การตรวจสารต้านจุลชีพในเนื้อสัตว์ โดยวิธีทริปเปิ้ลมีเดียมเทสต์ด้วยไตรเมทโทพริม

ศศิธร คณะรัตน์
พิมลศรี หาญพัฒนพานิชย์
แพรวผกา ทองระอา
ฝ่ายสัตวแพทย์สาธารณสุข กองควบคุมโรคระบาด กรมปศุสัตว์ กทม. 10400

Abstract **The Detection of Antimicrobial Substances in Meat by Using Triple Medium Test with Trimethoprim.**

Sasitorn Kanarat, Pimolsri Harnpattanapanich and Praewpaka Tongra-are
Veterinary Public Health Branch, Disease Control Division,
Department of Livestock Development, Bangkok 10400.

Triple Medium Test with Trimethoprim (TMT) is the screening test for antimicrobial substances. The test is convenient, time-saving and economic, hence, a lot of samples can be tested. However, it does not apply to quantification of substances nor their identification. 34,774, 2,197, 360, 144 and 4 samples of chicken meat, duck meat, pork, swine kidney and beef, respectively, were tested for antimicrobial substances. The results showed that 16, 2, 19, 52 and 0 samples were correspondingly positive and that the test was not sensitive to Chloramphenicol, Thiamphenicol, Nitrofurantoin and Nitrofurazone.

บทคัดย่อ Triple Medium Test with Trimethoprim (TMT) เป็นวิธีการทดสอบหาสารต้านจุลชีพที่อาจตกค้างในเนื้อสัตว์วิธีหนึ่ง ซึ่งสะดวกรวดเร็วและประหยัด ทำให้สามารถตรวจสอบตัวอย่างได้เป็นจำนวนมาก แต่วิธีนี้ไม่สามารถตรวจสอบถึงชนิดและปริมาณของสารต้านจุลชีพที่ตกค้างในเนื้อสัตว์ได้ จึงเหมาะสำหรับเป็นการตรวจสอบเบื้องต้น (Screening test) จากการวิเคราะห์หาสารต้านจุลชีพในตัวอย่างเนื้อไก่ เนื้อเป็ด เนื้อสุกร ไตสุกร และเนื้อโค จำนวน 34,774, 2,197, 360, 144 และ 4 ตัวอย่าง ตรวจพบสารต้านจุลชีพ 16, 2, 19, 52 และ 0 ตัวอย่างตามลำดับ และพบว่า TMT ไม่ไวต่อยาคลอแรมพีนิคอล ไทแอมพีนิคอล ไนโตรฟูแรนโตอิน และไนโตรฟูราโซน

คำนำ

สารต้านจุลชีพ (antimicrobial substances) มีหลายประเภท ได้แก่

1. True antibiotics
2. Semisynthetic antibiotics
3. Antibacterial substances

ที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ เพนนิซิลิน ออกซีเตตราไซคลิน สเตรปโตมัยซิน คลอแรมฟินิคอล และพวกซัลโฟนาไมด์ ฯลฯ ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์มีการใช้สารต้านจุลชีพ โดยเฉพาะยาปฏิชีวนะ (antibiotics) มาเป็นเวลานานกว่า 20 ปีแล้ว (McCracken et al., 1976 ; Smither, 1975) เพื่อป้องกันและควบคุมการติดเชื้อ และใช้เป็น feed additive เพื่อช่วยเร่งการเจริญเติบโต (สุหร่าย สายศร และคณะ, 2523 ; Linton, 1984 ; Smither, 1975) การใช้สารต้านจุลชีพอย่างไม่ระมัดระวังและไม่ถูกต้องเหมาะสมตามที่กำหนดไว้ ทำให้เกิดการตกค้างของสารดังกล่าวในเนื้อสัตว์ได้ (Brander, 1970 ; Engel, 1980) ซึ่งสารตกค้างนี้อาจก่อให้เกิดอันตราย คือ

1. ทำให้เกิดการแพ้ยาหรือเป็นพิษต่อผู้บริโภคโดยตรง เช่น การรับประทานเนื้อที่มียานีโอมัยซินตกค้างอยู่ จะเป็นพิษต่อไตหากผู้บริโภคเคยป่วยเป็นโรคไตมาก่อน

