ได้เชื้อที่แข็งแรง ล้าง slant เชื้อที่แข็งแรงด้วย 0.85% Normal Saline 1 ml ดูดใส่ roux flask ที่มีอาหาร Tryptic soy agar (TSA) เอียงขวดไปมาเพื่อให้เชื้อกระจายไปทั่วผิวอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน และทำเช่นเดียวกับข้อ 1.1

1.3 *Micrococcus luteus* ATCC 9341 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P: นำเชื้อมา subculture ติดต่อกัน 2 วันเพื่อให้ได้เชื้อที่แข็งแรง ล้าง slant เชื้อที่แข็งแรงแล้วด้วย 0.85% Normal Saline 1 ml ดูดใส่ roux flask ที่มีอาหาร Antibiotic medium 11 (AM 11) เอียงขวดไปมาเพื่อให้เชื้อกระจายไปทั่วผิวอาหารแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ล้าง roux flask ด้วย 0.85% Normal Saline 5 ml ดูดใส่ sterile centrifuge tube นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm นาน 10 นาที ใช้ปิเปตดูดส่วนใสทิ้งแล้วเติม 0.85% Normal Saline 5 ml เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมสารละลายยาปฏิชีวนะมาตรฐาน 9 ชนิด คือ Chlortetracycline Tetracycline Oxytetracycline Erythromycin Monensin Spiramycin Tylosin Lincomycin และ Zinc-Bacitracin ที่ระดับความเข้มข้น 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81, 3.90, 1.95 และ 0.97 mg/kg

ชั่ง Chlortetracycline Oxytetracycline และ Tetracycline ละลายด้วย Hydrochloric acid 0.1 N ให้ได้ยาละลายยาความเข้มข้น 1,000 mg/kg เจือจางด้วย Phosphate buffer solution (PBS) pH 5.5 ให้ได้ความเข้มข้น 500 250 125 62.5 31.25 15.62 7.81 3.90 1.95 และ 0.97 mg/kg ปิดด้วยอลูมิเนียมฟอยล์เพื่อป้องกันแสง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเตรียมเช่นเดียวกันกับ Tylosin ละลายด้วย Methanol + PBS pH 7 เจือจางด้วย Methanol + PBS pH 8 Spiramycin ละลายด้วย Methanol + PBS pH 8 เจือจางด้วย Methanol + PBS pH 8 Zinc-Bacitracin ละลายด้วย Hydrochloric acid 0.1 N. + น้ำ เจือจางด้วย PBS pH 6.5 Erythromycin และ Lincomycin ละลายด้วย PBS pH 8 เจือจางด้วย PBS pH 8 และ Monensin ละลายด้วย Absolute Methanol เจือจางด้วย 50% Methanol

3. การเตรียมตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับไก่ผสมสารมาตรฐานยาปฏิชีวนะ

ผสม Chlortetracycline กับอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับไก่บดละเอียดซึ่งผ่านการตรวจสอบด้วยวิธีทางจุลชีววิทยากับเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน 5 ชนิด ไม่พบโซนใสของยาปฏิชีวนะ ให้ได้ความเข้มข้น 1,000 500 250 125 62.5 31.25 15.62 7.81 3.90 1.95 และ 0.97 mg/kg เขย่าแบบหมุนพลิกซ้ายกลับไปขวา (แบบเลข 8) นานประมาณ 30 นาที เพื่อให้ยาผสมเข้าด้วยกัน และระมัดระวังไม่ให้เกิดความร้อน สำหรับการเตรียมตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับไก่ผสม Oxytetracycline Tetracycline Tylosin Lincomycin Spiramycin Zinc-Bacitracin Erythromycin และ Monensin ทำเช่นเดียวกันกับการผสม Chlortetracycline

4. การสกัดตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับไก่ผสมสารมาตฐานยาปฏิชีวนะทำตามวิธี Official Journal of European Communities 1981

ชั่งตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับไก่ที่ผสมสารมาตรฐานยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดประมาณ 1 กรัม ผสมด้วยสารสกัด 5 มิลลิลิตร ดังนี้ Chlortetracycline ใช้ Acetone + น้ำ + Hydrochloric acid 0.1 N. Oxytetracycline และ Tetracycline ใช้ Methanol + Hydrochloric acid 0.1 N. Tylosin ใช้ PBS pH 8 Lincomycin ใช้ Methanol + น้ำ +

Hydrochloric acid 0.1 N. Spiramycin ใช้ Methanol + Phosphate buffer solution pH 8 Zinc-Bacitracin ใช้ Methanol + น้ำ + Hydrochloric acid 0.1 N. Erythromycin ใช้ PBS pH 8 Monensin ใช้ 90% Methanol เขย่า 1 นาที

5. การเตรียมชุดตรวจสอบแบบเพลททดสอบ

5.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ AM5 AM8 AM11 และ KD นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที นำไปแช่ใน Water bath อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

5.2 เติมเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ลงใน AM5 ให้มีปริมาณเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ $1x10^5$ CFU/ml ทำเช่นเดียวกันโดย *Bacillus cereus* ATCC 11778 เติมเชื้อให้ได้ปริมาตรเช่นเดียวกัน ลงใน AM8 และเติมเชื้อ *Micrococcus luteus* ATCC 9341 ลงใน AM11 เติมเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P ลงใน AM11 และเติม *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953 ลงใน KD เขย่าเชื้อให้เข้ากับอาหารโดยไม่ให้เกิดฟองอากาศ

5.3 ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเชื้อแล้วปริมาตร 10 ml ลงเพลท ขนาด 10x100 mm ทิ้งให้วุ้นแข็งตัว ใช้ทดสอบ

6. การเตรียมชุดตรวจสอบแบบหลอดทดสอบ

6.1 เชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Bacillus cereus* ATCC 11778 *Micrococcus luteus* ATCC 9341 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P ทำเช่นเดียวกับข้อ 5.1-5.2 แต่หลังจากเติมเชื้อให้เติม 2,3, 5-Triphnyltetrazolium chloride 0.1% แล้วดูดลงหลอดทดลองชนิดฝาเกลียวขนาด 5 ml ปริมาตรหลอดละ 1ml ทิ้งให้แข็งตัว

6.2 เชื้อ *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953 ทำเช่นเดียวกับข้อ 5.1-5.2 และดูดลงหลอดทดลองเช่นเดียวกับข้อ 6.1

7. วิธีทดลอง

7.1 ทดลองหาวิธีที่ทดสอบที่เหมาะสมและง่ายในการตรวจสอบตัวอย่างอาหารสัตว์ดังนี้

วิธีที่ 1 เพลททดสอบแบบวางตัวอย่างบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

วิธีที่ 2 เพลททดสอบแบบใช้ Paper disc จุ่มลงในสารละลายยาความเข้มข้นต่างๆ

วิธีที่ 3 เพลททดสอบแบบเจาะหลุมขนาด 8 มิลลิเมตร หยดสารละลายยาความเข้มข้นต่างๆ ให้เต็มหลุม

วิธีที่ 4 เพลททดสอบแบบใช้ Cylinder cup โดยหยดสารละลายยาความเข้มข้นต่างๆ ลงไปประมาณ 150 ไมโครลิตร

วิธีที่ 5 หลอดทดสอบแบบดูดสารละลายหรือสารสกัดตัวอย่างใส่ประมาณ 150 ไมโครลิตร

7.1.1 นำเพลททดสอบและหลอดทดสอบไปบ่ม โดยเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Bacillus cereus* ATCC 11778 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส *Micrococcus luteus* ATCC 9341 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953 บ่มที่อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

7.1.2 การอ่านผลเพลททดสอบ รายงานผล "พบ" เมื่อเกิดโซนใส (Inhibition zone) มีขนาดมากกว่า 2 มิลลิเมตร โดยการวัดขนาดความกว้างของบริเวณโซนใสออกจากขอบริมนอกตัวอย่าง อย่างน้อย 2 ค่า แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยโดยค่าที่ได้มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร

7.1.3 การอ่านผลหลอดทดสอบ รายงานผล "พบ" เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อของ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Bacillus cereus* ATCC 11778 *Micrococcus luteus* ATCC 9341 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P ไม่เปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีแดงและอาหารเลี้ยงเชื้อ Bacillus stearothermophilus ATCC 7953 ไม่เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง

7.2 การศึกษาความไวของเชื้อกับสารละลายยาปฏิชีวนะที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0.97-1,000 mg/kg ทั้งหมด 9 ชนิด คือ Chlortetracycline Oxytetracycline Tetracycline Tylosin Spiramaycin Zinc-Bacitracin Erythromycin Lincomycin และ Monensin

7.3 การศึกษาหาความไวของเชื้อกับตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับไก่ที่ผสมยา Chlortetracycline Oxytetracycline Tetracycline Tylosin Spiramaycin Zinc-Bacitracin Erythromycin Lincomycin และ Monensin ที่ระดับ 0.97- 1,000 mg/kg

7.4 การศึกษาหาวิธีที่เหมาะสมในการใช้ตรวจกับอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับไก่ที่มีการสกัดตัวอย่างเพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดที่เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ด้วยวิธีเพลททดสอบแบบใช้ Paper disc แบบเจาะหลุม แบบวาง Cylinder cup และวิธีหลอดทดสอบ

7.5 การตรวจสอบความใช้ได้ของชุดตรวจ

สอบชนิดเพลททดสอบแบบวางอาหารสัตว์โดยตรง และยืนยันชนิดยา Chlortetracycline กับวิธี HPLC-UV (Andrzej P. and *et. al.*, 2005) โดยสุ่มเก็บตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับไก่จากฟาร์มและส่งเข้าตรวจในห้องปฏิบัติการ

7.6 การตรวจสอบความใช้ได้ของชุดตรวจสอบกับอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับไก่ที่เก็บจากฟาร์มและดำเนินการในท้องที่ โดยใช้ชุดตรวจสอบชนิดเพลททดสอบแบบวางอาหารสัตว์โดยตรงและแบบสกัดตัวอย่างทดสอบแบบ Cylinder cup และชุดตรวจสอบแบบหลอดทดสอบ

7.7 การศึกษาประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ไว้นาน 1 7 14 และ 21 วัน กับตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับไก่ที่ผสมยาปฏิชีวนะทั้ง 9 ชนิด ควบคุมคุณภาพโดย (Positive Control) ใช้ Antimicrobial Susceptibility test discs และวางตัวอย่างบนเพลททดสอบ

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

1. ผลการศึกษาความไวของเชื้อกับสารละลายยาปฏิชีวนะแต่ละชนิด

จากผลการทดลองกับเชื้อมาตรฐาน จำนวน 5 ชนิด เพื่อหาชนิดของเชื้อที่เหมาะสมกับสารละลายยาปฏิชีวนะทั้ง 9 ชนิด พบว่า (ตารางที่ 1)

Bacillus subtilis ATCC 6633 มีความไวกับยาปฏิชีวนะ Erythromycin Tetracycline, Chlortetracycline, และ Oxytetracycline ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 0.97 mg/kg Tylosin ที่ความเข้มข้น 3.90 mg/kg และ Monensin ที่ความเข้มข้น 31.25 mg/kg และ Lincomycin ที่ความเข้มข้น 62.5 mg/kg

Bacillus cereus ATCC 11778 มีความไว กับยาปฏิชีวนะ Chlortetracycline Tetracycline Oxytetracycline และ Monensin ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 0.97 mg/kg Erythromycin ที่ความเข้มข้น 1.95 mg/kg Tylosin ที่ความเข้มข้น 125 mg/kg และ Lincomycin และ Zinc-Bacitracin ที่ความเข้มข้น 250 mg/kg

Bacillus stearothermophilus ATCC 7953 มีความไวกับยาปฏิชีวนะ Chlortetracycline Tetracycline Oxytetracycline Monensin และ Tylosin ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 0.97 mg/kg Zinc-Bacitracin ที่ความเข้มข้น 3.90 mg/kg Erythromycin ที่ความเข้มข้น 7.81 mg/kg Lincomycin ที่ความเข้มข้น 15.62 mg/kg และ Spiramycin ที่ความเข้มข้น 31.25 mg/kg

Micrococcus luteus ATCC 9341 มีความไวกับยาปฏิชีวนะ Tylosin Spiramycin และ Erythromycin Tetracycline ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 0.97 mg/kg Chlortetracycline ที่ความเข้มข้น 1.95 mg/kg Oxytetracycline ที่ความเข้มข้น 3.90 mg/kg และ Lincomycin และ Zinc-Bacitracin ที่ความเข้มข้น 7.81 mg/kg

Staphylococcus aureus ATCC 6538P มีความไวกับยาปฏิชีวนะ Chlortetracycline Tetracycline และ Oxytetracycline ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 0.97 mg/kg Erythromycin และ Spiramycin ที่ความเข้มข้น 1.95 mg/kg Tylosin และ Lincomycin ความเข้มข้น 3.90 mg/kg Zinc-Bacitracin ที่ความเข้มข้น 31.25 mg/kg และ Monensin ที่ความเข้มข้น 250 mg/kg

2. ผลการทดสอบตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับไก่ที่ผสมยามาตรฐานแต่ละชนิด

จากผลการทดสอบกับเชื้อมาตรฐาน จำนวน 5 ชนิด เพื่อหาชนิดของเชื้อที่เหมาะสมกับการตรวจหายาในตัวอย่างอาหารสัตว์ พบว่า (ตารางที่ 2)

Bacillus subtilis ATCC 6633 มีความไวกับ Erythromycin และ Tetracycline ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 0.97 mg/kg และ Tylosin ที่ความเข้มข้น 1.95 mg/kg Chlortetracycline และ Oxytetracycline ที่ความเข้มข้น 3.90 mg/kg Monensin ที่ความเข้มข้น 125 mg/kg และ Lincomycin ที่ความเข้มข้น 250 mg/kg

Bacillus cereus ATCC 11778 มีความไวกับ Oxytetracycline และ Tetracycline ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 0.97 mg/kg Chlortetracycline ที่ความเข้มข้น 3.90 mg/kg Monensin และ Erythromycin ที่ความเข้มข้น 15.62 mg/kg และ Tylosin Lincomycin และ Zinc-Bacitracin ที่ความเข้มข้น 250 mg/kg

Bacillus stearothermophilus ATCC 7953 มีความไวกับ Chlortetracycline Tetracycline และ Oxytetracycline ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 0.97 mg/kg Tylosin ที่ความเข้มข้น 1.95 mg/kg Monensin และ Zinc-Bacitracin ที่ความเข้มข้น 3.90 mg/kg Erythromycin ที่ความเข้มข้น 7.81 mg/kg Lincomycin ที่ความเข้มข้น 15.62 mg/kg และ Spiramycin ที่ความเข้มข้น 125 mg/kg

Micrococcus luteus ATCC 9341 มีความไวกับ Erythromycin Tylosin Spiramycin และ Tetracycline ที่ ระดับ

ตารางที่ 1 การศึกษาความเข้มข้นสารละลายยาแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่ำสุด ที่เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ด้วยวิธีการใช้ Paper disc การเจาะหลุม และการวาง Cylinder cup

ชนิดยา	ความเข้มข้นยาต่ำสุดที่เกิดโซนใสจากการยับยั้งการเจริญของเชื้อ (ppm)														
	B. subtilus ATCC 6633			*B. cereus* ATCC 11778			*M. luteus* ATCC 9341			*B. stearothermophilus* ATCC 7953			*S. aureus* ATCC 6538P		
	Paper disc	เจาะหลุม	วาง cup	Paper disc	เจาะหลุม	วาง cup	Paper disc	เจาะหลุม	วาง cup	Paper disc	เจาะหลุม	วาง cup	Paper disc	เจาะหลุม	วาง cup
Tylosin	7.81	3.90	3.90	250	125	125	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	31.25	3.90	15.62
Spiramycin	-	-	-	-	-	-	0.97	0.97	0.97	125	62.50	31.25	62.50	7.81	1.95
Zinc-Bacitracin	-	-	-	250	250	250	31.25	31.25	7.81	15.62	3.90	3.90	250	31.25	31.25
Erythromycin	0.97	0.97	0.97	15.62	3.90	1.95	0.97	0.97	0.97	7.81	7.81	7.81	15.62	3.90	1.95
Lincomycin	250	125	62.5	1000	500	250	7.81	7.81	7.81	15.62	15.62	15.62	31.25	3.90	3.90
Chlortetracycline	1.95	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	1.95	1.95	1.95	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97
Oxytetracycline	15.62	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	31.25	3.90	3.90	3.90	3.90	0.97	1.95	3.90	0.97
Tetracycline	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	31.25	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97
Monensin	250	31.25	31.25	15.62	0.97	0.97	-	-	-	3.90	3.90	0.97	250	250	250

