



การพัฒนาเพื่อลดต้นทุนการผลิตชุดทดสอบการตกค้างยาปฏิชีวนะในนํ้านมดิบ

สุภาดา คณานับ¹ สุขสันต์ จำสิงห์¹ กมลรัตน์ สอนทอง¹ สาหร่าย พูลเพิ่ม² นงเยาว์ ดอนสมไพร²
 อาสุตร สงวนเกียรติ¹ ปรานี จันทรงาม³ เอกชัย สร้อยน้ำ³ และอนวัช แสงมาลี^{4, #}

¹ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุขศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน; ²หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน; ³โรงพยาบาลสัตว์หนองโพ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; ⁴ภาควิชาเวชศาสตร์คลินิกสัตว์ใหญ่และสัตว์ป่า คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน

บทคัดย่อ: จุดประสงค์ของการศึกษาเพื่อพัฒนาชุดทดสอบการตกค้างของยาปฏิชีวนะในนํ้านมดิบ โดยใช้หลักการผลิตโยเกิร์ต กระบวนการศึกษาเริ่มต้นด้วยการเก็บตัวอย่างนํ้าจากนํ้าพุร้อน 3 พื้นที่ ในเขตจังหวัดราชบุรี และกาญจนบุรี เชื้อทั้ง 3 แหล่ง ถูกนำมาตรวจหาสายพันธุ์ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) และความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะด้วยการหา Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) เพื่อการคัดเลือกสายพันธุ์ที่จะเป็นตัวแทนในการใช้พัฒนาชุดทดสอบต่อไป ผลการทดสอบ พบว่าเชื้อมีความสอดคล้องกับ *Geobacillus stearothermophilus* ถึง 97% การบ่มเชื้อ *G. stearothermophilus* กับนํ้านมที่ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 64°C เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง สามารถให้ปริมาณสปอร์สูงสุดได้ที่ 10^7 CFU/mL และต่ำสุดที่ 10^5 CFU/mL และชุดทดสอบที่มีปริมาณสปอร์ 10^6 CFU/mL ปรับ pH 9.5 จะให้ผลการทดสอบชัดเจน ณ ชั่วโมงที่ 5 เมื่อบ่มที่ 64°C เมื่อทำการทดสอบกับนํ้านมที่มีการผสมยาปฏิชีวนะทั้ง 5 ชนิด เพื่อหาค่า detection limits พบว่า Amoxycillin, Penicillin, Ampicillin, Ceftiofur และ Oxytetracycline ถูกตรวจพบได้ปริมาณต่ำสุดที่ 4, 8, 8, 100 และ 200 µg/L ซึ่งใกล้เคียงกับมาตรฐานการตกค้างของยาปฏิชีวนะในนํ้านมดิบที่กำหนดโดย Codex Alimentarius International Food Standards และ Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority

คำสำคัญ: โยเกิร์ต การตกค้างของยาปฏิชีวนะ นํ้านมโค

#ผู้รับผิดชอบบทความ

สัตวแพทยมหาวิทยาลัย. 2564. 16(2): 199-209.

E-mail address: fvetaws@ku.ac.th

Development for Reducing the Cost of Antibiotic Residue Test Kit

Suppada Kananub¹, Suksan Chamsing¹, Kamonrat Sonthong¹, Sarai Poolperm²,
Nongyao Donsomphai², Arsooth Sanguankiat¹, Pranee Janngam³, Aggachai Sroynum³, and
Anawat Sangmalee^{4,#}

¹Department of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University; ²Kamphaengsaen Veterinary Diagnostic Center, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University; ³Nong Pho Veterinary Hospital, Kasetsart University; ⁴Department of Large Animal and Wildlife Clinical science, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University

Abstract: This study was to develop the test kit for detecting antibiotic residuals in raw milk, using the principle of yogurt producing. Water samples were collected from three hot springs located in Ratchaburi and Kanchanaburi province. After purification, species of microbes were identified by Polymerase Chain Reaction (PCR). DNA sequencing presented about 97% similarity of all samples to *Geobacillus stearothermophilus*. Three isolates were conducted Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) that the data from MIC and MBC used to support the selection for further steps. The conditions of stock preparation were 64°C of incubation for 18-20 hours produced the maximum spore of 10⁷ CFU/mL and the minimum spore of 10⁵ CFU/mL. The test kit consisted of 10⁶ CFU/mL of *G. stearothermophilus* spore adjusted pH 9.5 and used bromocresol purple as a pH indicator could detect antibiotic residual at 5 hours of 64°C of incubation. Detection limits of Amoxicillin, Penicillin, Ampicillin, Ceftiofur, and Oxytetracycline were 4, 8, 8, 100, and 200 µg/l, respectively. The detection limits from the developed test were close to the standard of Codex Alimentarius International Food Standards and Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority.