2. ทำให้เกิดการดื้อยาในแบคทีเรียโดยเฉพาะพวก Salmonellae ซึ่งสามารถทำให้เกิดโรคทั้งในคนและสัตว์ (Linton, 1984 ; O'Brien et al., 1981 ; Smither, 1975 ; Smith, 1974) Linton, 1984 กล่าวว่าในสัตว์การดื้อยาส่วนใหญ่จะเกิดกับแบคทีเรีย 2 กลุ่ม คือ **Staphylococcus aureus** และพวกแบคทีเรียรูปแท่งซึ่งไม่ติดสีแกรม โดยเฉพาะแบคทีเรีย Enteric group ซึ่งมักเป็นพวก Salmonella ด้วยเหตุนี้ในประเทศที่เจริญแล้วจึงได้มีมาตรการกำจัดปัญหาที่เกิดจากการใช้ยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงสัตว์ (Smither and Lott, 1980) เพื่อให้ได้เนื้อสัตว์ที่ปลอดภัยต่อการบริโภค การใช้ยาในสัตว์ต้องใช้ในขนาดที่เหมาะสม มีการหยุดการใช้ยาก่อนส่งสัตว์เข้าโรงฆ่า ตามที่ระบุไว้ในวิธีการใช้ยาแต่ละชนิดและมีการเลือกใช้อาหารสัตว์ที่เหมาะสมในระยะก่อนส่งสัตว์เข้าโรงฆ่า วิธีการควบคุมการใช้ยาในสัตว์ทางอ้อมคือ การเก็บตัวอย่างเนื้อสัตว์และไตมาทำการตรวจวิเคราะห์หายาตกค้างในห้องปฏิบัติการทางเคมีหรือทางจุลชีววิทยา การตรวจวิเคราะห์โดยวิธีทางเคมีสามารถตรวจพบยาได้ ถึงแม้จะมีปริมาณยาตกค้างในเนื้อสัตว์น้อยมาก ทั้งยังสามารถบอกถึงปริมาณและชนิดของยาอีกด้วย แต่เป็นวิธีที่ยุ่งยาก สิ้นเปลืองและใช้เวลานาน ไม่เหมาะสำหรับใช้กับตัวอย่างจำนวนมาก คณะผู้ทำการศึกษาจึงศึกษาวิธีการตรวจหายาตกค้างที่รวดเร็วและประหยัด เหมาะกับการวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมาก และพบว่าวิธี "ไมโคร เอสเส" (Microbiological Assay) ตามวิธีการของ Institute of Vet. Med., Germany ที่เรียกว่า Triple Medium Test with Trimethoprim (TMT) เป็นวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบเบื้องต้น (Screening test)

ก่อนที่จะทำการทดลองหายาตกค้างในเนื้อสัตว์ คณะผู้ทำการศึกษาได้ศึกษาถึงความไวของวิธี TMT ต่อยาชนิดต่างๆ ซึ่งนิยมใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ และพบว่ายาแต่ละตัวให้ความไวที่สุดเพียงที่ pH เดียวเท่านั้น ดังได้สรุปไว้ในตารางที่ 1

จุดประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้คือ รวบรวมข้อมูลขั้นพื้นฐานเกี่ยวกับการตรวจหาสารต้านจุลชีพที่ตกค้างในเนื้อสัตว์ชนิดต่างๆ และไตสุกร โดยวิธี TMT เพื่อใช้เป็นแนวทางในการศึกษาวิธีการตรวจหายาโดยวิธี Micro Assay ที่มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้นต่อไป

ตารางที่ 1 : ปริมาณยาที่ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจได้โดยการใช้ cylinder cups
(The Lowest detectable level of drugs by using cylinder cups)

pH 6.0		pH 7.2		pH 8.0	
ชื่อยา	ปริมาณยาน้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบ (Lowest Limit of detection-ug/ml)	ชื่อยา	ปริมาณยาน้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบ (Lowest Limit of detection-ug/ml	ชื่อยา	ปริมาณยาน้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบ (Lowest Limit of detection-ug/m
1. Chlortetracycline	0.02	1. Sulfadimethoxine	0.4	1. Erythromycin	0.05
2. Doxycycline	0.02	2. Sulfaquinoxaline	0.5	2. Tylosin	0.4
3. Penicillin G	0.025	3. Sulfadiazine	0.5	3. Neomycin	1.0
4. Oxytetracycline	0.16	4. Sulfamonomethoxine	0.5	4. Streptomycin	1.0
5. Tetracycline	0.3	5. Sulfamerazine	0.5		
6. Cloxacillin	0.5	6. Sulfamethazine	1.0		
7. Furazolidone	0.6	7. Sulfapyridine	1.0		
8. Oxolinic acid	1.0				
9. Chloramphenicol	5.0				
10. Nitrofurazon	10.0				
11. Thiamphenicol	>10.0				
12. Nitrofurantoin	20.0				

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. Culture medium pH 6, 7.2 และ 8 ซึ่งมีส่วนผสมดังนี้

Meat peptone	3.45	กรัม
Casein peptone	3.45	กรัม
KH_2PO_4	1.00	กรัม
NaCl	5.10	กรัม
Agar	13.00	กรัม

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มล.