หมายเหตุ - *หมายถึง ไม่เกิดโซนใสกับสารละลายยาชนิดนั้นทุกความเข้มข้น*

ตารางที่ 2 การศึกษาตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับไก่ที่ผสมยาแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่ำสุด ที่เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ด้วยวิธีการใช้วางปกติการเจาะหลุม และ วาง Cylinder cup

ชนิดยา	ความเข้มข้นยาต่ำสุดที่เกิดโซนใสจากการยับยั้งการเจริญของเชื้อ (ppm)														
	B. subtilus ATCC 6633			*B. cereus* ATCC 11778			*M. luteus* ATCC 9341			*B. stearothermophilus* ATCC 7953			*S. aureus* ATCC 6538P		
	วางปกติ	เจาะหลุม	วาง cup	วางปกติ	เจาะหลุม	วาง cup	วางปกติ	เจาะหลุม	วาง cup	วางปกติ	เจาะหลุม	วาง cup	วางปกติ	เจาะหลุม	วาง cup
Tylosin	7.81	1.95	1.95	250	250	250	1.95	0.97	0.97	1.95	1.95	1.95	31.25	31.25	31.25
Spiramycin	-	-	-	-	-	-	1.95	0.97	0.97	250	125	125	125	62.50	62.50
Zinc-Bacitracin	-	-	-	250	250	250	31.25	31.25	31.25	3.90	3.90	3.90	250	62.5	31.25
Erythromycin	0.97	0.97	0.97	15.62	15.62	15.62	0.97	0.97	0.97	7.81	7.81	7.81	15.62	15.62	15.62
Lincomycin	250	250	250	1000	250	250	7.81	7.81	7.81	15.62	15.62	15.62	15.62	15.62	15.62
Chlortetracycline	62.50	62.50	3.90	15.62	7.81	3.90	125	62.50	125	0.97	0.97	0.97	125	125	125
Oxytetracycline	15.62	3.90	3.90	0.97	0.97	0.97	31.25	3.90	3.90	3.90	3.90	0.97	1.95	0.97	0.97
Tetracycline	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	31.25	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	1.95	0.97	0.97
Monensin	250	250	125	15.62	15.62	15.62	-	-	-	7.81	3.90	3.90	250	250	250

หมายเหตุ - *หมายถึง ไม่เกิดโซนใสกับสารละลายยาชนิดนั้นทุกความเข้มข้น*

ความเข้มข้นต่ำสุด 0.97 mg/kg กับ Oxytetracycline ที่ความเข้มข้น 3.90 mg/kg Lincomycin ที่ความเข้มข้น 7.81 mg/kg Zinc-Bacitracin ที่ความเข้มข้น 31.25 mg/kg Chlortetracycline ที่ความเข้มข้น 62.50 mg/kg และ Moninsin ไม่เกิดโซนทุกความเข้มข้น

Staphylococcus aureus ATCC 6538p มีความไวกับยาปฏิชีวนะ Tetracycline และ Oxytetracycline ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 0.97 mg/kg Erythromycin และ Lincomycin ที่ความเข้มข้น 15.62 mg/kg Tylosin และ Zinc-Bacitracin ความเข้มข้น 31.25 mg/kg กับ Spiramycin ที่ความเข้มข้น 31.25 mg/kg Chlortetracycline ที่ความเข้มข้น 125 mg/kg และ Monensin ที่ความเข้มข้น 250 mg/kg

3. ผลการศึกษาเปรียบเทียบการสารสกัดตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับไก่แต่ละชนิดหาความเข้มข้นต่ำสุดที่เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ด้วยวิธีแบบเพลททดสอบโดยการใช้ Paper disc การเจาะหลุม การวาง Cylinder cup และแบบหลอดทดสอบ

จากการการทดลองหาวิธีที่เหมาะสมและง่ายในการใช้ตรวจกับอาหารสัตว์ที่สกัดตัวอย่างพบว่าให้ผลสอดคล้องทั้งแบบเพลททดสอบและแบบหลอดทดสอบ (ตารางที่ 3) จากการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการที่ใช้ในการตรวจแบบเพลททดสอบคือ 1) แบบใช้ Paper disc จุ่มลงในสารละลายตัวอย่างที่สกัดออกที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำไปวางลงในเพลททดสอบ 2) แบบเจาะหลุมเพลททดสอบและหยดสารละลายตัวอย่างลงไป 3) แบบใช้ Cylinder cup หยดสารละลายตัวอย่างที่สกัดปฏิชีวนะความเข้มข้นต่างๆ ลงไป พบว่าวิธีการแบบเจาะหลุม สามารถตรวจสารละลายยาปฏิชีวนะให้ผลชัดเจนดีที่สุด และวิธีที่พบรองลงมาได้แก่วิธี Cylinder cup และ Paper disc ตามลำดับ และวิธีแบบหลอดทดสอบจะสะดวกในการตรวจหาในตัวอย่างที่เป็นของเหลวได้ดี เช่น ตัวอย่างที่สกัด หรือน้ำที่ผสมยาในการเลี้ยงสัตว์และง่ายต่อการเคลื่อนย้ายในท้องที่กว่าแบบเพลททดสอบสามารถผลิตเป็นการค้าได้ต้องมีการทดลองและปรับปรุงอย่างต่อเนื่องต่อไปแต่ไม่สามารถเห็นรูปแบบลักษณะการเกิดโซนที่ใช้ช่วยในการระบุชนิดและปริมาณยาได้

4. ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของชุดตรวจสอบชนิดเพลททดสอบแบบวางอาหารสัตว์โดยตรง และยืนยันชนิดยา Chlortetracycline กับวิธี HPLC-UV

จากผลการทดสอบในห้องปฏิบัติการกับตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับไก่จากฟาร์ม จำนวน 406 ตัวอย่างพบผลบวกทั้งหมด 171 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 42.12 และตรวจพบ Chlortetracycline จำนวน 71 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 17.48 ด้วยวิธี HPLC-UV เนื่องจากต้องใช้ตัวอย่างงบประมาณและเวลาอย่างมากในการตรวจยืนยันผล จึงไม่ได้วิเคราะห์หาชนิดและปริมาณปฏิชีวนะรายการอื่นทั้งนี้เพราะฟาร์มมาตรฐานต้องไม่ใช้สารเคมีและยาชนิดใดที่ต้านจุลชีพจึงต้องไม่พบโซนใส ตัวอย่างที่บวกทางจุลชีววิทยาควรมีการติดตามเฝ้าระวังในท้องที่เพื่อหาสาเหตุอาจมีการผสมยาชนิดอื่นๆ ได้ตามใบสั่งยาจากสัตว์แพทย์หรือลักลอบใช้ยาหรืออาจเกิดการตกค้างจากกระบวนการผลิตอาหารสัตว์ผสมยาหรือมีการใช้วัตถุที่เติมในอาหารสัตว์เพื่อยับยั้งการเจริญเชื้อจุลินทรีย์สูงเกินมาตรฐานที่กำหนด ซึ่งจะเป็นข้อมูลให้เจ้าหน้าที่ควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ ติดตามเก็บตัวอย่างและสั่งรายการวิเคราะห์ซ้ำใหม่ได้ถูกต้องยิ่งขึ้นในการเฝ้าระวังการใช้ยาปฏิชีวนะในฟาร์ม

5. ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของชุดตรวจสอบอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับไก่ที่เก็บจากฟาร์มและดำเนินการในท้องที่ ด้วยชุดตรวจสอบแบบเพลททดสอบและหลอดทดสอบ

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปไก่จากฟาร์มทั้งหมด 57 แห่ง และดำเนินการตรวจสอบเพื่อตรวจหายาตกค้างในท้องที่ โดยใช้ชุดตรวจสอบชนิดเพลททดสอบแบบวางอาหารสัตว์โดยตรงและแบบสกัดตัวอย่างทดสอบแบบเจาะหลุมและแบบ Cylinder cup พบว่าไม่พบโซนใส และชุดตรวจสอบแบบหลอดทดสอบพบว่ามีการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเนื่องจากมีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานให้ผลสอดคล้องกัน ซึ่งอาจใช้เป็นดัชนีบ่งบอกว่าเป็นฟาร์มเลี้ยงไก่แบบปลอดสารปฏิชีวนะตกค้างได้ระดับหนึ่ง

6. ผลการศึกษาประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ชุดตรวจสอบสามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นานถึง 21 วัน แต่จะใช้ได้ดีในช่วง 1-7 วัน และจะมีความไวลดลงสัปดาห์ละประมาณ 1 เท่า ของค่าต่ำสุดที่ตรวจได้ในวันที่ 1 ซึ่งสรุปได้ดังนี้

B. subtilis ATCC 6633 มีความไวต่อ Tetracycline ที่ระดับต่ำสุด 0.97 mg/kg และมีความไวในวันที่ 7 14 และ 21 วัน ที่ระดับ 1.95 3.90 และ 3.90 mg/kg และ Erythromycin มีความไวเช่นเดียวกันแต่ที่ 21 วัน ความไวจะน้อยกว่าเป็นที่ระดับ 7.81 mg/kg

ตารางที่ 3 การศึกษาเปรียบเทียบความเข้มข้นสารสกัดตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับไก่แต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆด้วยวิธีแบบเพลททดสอบโดยการใช้ Paper disc, การเจาะหลุม, การวาง Cylinder cup และแบบหลอดทดสอบ

ชนิดยา	ความเข้มข้นยาต่ำสุดที่เกิดโซนใสจากการยับยั้งการเจริญของเชื้อ (ppm)																			
	B. subtilis ATCC 6633				*B. cereus* ATCC 11778				*M. luteus* ATCC 9341				*B. stearothermophilus* ATCC 7953				*S. aureus* ATCC 6538P			
	Paper disc	เจาะหลุม	วาง cup	หลอดทดลอง	Paper disc	เจาะหลุม	วาง cup	หลอดทดลอง	Paper disc	เจาะหลุม	วาง cup	หลอดทดลอง	Paper disc	เจาะหลุม	วาง cup	หลอดทดลอง	Paper disc	เจาะหลุม	วาง cup	หลอดทดลอง
Tylosin	7.81	1.95	0.97	250	250	125	125	250	1.95	1.95	1.95	3.90	1.95	0.97	0.97	3.90	31.25	15.62	15.62	62.50
Spiramycin	-	-	-	-	-	-	-	-	1.95	1.95	1.95	7.81	250	62.50	31.25	125	62.50	62.50	62.50	62.5
Zinc-Bacitracin	-	-	-	-	250	250	250	250	62.50	31.25	31.25	125	15.62	15.62	3.90	15.62	250	62.50	31.25	62.50
Erythromycin	0.97	0.97	0.97	0.97	31.25	3.90	3.90	31.25	0.97	0.97	0.97	0.97	15.62	15.62	7.81	15.62	31.25	3.90	3.90	15.62
Lincomycin	250	125	125	250	1000	250	250	500	15.62	7.81	7.81	15.62	31.25	15.62	15.62	15.62	31.25	3.90	3.90	31.25
Chlortetracycline	3.90	0.97	0.97	1.95	0.97	0.97	0.97	0.97	1.95	1.95	1.95	1.95	1.95	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97
Oxytetracycline	31.25	0.7	0.97	7.81	0.97	0.97	0.97	0.97	62.50	3.90	3.90	3.90	7.81	1.95	1.95	3.90	1.95	1.95	1.95	1.95
Tetracycline	1.95	0.97	0.97	1.95	0.97	0.97	0.97	0.97	62.50	0.97	0.97	1.95	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97
Monensin	250	125	125	125	62.50	15.62	15.62	62.50	-	-	-	-	7.81	7.81	7.81	7.81	250	250	250	250

หมายเหตุ - *หมายถึง ไม่เกิดโซนใสกับสารละลายยาชนิดนั้นทุกความเข้มข้น*

ตารางที่ 4 การศึกษาหาสารปฏิชีวนะในตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปไก่เพื่อตรวจรับรองมาตรฐานฟาร์มโดยวิธีทดสอบทางจุลชีววิทยาแบบเพลททดสอบกับวิธี HPLC-UV ในห้องปฏิบัติการ

อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับไก่	จำนวนตัวอย่างทั้งหมด	จำนวนตัวที่พบ / ร้อยละ						
		วิธีทดสอบทางจุลชีววิทยา (จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลทดสอบเกิดโซนใสมากกว่า 2 mm)					วิธี HPLC-UV	
		B. subtilis ATCC 6633	*B. cereus* ATCC 11778	*M. luteus* ATCC 9341	*B. stearothermophilus* ATCC 7953	สรุปผล	Chlotetracycline	Oxytetracycline
ชุดที่ 1	244	51 (20.90)	60 (24.59)	39 (15.98)	81 (33.19)	96 (39.34)	38 (15.57)	-
ชุดที่ 2	162	68 (41.98)	57 (35.19)	49 (30.25)	65 (40.12)	75 (46.30)	33 (20.37)	-
รวม	**406**	**119 (29.31)**	**117(28.82)**	**88(21.68)**	**146(35.96)**	**171(42.12)**	**71(17.48)**	**-**

B. cereus ATCC 11778 มีความไวต่อ Tetracycline ที่ระดับต่ำสุด 0.97 mg/kg และมีความไวในวันที่ 7 14 และ 21 วัน ที่ระดับความเข้มข้น 0.97 1.95 และ 3.90 mg/kg และ Oxytetracycline มีความไวเช่นเดียวกันยกเว้นที่ 7 วัน มีความไวที่ระดับ 1.95 mg/kg

M. luteus ATCC 9341 มีความไวต่อ Erythromycin ที่ระดับต่ำสุด 0.97 mg/kg และมีความไวในวันที่ 7 14 และ 21 วัน ที่ระดับ 0.97 7.81 และ 7.81 mg/kg ตามลำดับ พบมีความไวรองลงมาคือ Tylosin และ Spiramycin

B. stearothermophilus ATCC 7953 มีความไวต่อ Chlortetracycline ที่ระดับต่ำสุด 0.97 mg/kg และมีความไวในวันที่ 7 14 และ 21 วัน ที่ระดับความเข้มข้น 3.90 7.81 และ 7.81 mg/kg รองลงมาคือ Tetracycline Oxytetracycline และ Tylosin สำหรับยาชนิดอื่นๆ ดูรายละเอียดตามตารางที่ 5

การใช้งานควรควบคุมประสิทธิภาพชุดตรวจสอบโดยใช้ Antimicrobial Susceptibility test discs ในการควบคุมเป็น positive control สำหรับเพลททดสอบและขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของ Inhibition zone แผ่นยาควบคุมตามรายละเอียดตารางที่ 7

สำหรับผลของการเก็บรักษาเชื้อมาตรฐานพร้อมใช้งานใน 20% Methanol พบว่าเชื้อกลุ่ม Bacillus ในรูปของ

สปอร์ สามารถเก็บรักษาได้นานเกิน 3 เดือน แต่ในส่วนของเชื้อกลุ่มอื่นๆ ที่ใช้ในรูปของเซลล์มีชีวิตจะเก็บรักษาอยู่ได้ประมาณ 2-4 สัปดาห์ ในสารละลาย 0.85% Normal saline ทั้งนี้เพลททดสอบทางจุลชีววิทยาที่เตรียมแล้ว สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้ประมาณ 3 สัปดาห์ แต่ความไวจะลดลงตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 โดยอายุการใช้งานขึ้นอยู่กับการป้องกันไม่ให้น้ำระเหยออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อจนแห้งยกเว้นเพลททดสอบที่ใช้เชื้อ *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953 ที่สามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องได้และสามารถอ่านผลพบยาได้ภายใน 4 ถึง 5 ชั่งโมง (Chafer-Pericas. C. *et al.*, 2010) ซึ่งสามารถพัฒนาเป็นวิธีคัดกรองแบบรวดเร็วเพื่อสุ่มตรวจก่อนเก็บตัวอย่างที่พบยาปฏิชีวนะส่งเข้าห้องปฏิบัติการได้ถูกต้อง และจากการเปรียบเทียบพบว่าการใช้หลอดทดสอบจะเก็บได้นานประมาณ 2 เดือน ซึ่งอาจเนื่องมาจากหลอดทดสอบมีฝาเกลียวปิดป้องกันน้ำระเหยออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีกว่าเพลททดสอบ ซึ่งวิธีนี้สามารถพัฒนาเป็นเทคนิคในการเตรียมอุปกรณ์เป็นชุดตรวจสอบและการพัฒนาให้เก็บรักษาเพื่อให้สามารถใช้งานได้ดีในท้องที่และสามารถผลิตเป็นการค้าได้ต้องมีการทดลองและปรับปรุงอย่างต่อเนื่องต่อไป

การเติมเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมในการตรวจสอบ คือ 1 x 10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตรเพราะจะให้ขนาดโซนใส ที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของเชื้อด้วยฤทธิ์ของยาหรือสารเคมีภัณฑ์ ที่มีขนาดไม่ใหญ่มากจนทับกันในเพลท ในกรณีวางตัวอย่าง 4 จุดต่อ 1 เพลท หากต้องการเพิ่มความไวสามารถลดปริมาณเชื้อที่เติมเป็น 1 x 10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร อาจเกิดโซนทับกันได้ในกรณีที่มียาความเข้มข้นสูงทำให้ไม่สามารถระบุตัวอย่างที่ให้ผลบวกได้

จากการเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar และ Tryptic soy agar พบว่า สามารถใช้แทนอาหารเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ATCC 6633 *B. cereus* ATCC 11778 และ *B. stearothemophilus* ATCC 7953 ยกเว้นเชื้อ *M. luteus* ATCC 9341 สามารถใช้ Tryptic soy agar เท่านั้น แต่ขนาดโซนใสจะมีขนาดเล็กลงเล็กน้อยประมาณ 2 มิลลิเมตร จากเดิม อาจทำให้พบยาปฏิชีวนะที่มีปริมาณต่ำน้อยลง ต้องมีการศึกษาลดปริมาณเชื้อที่เติมให้น้อยลงจากเดิม

วิธีทางจุลชีววิทยา พบว่าสามารถประเมินและใช้เป็นวิธีมาตรฐานได้ในการทดสอบสารปฏิชีวนะตกค้างเบื้องต้นในเนื้อสัตว์ (Okman *et al.*, 1998) ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ใช้การเทเพลทชั้นเดียวสำหรับตัวอย่างอาหารสัตว์ การเทเพลท 2 ชั้น ชั้นล่างเป็นฐานไม่มีเชื้อและมีเชื้อทดสอบเฉพาะชั้นบนซึ่งบางมาก สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของวิธีการตรวจหายาตกค้างที่มีปริมาณต่ำได้ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อบาง (Reamer *et al.*, 1998) การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีทางจุลชีววิทยานี้ได้มีการทดลองและนำมาใช้ในการตรวจสอบหายาปฏิชีวนะในกลุ่ม β-lactam ในน้ำนมโค โดยใช้เชื้อ *Bacillus stearothermophilus* (Katz and Siewierski, 1995) เชื้อ *Micrococcus luteus* ATCC 9341a เพื่อตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณ Penicillin G และ Erythromycin เชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 เพื่อตรวจวิเคราะห์ Streptomycin เชื้อ *Bacillus cereus* ATCC 11778 เพื่อตรวจวิเคราะห์ Tetracycline และเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 ใช้ตรวจวิเคราะห์ Gentamycin โดยวิธี Microbiological assay เพื่อหาฤทธิ์ (Potency) ของยา (Reamer et al., 1998) โดยทั่วไปการแยกชนิดของยาด้วยวิธีทางจุลชีววิทยาจะใช้หาปริมาณของยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ (ฤทธิ์ของยา) ซึ่งมักมีสารอื่นรบกวนได้เช่นกันหากมีระดับความเข้มข้นสูง (Webster *et al.*, 1997) แต่ปัจจุบันได้มีการส่งเสริมให้เลี้ยงสัตว์แบบปลอดสารเคมีและยาทุกชนิด ทำให้การตรวจสอบสารตกค้างด้วยวิธีทางจุลชีววิทยาซึ่งมีต้นทุนต่ำ น่าจะเป็นประโยชน์ในการคัดเลือกไม่ให้มียาต้องห้ามและยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงสัตว์ดังกล่าวได้เป็นอย่างดี ทั้งนี้พบว่าการสกัดตัวอย่างสามารถนำไประเหิดให้แห้งจะตรวจได้ในระดับต่ำถึง ppb แต่หากต้องการนำไปใช้เพื่อตรวจสอบในท้องที่เพื่อป้องกันควบคุมไม่ให้มีการใช้ยาปฏิชีวนะในอาหารสัตว์โดยการไม่สกัดตัวอย่างก็จะทำให้ง่ายต่อการปฏิบัติงาน อย่างไรก็ตามการสุ่มตรวจกับตัวอย่างจำนวนมากโดยเฉพาะอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับไก่ จะลดค่าใช้จ่ายการตรวจด้วยเครื่อง HPLC-UV ในตัวอย่างที่ไม่พบยาได้ แต่การใช้ตรวจกับผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น สารผสมล่วงหน้า ต้องระมัดระวังเพราะเนื่องจากมีส่วนประกอบของสารอาหารความเข้มข้นสูง สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อมาตรฐานได้ การตรวจวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะด้วยวิธีทางจุลชีววิทยามีข้อดีเนื่องจากเป็นวิธีการที่ง่ายและสามารถพัฒนาให้กลายเป็นวิธีทดสอบมาตรฐานได้ ซึ่ง International organization for standardization (ISO) กำลังร่างเป็นวิธีมาตรฐานในการทดสอบเบื้องต้นในเนื้อสัตว์เนื่องจากมีการศึกษากันมากและตัวอย่างเนื้อสัตว์ไม่มีสารรบกวนมาก (Chafer-Pericas C., *et. al.*, 2010) การศึกษาในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับไก่พบว่าสามารถตรวจกลุ่ม Tetracyclines Erythromycin และ Oxytetracycline ได้

ระดับต่ำสุด 0.97 mg/kg ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาในอาหารสัตว์ของ Siwczynska M. P., *et al.*, (2007) ที่มีค่าต่ำสุดที่ตรวจพบได้ที่ระดับ 1 mg/kg การใช้ยาปฏิชีวนะเป็นสาร feed additive เฉพาะบางชนิด แต่ห้ามใช้ในสัตว์ระยะสุดท้ายหรือระยะให้ไข่และนมและต้องมีระยะหยุดให้ยาก่อนส่งโรงฆ่าสัตว์ (Castanon J.I.R., 2007) ซึ่งตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2525 เดิมกำหนดให้ใช้ Monensin ไม่เกิน 120 mg/kg เพื่อป้องกันโรคบิด และการผสมเพื่อเป็นสารเร่งการเจริญเติบโต ในสัตว์ปีกอนุญาตให้ใช้ Chlortetracycline ไม่เกิน 50 mg/kg Oxytetracycline ไม่เกิน 55 mg/kg Tylosin ไม่เกิน 22 mg/kg Lincomycin ไม่เกิน 4 mg/kg Spiramycin ไม่เกิน 20 mg/kg Zinc-Bacitracin ไม่เกิน 50 mg/kg ยกเว้นห้ามใช้ผสมในสัตว์ปีกระยะสุดท้ายและระยะไข่ และได้มีประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์เมื่อวันที่ 4 มิถุนายน 2546 ยกเลิกการใช้ Oxytetracycline Chlortetracycline Lincomycin และ Spiramycin เป็นสารเร่งการเจริญโต ดังนั้นวิธีทดสอบนี้สามารถใช้ตรวจเฝ้าระวังยาปฏิชีวนะต้องห้ามใช้ในระดับสารเร่งการเจริญเติบโตได้ดี และเนื่องจากมีการห้ามใช้ยาปฏิชีวนะในสหภาพยุโรป และประเทศไทยการใช้ผสมในอาหารสัตว์ต้องมีใบสั่งยาจากสัตวแพทย์และให้ใช้เฉพาะในระดับการรักษาโรคในสัตว์เพื่อป้องกันโรคสัตว์สู่คน