นำส่วนผสมดังกล่าวไปต้มให้ละลายแล้ว แบ่งออกเป็น 3 ส่วน

ส่วนที่ 1 ปรับ pH 6.0

ส่วนที่ 2 ปรับ pH 7.2

ส่วนที่ 3 ปรับ pH 8.0

ทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121° เซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15-20 นาที

2. Trimethoprim solution

Stock solution

10 มก. Trimethoprim + 10 มล. Ethanol เขย่าให้ละลายที่อุณหภูมิ 50° ซ. เก็บในที่มืดและเย็น

Working solution

stock solution 0.1 มล. + น้ำกลั่น 1.9 มล. ทำให้ได้ความเข้มข้นของ Trimethoprim 50 ไมโครกรัม/มล. เก็บไว้ใช้ได้นาน 14 วัน

3. Penicillin G solution (1 หน่วยสากล/มล.)

4. Streptomycin solution (50 ไมโครกรัม/มล.)

5. Sulfamethazine solution (50 ไมโครกรัม/มล.)

6. Spore suspension ของ **Bacillus subtilis** BGA ความหนาแน่น 10^7 เซลล์/มล.

ตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจสอบ

ทำการเก็บตัวอย่างโดยวิธี Asepsis จากโรงฆ่าสัตว์ที่กรมปศุสัตว์ให้การรับรองเป็นระยะเวลานาน 1 ปี คือตั้งแต่วันที่ 1 พฤศจิกายน 2532 ถึงวันที่ 31 ตุลาคม 2533

สัตว์ปีก เก็บตัวอย่างทุกวันจากทุกฟาร์มที่ส่งสัตว์เข้าโรงฆ่า โดยเก็บกล้ามเนื้อบริเวณหน้าอก ฟาร์มละ 1 ตัวอย่าง รวมตัวอย่างเนื้อไก่ 34,774 ตัวอย่าง และตัวอย่างเนื้อเป็ด 2,197 ตัวอย่าง

สุกร เก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อบริเวณขาหน้าหรือสะโพกจากสุกรแต่ละตัว จำนวน 360 ตัวอย่าง และไต 144 ตัวอย่าง

โค เก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อบริเวณขาหน้าหรือสะโพกเช่นเดียวกับสุกร จำนวน 4 ตัวอย่าง

นำตัวอย่างไปแช่ไว้ที่อุณหภูมิ -40° ซ จนตัวอย่างแข็งแล้วจึงนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -18° ซ

วิธีการ

ทำการวิเคราะห์หาสารต้านจุลชีพโดยวิธี Triple Medium Test with Trimethoprim (Institute of Vet. Med.) โดยทุกขั้นตอนจะต้องทำแบบ aseptic technique

การเตรียม culture medium assay plate pH 6, 7.2, และ 8

ทำให้ culture medium pH 6, 7.2 และ 8 ที่หลอมแล้วมีอุณหภูมิประมาณ 45° ซ แล้วเติม spore suspension ของ B.subtilis 0.1 มล. ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มล. ทำให้ได้ความหนาแน่นของ spore เป็น 10^4/1 มล. ของอาหารเลี้ยงเชื้อ พร้อมทั้งเติม Trimethoprim working solution ปริมาณ 0.1 มล. ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มล. เฉพาะ culture medium pH 7.2 หลังจากนั้นเขย่าให้เข้ากัน เทใส่ plate ให้ได้ความหนาประมาณ 2 มม. เก็บ plate ไว้ที่อุณหภูมิ 4° ซ. และควรใช้ภายใน 3-4 วัน

การวิเคราะห์หาสารต้านจุลชีพ

ใช้ที่เจาะตัวอย่าง (cork borer) เจาะตัดชิ้นเนื้อให้ได้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มม. หนา 2 มม. อย่างน้อย 3 ชิ้น วางตัวอย่างลงบน culture medium plate pH 6, 7.2 และ 8 อย่างละ 1 ชิ้น พร้อมทั้งทำ control โดยการเติม 10 ไมโครลิตร ของ penicillin, sulfamethazine และ streptomycin solution ลงบน Test disc ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มม. ซึ่งวางไว้บน culture medium plate ที่ pH 6, 7.2 และ 8 อย่างละ 1 disc ตามลำดับ วาง plate ดังกล่าวไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1-2 ชม, แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 30° ซ. นาน 18-24 ชม.

การอ่านผล

ถ้ามีสารต้านจุลชีพอยู่ในชิ้นเนื้อ สารต้านจุลชีพจะระงับการเจริญเติบโตของเชื้อ B.subtilis BGA strain ทำให้เกิด clear zone รอบๆชิ้นเนื้อ

พบสารต้านจุลชีพ (+) ถ้า clear zone มีความกว้าง 2 มม. หรือมากกว่า

สงสัยว่ามีสารต้านจุลชีพ (s) ถ้า clear zone มีความกว้าง 1 มม. ขึ้นไป แต่น้อยกว่า 2 มม.