จากผลการทดลองพบว่าชุดตรวจสอบแบบเพลททดสอบทางจุลชีววิทยาสามารถตรวจยาตกค้างได้โดยเชื้อ *B. subtilis* ATCC 6633 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ AM 5 ตรวจพบกลุ่มยา β-lactem Tetracyclines Aminoglycosides และ Macrolides เชื้อ *B. cereus* ATCC 11778 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ AM 8 กลุ่มยา Tetracyclines และ Aminoglycosides เชื้อ *M. luteus* ATCC 9341 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ AM 11 ตรวจพบกลุ่มยา β-lactem และ Macrolides เชื้อ *B. stearothermophilus* ATCC 7953 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ KD กลุ่มยา β-lactem Tetracyclines Aminoglycosides และ Macrolides สำหรับเชื้อ *S. aureus* ATCC 6538P ในอาหารเลี้ยงเชื้อ AM 11 กลุ่มยา β-lactem และ Macrolides เช่นเดียวกัน ซึ่งเชื้อนี้จะนำไปพัฒนาให้อยู่ในรูปชุดตรวจสอบชนิดหลอดทดสอบแบบของเหลวได้ดี จึงไม่ได้นำมาพัฒนาต่อในแบบวุ้นแข็ง จึงใช้พัฒนาชุดตรวจสอบเพียง 4 เชื้อในกรณีที่รู้ชนิดยาที่ใช้อยู่แล้วให้เลือกเพลททดสอบที่เหมาะสม ในกรณีทีไม่ทราบชนิดยาหรือประวัติการใช้ยาในตัวอย่างทดสอบให้ทดสอบทุกเพลททดสอบหากต้องการตรวจหายาในน้ำใช้หรือน้ำทิ้งบริเวณฟาร์มให้ใช้ชุดตรวจสอบแบบหลอดทดสอบหยดตัวอย่างน้ำดื่มและน้ำทิ้งในฟาร์มและใช้ทั้ง 4 เชื้อ เพื่อแปลผลชนิดกลุ่มยาควบคู่กันมากกว่า 1 เพลททดสอบ (ตารางที่ 6) และ *B. stearothermophilus* ATCC 7953 สามารถพัฒนาเป็นชุด

ตารางที่ 5 การศึกษาประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส กับอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับไก่ที่ผสมยามาตรฐาน ที่ระดับความเข้มข้น 0.97- 1000 mg/kg.

ชนิดยา	ความเข้มข้นยาต่ำสุดที่เกิด Inhibition zone ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ (mg/kg) / ขนาดโซน (mm)															
	B. subtilus ATCC 6633				*B. cereus* ATCC 11778				*M. luteus* ATCC 9341				*B. stearothermophilus* ATCC 7953			
	ระยะเวลาในการเก็บ (วัน)				ระยะเวลาในการเก็บ (วัน)				ระยะเวลาในการเก็บ (วัน)				ระยะเวลาในการเก็บ (วัน)			
	1	7	14	21	1	7	14	21	1	7	14	21	1	7	14	21
Tylosin	7.81/4	7.81/2	15.62/3	15.62/3	250/3	250/4	250/3	1000/3	1.95/3	3.90/3	7.81/3	15.62/3	1.95/3	1.95/3	7.81/3	15.62/3
Spiramycin	0	0	0	0	0	0	0	0	1.95/3	1.95/3	7.81/3	31.25/3	7.81/3	7.81/3	31.25/3	250/3
Zinc-Bacitracin	0	0	0	0	0	0	0	0	31.25/2	31.25/3	62.5/3	500/3	3.90/3	7.81/3	7.81/3	31.25/3
Erythromycin	0.97/3	1.95/3	3.90/3	7.81/3	15.62/3	62.5/3	62.5/3	250/3	0.97/4	0.97/3	7.81/3	7.81/3	7.81/3	15.62/3	15.62/3	31.25/3
Lincomycin	250/3	250/3	0	0	1000/3	1000/3	0	0	7.81/3	15.62/3	15.62/3	31.25/2	15.62/3	15.62/3	62.5/3	125/3
Chlortetracycline	62.5/4	62.5/4	62.5/3	62.5/3	15.62/3	15.62/3	31.25/3	31.25/3	125/3	125/3	125/3	500/3	0.97/2	3.90/3	7.81/3	7.81/2
Oxytetracycline	15.62/3	62.5/4	125/5	62.5/4	0.97/3	1.95/3	1.95/4	3.90/3	31.25/3	62.5/3	62.5/4	62.5/3	3.90/4	3.90/3	3.90/3	0
Tetracycline	0.97/3	1.95/3	3.9/3	3.90/2	0.97/3	0.97/2	1.95/3	3.90/3	31.25/3	62.5/4	62.5/4	62.5/3	0.97/3	0.97/3	3.90/3	3.90/3
Monensin	250/3	250/3	500/4	1000/4	15.62/3	15.62/3	62.5/3	62.5/3	0	0	0	0	7.81/3	7.81/3	15.62/3	250/3

ตรวจสอบเพื่อการค้าได้ดีเพราะเชื้อมีความไวกับยาหลายกลุ่ม และย่นเวลาบ่มให้อ่านผลได้ภายใน 4 ถึง 5 ชั่วโมง และสามารถเก็บรักษาชุดตรวจสอบไว้ที่อุณหภูมิห้องได้มีความไวกับยาหลายชนิดโดยเฉพาะสามารถตรวจหา Zinc-Bacitracin และ Moninsin ได้ สำหรับ *M. luteus* ATCC 9341 สามารถตรวจหายา Tylosin Spiramycin Erythromycin ได้ดี และ Lincomycin ที่ขณะนี้ยังไม่มีวิธีการอื่นตรวจได้พร้อมกัน แต่การวางอาหารสัตว์โดยตรงให้ความไวน้อยกว่าการเจาะหลุมและเชื้อที่ใช้อยู่ในรูปเซลมีชีวิตจึงต้องเตรียมใหม่ทุกสัปดาห์ ควรพัฒนาใช้เป็นชุดตรวจสอบคัดกรองได้ดีในห้องปฏิบัติการ แต่การตรวจเพื่อยืนยันการปลอดยาปฏิชีวนะในฟาร์มควรใช้ทั้ง 4 เชื้อ ซึ่งนับเป็นวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพ เพราะใช้แรงงาน อุปกรณ์น้อย และวิเคราะห์ได้จำนวนมาก และตรวจคัดกรองตัวอย่างที่มีสารต้านจุลชีพและยาปฏิชีวนะได้ในครั้งเดียวกันหลายชนิด เพื่อส่งตรวจยืนยันชนิดและปริมาณ นอกจากนี้ยังใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจหาสาเหตุของการตกค้างในกระบวนการผลิตและการปนเปื้อนข้ามในการผลิตอาหารสัตว์ และใช้เป็นเครื่องมือช่วยควบคุม กำกับดูแล การลักลอบใช้ยาโดยไม่มีใบสั่งจากสัตวแพทย์ได้ดีระดับหนึ่ง การตรวจสอบนี้สามารถพัฒนาเป็นการค้าและสามารถนำไปใช้ในท้องที่ได้อย่างทั่วถึง

สรุปผล

1. ชุดตรวจสอบแบบเพลททดสอบใช้เชื้อมาตรฐาน 5 ชนิด ที่เติมในระดับ $1x10^5$ cfu/ml มีความไวสามารถตรวจพบโซนใสกับ Chlortetracycline Tetracycline Oxytetracycline และ Erythromycin ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 0.97 mg/kg และมีความไวกับ Spiramycin และ Tylosin ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 1.95 mg/kg ในขณะที่ Zinc-Bacitracin Monensin และ Lincomycin มีความไวที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 3.90 7.81 และ 7.81 mg/kg ตามลำดับ

2. ชุดตรวจสอบแต่ละชนิดเชื้อจุลินทรีย์มีความไวต่อชนิดยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบ ดังนี้

2.1 *B. subtilis* ATCC 6633 มีความไวต่อ Erythromycin Tetracycline Oxytetracycline และ Chlortetracycline

2.2 *B. cereus* ATCC 11778 มีความไวต่อ Oxytetracycline Tetracycline Chlortetracycline และ Monensin

2.3 *B. stearothermophilus* ATCC 7953 มีความไวต่อ Chlortetracycline Tetracycline Tylosin Oxytetracycline Erythromycin Zinc- Bacitracin และ Monensin สามารถพัฒนาให้อ่านผลได้ภายใน 4 ถึง 5 ชั่วโมง เป็นชุดตรวจสอบแบบคัดกรองแบบรวดเร็ว

2.4 *M. luteus* ATCC 9341 มีความไวต่อ Erythromycin Tylosin Spiramycin Lincomycin และ Zinc- Bacitracin โดยตรวจคัดกรองเบื้องต้นยากลุ่มนี้ได้พร้อมกัน ควรพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบซึ่งยังไม่มีวิธีการอื่นทำได้พร้อมกันในขณะนี้

2.5 *S. aureus* ATCC 6538P มีความไวต่อยาปฏิชีวนะชนิด Chlortetracycline Tetracycline และ Oxytetracycline ไม่พัฒนาเป็นชุดตรวจสอบเพราะมีความไวกับยากลุ่มเดียวกัน

3. ผลการทดสอบในห้องปฏิบัติการกับตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปไก่จากฟาร์มที่ต้องการรับรองมาตรฐานฟาร์ม จำนวน 406 ตัวอย่าง เป็นผลบวกทั้งหมด 171 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 42.12 และตรวจพบ Chlotetracycline จำนวน 71 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 17.48 ด้วย วิธี HPLC-UV

4. การทดสอบชุดตรวจสอบในท้องที่โดยเก็บตัวอย่างอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปไก่จากฟาร์มทั้งหมด 57 แห่ง ไม่พบการเกิดโซนและการยับยั้งเชื้อทั้งหมด อาจใช้เป็นดัชนีบ่งบอกว่าเป็นฟาร์มเลี้ยงไก่แบบปลอดสารเคมีและสารปฏิชีวนะตกค้างได้ระดับหนึ่ง

5. ชุดตรวจสอบทางจุลชีววิทยาแบบเพลททดสอบใช้ได้ดีกับอาหารสัตว์ชนิดเม็ดและผงและแบบหลอดทดสอบใช้ได้ดีกับตัวอย่างที่เป็นน้ำหรือสารละลายที่สกัดจากตัวอย่าง และสามารถตรวจหาชนิดยาปฏิชีวนะได้หลากหลายชนิดในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปสำหรับไก่ในท้องที่ได้รวดเร็วใช้ง่าย ซึ่งปัจจุบันไม่มีวิธีการอื่นตรวจสอบได้และสามารถเก็บรักษาชุดตรวจสอบที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้นานถึง 21 วัน แต่มีความไวลดลงตามเวลาการเก็บรักษา

6. วิธีทดสอบทางจุลชีววิทยา สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาหาวิธีที่เหมาะสมในการตรวจหาสารและยาตกค้าง ที่ยังไม่มีวิธีตรวจสอบเบื้องต้นอย่างง่ายและได้หลายชนิดพร้อมกันต่อไป เป็นการช่วยคัดกรองตัวอย่าง ทำนายกลุ่มและชนิดยาเพื่อนำไปวิเคราะห์ยืนยันชนิดและปริมาณด้วยเครื่องมือชั้นสูงได้ถูกต้องซึ่งปัจจุบันใช้เป็นวิธีปฏิบัติงานการตรวจสอบหาสารต้านจุลชีพในตัวอย่างอาหารสัตว์และได้รับรอง ISO/IEC 17025:2005

ตารางที่ 6 แบบการเกิดโซนใส (Inhibition zone) ของสารละลายยาชนิดต่างๆ กับเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานที่ใช้ทดสอบ

ชนิดยาปฏิชีวนะ	สายพันธุ์เชื้อทดสอบ				
	B. subtilis ATCC 6633	***B. cereus*** ATCC 11778	***M. luteus*** ATCC 9341	***B. stearothermophilus*** ATCC 7953	***S. aureus*** ATCC 6538P
Tylosin	+++	++	++++	+++	+++
	-	-	+	+	-
Spiramycin	-	-	+++	++	++
	-	-	+	-	+
Zinc- Bacitracin	-	++	+++	++	++
	-	-	+	+	-
Erythromycin	+++	++	++++	+++	++
	+	-	++	_	_
Lincomycin	+++	+	++++	+++	++
	-	-	++	+	+
Chlortetracycline	++++	++++	++++	++++	++++
	+	++	-	++	+
Oxytetracycline	++++	++++	+++	++++	+++
	+	++	-	+	+
Tetracycline	+++	++++	+++	++++	+++
	+	+	+	++	+
Monensin	++	+++	-	+++	+
	-	+	-	+	-

หมายเหตุ *1+ หมายถึง ขนาดความกว้าง Inhibition zone 2-5 mm*
2++ หมายถึง ขนาดความกว้าง Inhibition zone 6-10 mm
3+++ หมายถึง ขนาดความกว้าง Inhibition zone 11-15 mm
4++++ หมายถึง ขนาดความกว้าง Inhibition zone 16 mm ขึ้นไป
- หมายถึง ไม่เกิด Inhibition zone
สามารถใช้เป็นแนวทางในระบุชนิดและกลุ่มสารปฏิชีวนะเพื่อส่งตรวจวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณได้

ข้อเสนอแนะ

1. การตรวจสอบทางจุลชีววิทยาสามารถใช้เป็นวิธีทดสอบใหม่ในการตรวจสอบการเลี้ยงสัตว์ในฟาร์มมาตรฐานเพื่อยืนยันว่าอาหารสัตว์ปราศจากยาตกค้าง ในกรณีที่มีข้อมูลการใช้ยาที่ต้องการเฝ้าระวังจะเลือกใช้ชนิดเพลทได้เหมาะสม

2. เกษตรกรสามารถใช้ตรวจสอบและเฝ้าระวังยาตกค้างหรือปนเปื้อนในอาหารสัตว์จากผู้จำหน่ายอาหารสัตว์และผู้จำหน่ายวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ได้ด้วยตนเองแต่ต้องมีตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิสูงที่ 62 องศาเซลเซียส สำหรับที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้บ่มวางทิ้งไว้โดยไม่ต้องใช้ตู้บ่ม และต้องระมัดระวังการเก็บรักษาชุดตรวจสอบไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. ใช้เป็นเทคนิคในการเฝ้าระวังการใช้ยาปฏิชีวนะในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ของเกษตรกร สำหรับพนักงานเจ้าหน้าที่ตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2525 เพื่อตรวจสอบอาหารสัตว์ที่ผสมยาในท้องที่ได้ทั่วถึง การใช้

ตารางที่ 7 การใช้ Antimicrobial Susceptibility test discs ในการควบคุมเป็น positive control สำหรับเพลททดสอบและขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของ Inhibition zone

Test Plate	Antimicrobial Susceptibility test discs	Target Zone Size	MaximumZone Size
Bacillus subtilis ATCC6633	Lincomycin 10 μg	20 mm.	28 mm.
	Nitrofuratoin 30 μg	22 mm.	30 mm.
	Erythromycin 10 μg	21 mm.	28 mm.
	Tetracycline 10 μg	20 mm.	28 mm.
Bacillus cereus ATCC11778	Nitrofuratoin 30 μg	21 mm.	29 mm.
	Erythromycin 10 μg	20 mm.	28 mm.
	Tetracycline 10 μg	20 mm.	28 mm.
	Monensin 10 μg	20 mm.	27 mm.
Micrococcus luteus ATCC9341	Lincomycin 10 μg	23 mm.	30 mm.
	Erythromycin 10 μg	20 mm.	27 mm.
	Tetracycline 10 μg	22 mm.	29 mm.
	Monensin 10 μg	21 mm.	30 mm.
	Zinc-Bacitracin 10 μg	21 mm.	28 mm.
Bacillus stearothermophilus ATCC7953	Lincomycin 10 μg	22 mm.	30 mm.
	Nitrofuratoin 30 μg	21 mm.	30 mm.
	Erythromycin 10 μg	21 mm.	28 mm.
	Tetracycine 10 μg	22 mm.	29 mm.
	Monensin 10 μg	20 mm.	30 mm.
	Zinc-Bacitracin 10 μg	22 mm.	30 mm.