ไม่พบสารต้านจุลชีพ (–) ถ้า clear zone น้อยกว่า 1 มม. หรือไม่มีเลย

ผลการทดลอง

จากการทดลองกับตัวอย่างเนื้อไก่ เนื้อเป็ด เนื้อสุกร ไต และเนื้อโค จำนวน 34,774, 2,197, 360, 144 และ 4 ตัวอย่าง ปรากฏว่าตรวจพบสารต้านจุลชีพ 16, 2, 19, 52 และ 0 ตัวอย่าง และคิดเป็นร้อยละ 0.05, 0.09, 5.28, 36.11 และ 0 ตามลำดับ (ตารางที่ 2 และแผนภูมิที่ 1) และพบว่าตรวจพบสารต้านจุลชีพที่ pH 6 มากกว่า pH อื่น คือมากกว่าร้อยละ 90 ตรวจพบที่ pH 6 (ตารางที่ 3 และแผนภูมิที่ 2)

6. Spore suspension ของ **Bacillus subtilis** BGA ความหนาแน่น 10^7 เซลล์/มล.

ตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจสอบ

ทำการเก็บตัวอย่างโดยวิธี Asepsis จากโรงฆ่าสัตว์ที่กรมปศุสัตว์ให้การรับรองเป็นระยะเวลานาน 1 ปี คือตั้งแต่วันที่ 1 พฤศจิกายน 2532 ถึงวันที่ 31 ตุลาคม 2533

สัตว์ปีก เก็บตัวอย่างทุกวันจากทุกฟาร์มที่ส่งสัตว์เข้าโรงฆ่า โดยเก็บกล้ามเนื้อบริเวณหน้าอก ฟาร์มละ 1 ตัวอย่าง รวมตัวอย่างเนื้อไก่ 34,774 ตัวอย่าง และตัวอย่างเนื้อเป็ด 2,197 ตัวอย่าง

สุกร เก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อบริเวณขาหน้าหรือสะโพกจากสุกรแต่ละตัว จำนวน 360 ตัวอย่าง และไต 144 ตัวอย่าง

โค เก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อบริเวณขาหน้าหรือสะโพกเช่นเดียวกับสุกร จำนวน 4 ตัวอย่าง

นำตัวอย่างไปแช่ไว้ที่อุณหภูมิ -40° ซ จนตัวอย่างแข็งแล้วจึงนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -18° ซ

วิธีการ

ทำการวิเคราะห์หาสารต้านจุลชีพโดยวิธี Triple Medium Test with Trimethoprim (Institute of Vet. Med.) โดยทุกขั้นตอนจะต้องทำแบบ aseptic technique

การเตรียม culture medium assay plate pH 6, 7.2, และ 8

ทำให้ culture medium pH 6, 7.2 และ 8 ที่หลอมแล้วมีอุณหภูมิประมาณ 45° ซ แล้วเติม spore suspension ของ B.subtilis 0.1 มล. ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มล. ทำให้ได้ความหนาแน่นของ spore เป็น 10^4/1 มล. ของอาหารเลี้ยงเชื้อ พร้อมทั้งเติม Trimethoprim working solution ปริมาณ 0.1 มล. ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มล. เฉพาะ culture medium pH 7.2 หลังจากนั้นเขย่าให้เข้ากัน เทใส่ plate ให้ได้ความหนาประมาณ 2 มม. เก็บ plate ไว้ที่อุณหภูมิ 4° ซ. และควรใช้ภายใน 3-4 วัน

การวิเคราะห์หาสารต้านจุลชีพ

ใช้ที่เจาะตัวอย่าง (cork borer) เจาะตัดชิ้นเนื้อให้ได้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มม. หนา 2 มม. อย่างน้อย 3 ชิ้น วางตัวอย่างลงบน culture medium plate pH 6, 7.2 และ 8 อย่างละ 1 ชิ้น พร้อมทั้งทำ control โดยการเติม 10 ไมโครลิตร ของ penicillin, sulfamethazine และ streptomycin solution ลงบน Test disc ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มม. ซึ่งวางไว้บน culture medium plate ที่ pH 6, 7.2 และ 8 อย่างละ 1 disc ตามลำดับ วาง plate ดังกล่าวไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1-2 ชม, แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 30° ซ. นาน 18-24 ชม.

การอ่านผล

ถ้ามีสารต้านจุลชีพอยู่ในชิ้นเนื้อ สารต้านจุลชีพจะระงับการเจริญเติบโตของเชื้อ B.subtilis BGA strain ทำให้เกิด clear zone รอบๆชิ้นเนื้อ

พบสารต้านจุลชีพ (+) ถ้า clear zone มีความกว้าง 2 มม. หรือมากกว่า

สงสัยว่ามีสารต้านจุลชีพ (s) ถ้า clear zone มีความกว้าง 1 มม. ขึ้นไป แต่น้อยกว่า 2 มม.