งานต้องใช้ควบคู่กับใช้ Antimicrobial Susceptibility test discs ในการควบคุมเป็น positive control แสดงว่าชุดทดสอบยังมีความไว

4. สามารถใช้เป็นเทคนิคการตรวจสอบฟาร์มที่เลี้ยงไก่แบบฟาร์มเกษตรอินทรีย์ได้ระดับหนึ่ง เนื่องจากไม่มีวิธีการตรวจสอบยาปฏิชีวนะ เคมีภัณฑ์และยาห้ามใช้ในการเลี้ยงสัตว์ได้หลากหลายชนิดด้วยวิธีวิเคราะห์เดียวที่ใช้ต้นทุนน้อย

กิติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สภาวิจัยแห่งชาติที่ให้งบประมาณสนับสนุนการดำเนินงานครั้งนี้ และขอขอบคุณสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่สนับสนุนงบประมาณในการดำเนินงานในท้องที่ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ในท้องที่ทุกท่านที่ช่วยประสานงานการเก็บตัวอย่างและนำส่งให้ดำเนินการจนงานสำเร็จลุล่วงตามป้าหมาย

เอกสารอ้างอิง

ภิรมภรณ์ เถื่อนถ้ำแก้ว, วันทนา จันทรมงคล, วิทยา สังข์ทอง, สุทธิพร พิริยายน. การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกซีเททระไซคลิน คลอร์เททระไซคลิน และดอกซีไซคลิน ในอาหารไก่ด้วยวิธี HPLC-UV. วารสารอิเล็กทรอนิกส์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์. 2554;54(2)-0304-123 หน้า 1-18.

ธงชัย เฉลิมชัยกิจ, เกรียงศักดิ์ พูนสุข, เกรียงศักดิ์ แดงพรหม, มณฑล เลิศวรปรีชา, กิตติกร โชติสกุลรัตน์. ประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบยาต้านจุลชีพตกค้างในเนื้อสัตว์ "CM-Test". วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 2545; 33(6): 376-379.

Andrzej P, Kamila M., Zmudzki Jan and J. Niedzielska. Analytical procedure for the determination of chlortetracycline and 4-epichlortetracycline in pig kidneys. Journal of Chromatography A, Volume 1088, Issues 1-2, 2005 p.169-174.

AOAC Official method of Analysis 957. 23. Microbiology Method for Antibiotic. 2000; Chapter 5: p 37-40.

Barragy, T.B. Veterinary Drug Therapy. Lea and Febiger, A Waverly Company, SA., 1994; p. 220-293.

Breier, A.R., C.V. Garcia, T.P. Oppe, M. Steppe and E.E.S. Schapoval. Microbiological Assay for Azithromycin in Pharmaceutical formulations. J. Phar. And Biomed. 2002; 29: 957-61.

Castanon. J. I. R. History of the Use of Antibiotic as Growth Promoters In European Poultry Feeds. Poultry Science. 2007; 86: 2446-2471

Chafer-Pericas. C. Maquieira. A and Puchades. R. Fast screening method to detect antibiotic residues in food samples. Trends in Analyticsl Chemistry 2010 ; Vol. 29, No. 9: 2466-71

Chambers, H.F. and Sande M.A. The Pharmacolo Basis of Therapeutics, edited by Hardman JG. *et. al.,* 9th edition, the McGraw-Hill Companies, Inc. 1996; p. 1103-114.

Ergin Kaya S.and Filazi A. Determination of Antibiotic Residues in Milk Samples. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2010; 16: 31-35.

Gibertson, T. J., R.L. Mejeur, F.S. Yein and P.S. Jaglan. Modified Microbiological Method for Screening of Antibiotics in Milk. J. Dairy Sci. 1995; 78: 1032-130.

Guilfoile P.G. Antibiotic Resistant Bacteria 2007, Infobase Publishing 6 sp. NewYork USA.

Huber, W.G. Veterinary Phamachology and Therrapeutics, edited by N.H. Booth and L.E. Mcdonald, 6th editon, lowa state University Prees, Ames, USA. 1992;. p. 822-26.

Katz, E. S. and M. Siewierski. *Bacillus stearothermophilus* Disc Assay : A Review. Journal AOAC International. 1995; Vol. 78. No. 6. p. 1408-15.

Mendez, A.S.L., V. Weisheimer, T.P. Oppe, M. Steppe and E.E.E. Schapoval. Microbiological Assay for the Determination of Meropenem in Pharmaceutical dosage form. J. Phar. and Biomed. 2005; 37: 649-53.

Nouws, J., W. van Egmond, I. Smulders, G. Loeffen, J. Schouten and H. Stegeman. A Microbiological Assay System for Assessment of Raw Milk Exceeding EU MaximumResidue Levels. Int. Dairy J. 1999; 9: 85-90.

Official Journal of European Communities. Detction and Identification of antibiotic of the Tetracycline group. 1981.

Official Journal of European Communities. Determination of Monensin sodium by Diffusion in an Agar medium. 1981.

Official Journal of European Communities. Determination of Spiramycin by Diffusion in an Agar medium. 1981.

Prescott, J.F. and J.D. Baggot. Antimicrobial Therapy In : Veterinary Medicine, 2nd edition, lowa State University Prees, Ames, USA. 1993; p. 748-86.

Okman L, van-hoof J. and Debeuckelaere W. Evaluation of the European Four-Plate Test, a tool for screening antibiotic residues in meat samples from retail outlets. *J. of AOAC Internat.* 1998; 81: 51-6.

Reamer, H. R., Dey, P. B., Clarence, A. W., and R. P. Mageau. Comparison of Monolayer and Bilayer Plates Used in Antibiotic Assay. Journal of AOAC International. 1998; Vol. 81. No. 2. p. 398-402.

Riviere, J.E. and J.W. Spoo. Veterinary Phamacology and Therrapeutics, edited by HR. Adums, lowa State University Prees, Ames, USA. 1995; p. 748-86.

Siwczynska M.P. and K. Kwiatek. Evaluation of Multi-Plate Microbial assay for the Screening of Antibacterial Substance in Animal Feedingstuffs. Bull Vet Inst Pulawy. 2007 p.599-602.

Souza, M.J., R.R. Kulmann, L.M. Silva, D. R. Nogueira and E.S. Zimmermann. Development an In house validation of a Microbiological Assay for Determination of Cefepime in Injectable Preparations. J. AOAC Int. 2006; 89: 1367-71.

Vaucher, L.C., R. Breier and E.E.S. Schapoval. Microbiological Assay for the Determination of Telithromycin in Tablet. J. AOAC Int. 2006; 89: 1398-1402.

Webster, K. G., Luigs, S. E., Hearne, A. L., Pomeroy, M. and L. A. Panozzo. Investigation of Assay Interference with Microbiological Determinations of Chlortetracycline in Feed Grade and Premix Samples. Journal of AOAC International. 1997; Vol. 80. No. 2. p. 298-301.