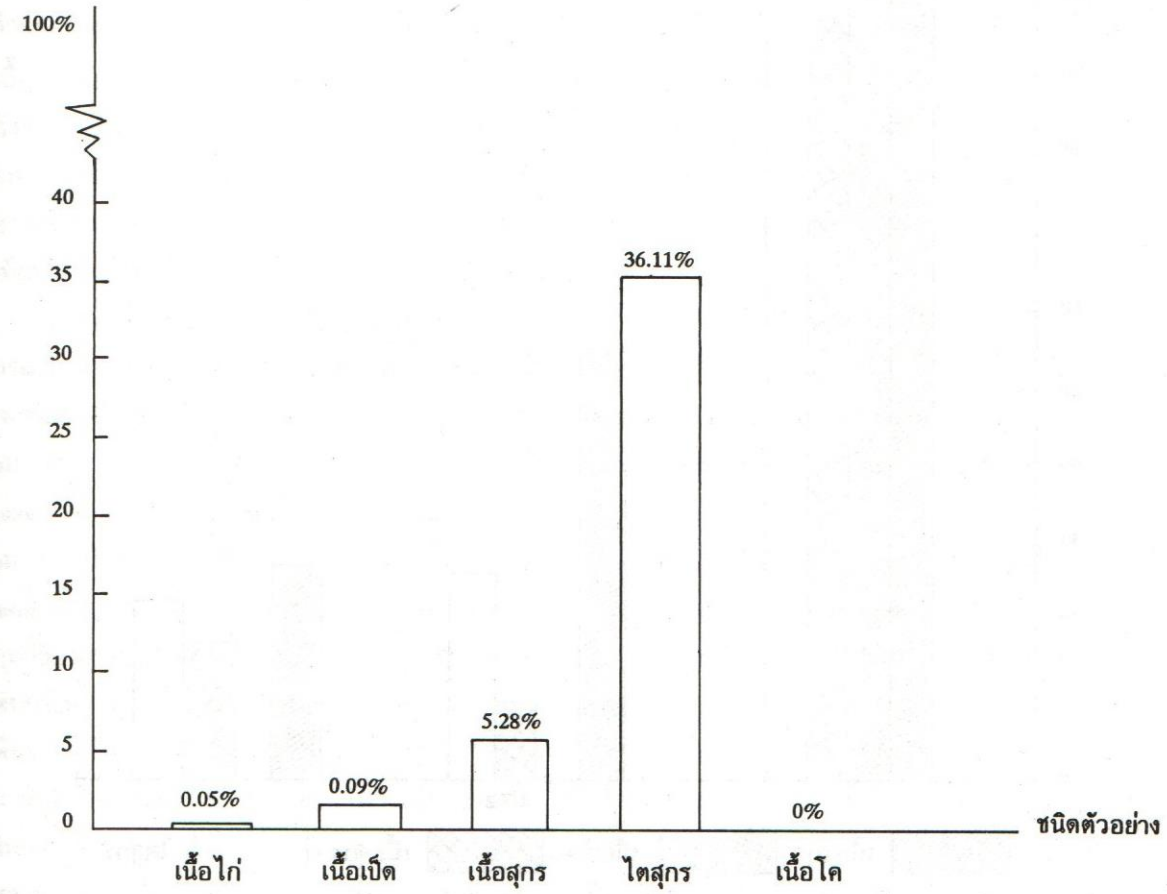
ไม่พบสารต้านจุลชีพ (–) ถ้า clear zone น้อยกว่า 1 มม. หรือไม่มีเลย

ผลการทดลอง

จากการทดลองกับตัวอย่างเนื้อไก่ เนื้อเป็ด เนื้อสุกร ไต และเนื้อโค จำนวน 34,774, 2,197, 360, 144 และ 4 ตัวอย่าง ปรากฏว่าตรวจพบสารต้านจุลชีพ 16, 2, 19, 52 และ 0 ตัวอย่าง และคิดเป็นร้อยละ 0.05, 0.09, 5.28, 36.11 และ 0 ตามลำดับ (ตารางที่ 2 และแผนภูมิที่ 1) และพบว่าตรวจพบสารต้านจุลชีพที่ pH 6 มากกว่า pH อื่น คือมากกว่าร้อยละ 90 ตรวจพบที่ pH 6 (ตารางที่ 3 และแผนภูมิที่ 2)

ตารางที่ 2 : ผลการวิเคราะห์สารต้านจุลชีพตกค้างในเนื้อสัตว์และไตสุกร (พ.ย. 32 - ต.ค. 33)

ชนิดตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนสงสัยมีสารต้านจุลชีพ	จำนวนพบสารต้านจุลชีพ
เนื้อไก่	34,774	38 (0.11%)	16 (0.05%)
เนื้อเป็ด	2,197	24 (1.10%)	2 (0.09%)
เนื้อสุกร	360	22 (6.11%)	19 (5.28%)
ไตสุกร	144	50 (34.72%)	52 (36.11%)
เนื้อโค	4	– (0)	– (0)

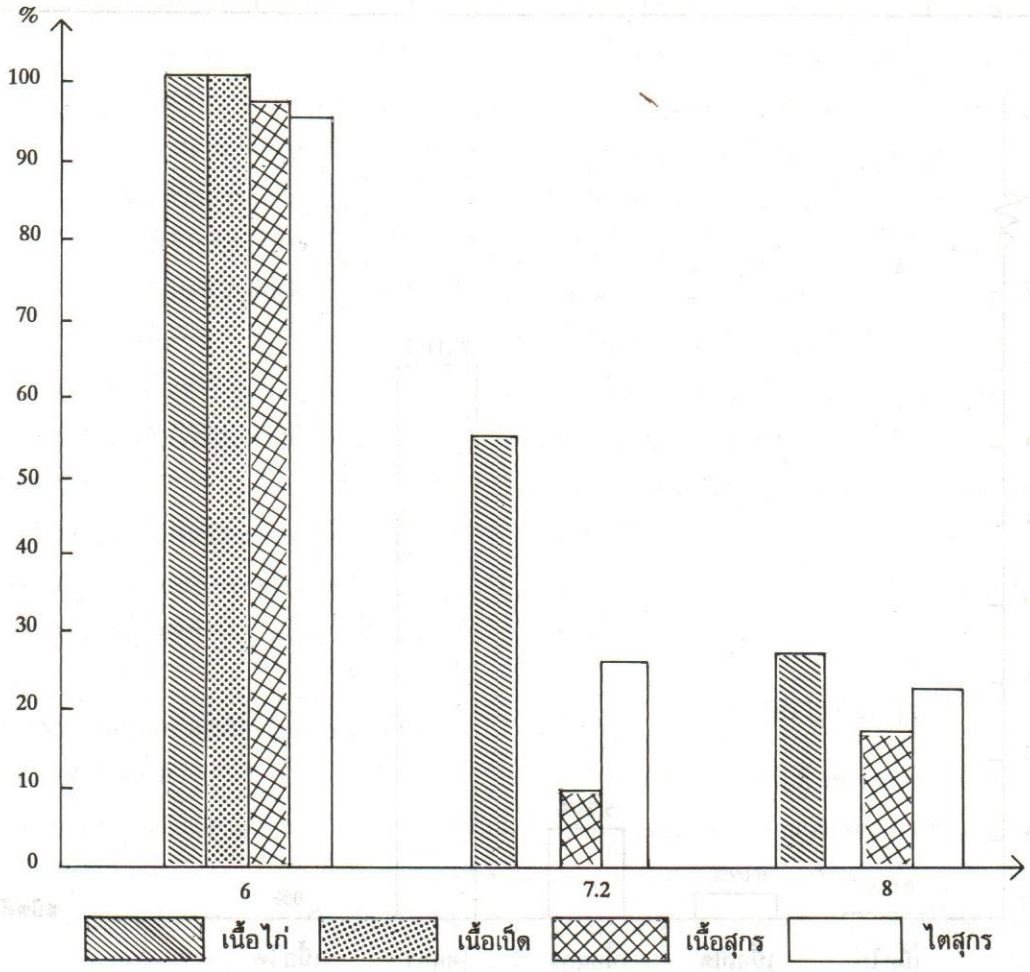


แผนภูมิที่ 1 แสดงจำนวนตัวอย่างชนิดต่างๆ ที่ตรวจพบสารต้านจุลชีพ

ตารางที่ 3 : ความไวของการตรวจหาสารต้านจุลชีพที่ pH 6, 7.2 และ 8

ชนิดตัวอย่าง	จำนวนพบสารต้านจุลชีพ	จำนวนครั้งที่พบสารต้านจุลชีพ		
		pH 6	pH 7.2	pH 8
เนื้อไก่	16	16 (100%)	9 (56.25%)	4 (25%)
เนื้อเป็ด	2	2 (100%)	-	-
เนื้อสุกร	19	18 (94.74%)	1 (5.26%)	2 (10.53%)
ไตสุกร	52	49 (94.23%)	12 (23.08%)	7 (13.46%)
เนื้อโค	0			

หมายเหตุ - = ไม่พบสารต้านจุลชีพ



แผนภูมิที่ 2 แสดงการตรวจพบสารต้านจุลชีพตกค้างในเนื้อสัตว์ชนิดต่างๆ และไตสุกร ที่ pH 6, 7.2 และ 8

วิจารณ์

TMT เป็นวิธีตรวจหาสารต้านจุลชีพที่ใช้ได้ผลดี แต่ความไว (sensitivity) ไม่สามารถครอบคลุมสารต้านจุลชีพได้ทุกตัว โดยเฉพาะ Nitrofurantoin, Thiamphenicol, Nitrofurazone และ Chloramphenicol (ตารางที่ 1) ดังนั้นตัวอย่างที่ตรวจไม่พบสารต้านจุลชีพโดยวิธี TMT มิได้หมายความว่าปลอดจากสารดังกล่าว แต่อาจมีสารต้านจุลชีพตกค้างอยู่ในระดับที่ต่ำกว่าที่สามารถตรวจพบได้โดยวิธีนี้ หรือมีสารต้านจุลชีพชนิดที่ไม่อาจตรวจพบด้วยวิธี TMT ตกค้างอยู่

จากการศึกษาครั้งนี้กล่าวได้ว่า เนื้อไก่มีสารต้านจุลชีพตกค้างน้อยที่สุดคือพบเพียงร้อยละ 0.05 ในเนื้อสุกรพบถึงร้อยละ 5.28 และพบมากที่สุดในไตสุกรถึงร้อยละ 36.11 เป็นที่น่าสังเกตว่าเนื้อโคทั้ง 4 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบว่ามีสารต้านจุลชีพตกค้างอยู่เลย อาจเนื่องจากจำนวนตัวอย่างเนื้อโคน้อยมากเมื่อเทียบกับตัวอย่างอื่นๆ

เหตุที่วิธี TMT ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นกรดและด่าง ต่างกันถึง 3 ระดับ คือ pH 6, 7.2 และ 8 เพราะสารต้านจุลชีพหรือยาแต่ละตัวจะออกฤทธิ์ได้ดีที่ pH ต่างกัน เช่นยาเพนนิซิลินออกฤทธิ์ได้ดีที่สุดที่ culture medium pH 6 ยาในกลุ่มซัลฟาออกฤทธิ์ดีที่ pH 7.2 เป็นต้น การเติม Trimethoprim ลงใน culture medium pH 7.2 นั้นเป็นเพราะ Trimethoprim จะเสริมฤทธิ์ของยาในกลุ่มซัลโฟนาไมด์ ทำให้มีโอกาสตรวจพบยาในกลุ่มนี้ได้สูงขึ้น (Smither and Lott, 1980) เมื่อพิจารณาถึงความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่างที่ตรวจพบยากับความเป็นกรดและด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการศึกษา (pH 6, 7.2 และ 8) พบว่าการตรวจพบสารต้านจุลชีพที่ culture medium pH 6 มากกว่า pH อื่นๆ สอดคล้องกับการศึกษาของ Smither and Lott, 1980 ซึ่งพบว่าตัวอย่างที่ให้ผลบวกส่วนใหญ่พบที่ pH 6 เพียงอย่างเดียว บางครั้งให้ผลบวกทั้งที่ pH 6 และ 7.2 และน้อยครั้งมากที่ให้ผลบวกทั้ง 3 pH (ตารางที่ 3) จากผลการศึกษาครั้งนี้ กล่าวได้ว่า pH 6 มีความไว (sensitive) ต่อการตรวจโดยวิธี TMT มากที่สุด

โดยหลักการแล้ว เมื่อตรวจพบหรือสงสัยว่ามีสารต้านจุลชีพตกค้างอยู่ในตัวอย่าง จะต้องตรวจสอบโดยวิธีทางเคมีเพื่อหาชนิดและปริมาณของสารที่พบ แต่คณะผู้ทำการศึกษาขาดความพร้อมจึงไม่สามารถตรวจสอบทางเคมี ทำให้ไม่ทราบว่าผลที่ได้นั้นมี false positive หรือไม่ จากการศึกษาของ Smither and Lott, 1980 ได้รวบรวมข้อมูลที่ก่อให้เกิด false positive ดังนี้

1. ชิ้นเนื้อที่ทำการทดลองมีสารซึ่งสามารถระงับการเจริญเติบโต (inhibitor) ต่อแบคทีเรีย (Bacillus subtilis) อยู่โดยธรรมชาติ สารนี้เกิดจากปฏิกิริยาของแบคทีเรียซึ่งปนเปื้อนอยู่ในชิ้นเนื้ออยู่ก่อน ซึ่งได้แก่ **Serratia liquefaciens, Pseudomonas putida, Candida lipolytica var. deformans** และ **Candida zeylanoides**

2. แบคทีเรียที่ปนเปื้อนอยู่ที่ชิ้นเนื้อเองสามารถระงับการเจริญของ **B.subtilis** ระหว่างการบ่มเชื้อ (incubation) ในขณะทำการทดลอง ได้แก่ **B.cereus, B.licheniformis, Staphylococcus aureus, Streptococcus fecalis** และ **Lactobacillus sp.**

คณะผู้ทำการศึกษาจึงพยายามหลีกเลี่ยงเหตุการณ์ที่จะก่อให้เกิด false positive โดย

1) การเก็บตัวอย่างพยายามไม่ให้เกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียไปยังตัวอย่าง แล้วนำตัวอย่างไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ - 40° ซ. เพื่อดึงอุณหภูมิของตัวอย่างให้ลดลงโดยเร็วแล้วจึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -18° ซ. เพื่อระงับการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ซึ่งอาจปนเปื้อนในขณะเก็บตัวอย่าง และทำการเจาะและตัดตัวอย่างในขณะที่ตัวอย่างยังแข็งอยู่

2) การอ่านผลหลังจากบ่ม plate ที่ทำการทดลอง หากมีแบคทีเรียซึ่งปนเปื้อนชิ้นรอบๆชิ้นเนื้อ

ถึงแม้จะเกิด clear zone ถึง 2 มม. หรือมากกว่า คณะผู้ทำการศึกษาจะอ่านผลว่า "สงสัยว่ามีสารต้านจุลชีพ" เท่านั้น

สรุป

การตรวจหาสารต้านจุลชีพตกค้างในเนื้อสัตว์โดยวิธี TMT ทำได้ง่าย รวดเร็ว และสิ้นเปลืองน้อย จึงเหมาะสำหรับใช้เป็น Screening Test เมื่อมีตัวอย่างจำนวนมาก แต่วิธีนี้ไม่สามารถบอกถึงปริมาณและชนิดของสารต้านจุลชีพได้ อีกทั้งไม่ละเอียดและแม่นยำดังเช่นวิธีการทางเคมี ซึ่งยุ่งยากและสิ้นเปลืองทั้งเวลา แรงงาน และค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์ อย่างไรก็ตามตัวอย่างที่ตรวจพบหรือสงสัยว่ามีสารต้านจุลชีพตกค้างโดยวิธี TMT ควรได้รับการตรวจซ้ำเพื่อหาชนิดและปริมาณของสารต้านจุลชีพ โดยวิธีทางเคมีต่อไป

คำขอบคุณ

คณะผู้ทำการศึกษาใคร่ขอขอบคุณ สัตวแพทย์หญิงสุจิตตรา พงศ์วิวัฒน์ และผู้ร่วมงานหน่วยวิเคราะห์ยาตกค้างและฮอร์โมน ฝ่ายสัตวแพทย์สาธารณสุข กองควบคุมโรคระบาด กรมปศุสัตว์ ที่กรุณาเตรียมสารละลายของยาชนิดต่างๆที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ และใคร่ขอขอบคุณสัตวแพทย์ประจำโรงงาน งานตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์ ฝ่ายสัตวแพทย์สาธารณสุข กองควบคุมโรคระบาด กรมปศุสัตว์ ที่กรุณาเก็บตัวอย่างเพื่อใช้ในการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

1. สุหร่าย สายศร, วินนา เหรียญสุวรรณ, ชัชวาลย์ ศรลัมภ์, วิไล ชื่นจิตรผอง, ปิยา บูรณศิริ, อารี สุขประเสริฐ, อุมา กิติยานี และ ดร.อมร กิ่งเกตุ 2523. การสำรวจหาซัลโฟนาไมด์ที่ตกค้างในไข่. ไทยเภสัชสาร 5 (2) : 83-96.
2. Brander, G.C. 1970. Possible hazards to man from the use of drugs in and on animals. Br. Med. Bull. 26 (3) : 217-221.
3. Engel, E.R. 1980. Current food safety and quality service residue control program. JAVMA 176 (10) : 1145-1147.
4. Institute of Vet. Med. (Robert Von Ostertag Institute), Federal Health Office, FAO/WHO Collaborating Center for Research and Training in Food Hygiene and Zoonoses.
5. Linton, A.H. 1984. Antibiotic-resistant bacteria in animal husbandry. Vet. Bulletin 40 (1) : 91-95.
6. McCracken, A. ; O' Brien, J.J. and Campbell, N. 1976. Antibiotic residues and their recovery from animal tissues. J. Appl. Bact. 41 : 120-135.
7. O' Brien, J.J. ; Campbell, N. and Conaghan, T. 1981. Effect of cooking and cold storage on biologically active antibiotic residues in meat. J. Hyg. Camb. 87 : 511-523.
8. Saitanu, K. and Fusao, K. 1990. Antibiotic residues in pig tissues. Proc. 7th FAVA Congress, Pattaya. : 433-438.
9. Smith, H.W. 1974. Clinical problems of preventive medicine. Br. Vet. J. 130 : 110-119.
10. Smither, R. 1975. Evaluation of two simple assay methods for detecting antibiotic residues in chicken and pig muscle. J. Appl. Bact. 38 : 235-243.
11. Smither, R. and Lott, A.F. 1980. Antibiotic residues in meat in the United Kingdom ; assessment of specific tests to detect and identify antibiotic J. Hyg. Camb. 85 : 359-369.