Keywords: Yogurt, Antibiotic residual, Cow milk

#Corresponding author

J. Mahanakorn Vet. Med. 2021 16(2): 199-209.

E-mail address: fvetaws@ku.ac.th

บทนำ

การปนเปื้อนของยาปฏิชีวนะในน้ำนมดิบเกิดขึ้นได้ เนื่องจากการเลี้ยงโคนมในประเทศไทยยังมีการใช้ยาปฏิชีวนะโดยไม่ได้อยู่ภายใต้การควบคุมดูแลจากสัตวแพทย์ (Suriyasathaporn et al., 2012) ยา

ปฏิชีวนะที่ปนเปื้อนนี้จะส่งผลเสียต่อผู้บริโภคได้หลายรูปแบบ เช่น เพิ่มโอกาสการดื้อยา หรือผลจากความเป็นพิษของยาที่ปนเปื้อนมาในน้ำนม เช่น เพิ่มโอกาสการเป็นมะเร็ง ความเป็นพิษต่อไต หรือก่อการแพ้ (Jayalakshmi et al., 2017; Priyanka et al., 2017) โดยเฉพาะปัญหา

เชื้อดื้อยาซึ่งจากข้อมูล พบว่า ประเทศไทยมีการพบเชื้อแบคทีเรียเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งเป็นผลจากการที่อุตสาหกรรม การเลี้ยงสัตว์เติบโตขึ้นอย่างรวดเร็ว มีการใช้ยาปฏิชีวนะในฟาร์มสัตว์เลี้ยงอย่างแพร่หลาย (Sumpradit et al., 2015)

การตรวจสอบยาปฏิชีวนะตกค้างในนํ้ามนั้น เป็นกระบวนการหนึ่งที่กำหนดให้มีการปฏิบัติ โดยไม่ได้ระบุอย่างชัดเจนว่ายาปฏิชีวนะชนิดใดบ้างที่ต้องมีการทดสอบ (NBACFS, 2017) แต่อ้างอิงตามมาตรฐานวิธีการตรวจคุณภาพนํ้านมดิบ (DLD, 2010) มีข้อมูลการตรวจการตกค้างของยาปฏิชีวนะกลุ่ม Beta lactam, Streptomycin และ Chlortetracycline ผลการตรวจการตกค้างของยาปฏิชีวนะในถังนมรวมของสมาชิกต้องให้ผลลบด้วย Delvotest[®], ประเทศเนเธอร์แลนด์ หรือการทดสอบอื่นที่มีประสิทธิภาพเทียบเท่า หากแต่ปัญหา คือ ชุดทดสอบที่ได้กล่าวมามีราคาสูง ทำให้ต้นทุนการแปรรูปนํ้านมสูงขึ้นมาก

จากปัญหาดังกล่าว ทำให้มีการพัฒนาชุดทดสอบอื่น เพื่อให้การตรวจการปนเปื้อนยาปฏิชีวนะในนํ้านมดิบมีประสิทธิภาพตามมาตรฐาน แต่มีราคาที่ถูกลง (Chinpan, 2003; Tangmunkhong et al., 2007) อย่างไรก็ตาม ชุดทดสอบที่มีการพัฒนาอยู่นั้น ประสบปัญหาในการผลิตเชิงพาณิชย์ เนื่องจากขั้นตอนซับซ้อน ต้องใช้แรงงานฝีมือจำนวนมากในการผลิต รวมถึงอุปกรณ์ที่ต้องใช้ในการผลิตมีต้นทุนที่สูง ทำให้ราคาไม่สามารถแข่งขันกับชุดทดสอบเชิงพาณิชย์ได้ เช่น ชุดทดสอบ KU2000 จากการพัฒนาของคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ซึ่งนอกจากปัญหาดังที่กล่าวมาแล้วนั้น เชื้อมาตรฐานอ้างอิงจากการศึกษาของ Tangmunkhong et al (2007) ไม่สามารถเจริญได้กับวิธีที่ทำการพัฒนาขึ้นมาด้วย

วิธีการทดสอบแบบโยเกิร์ตเป็นวิธีหนึ่งที่มีการพัฒนาเพื่อนำมาใช้ในการทดสอบการตกค้างของยาปฏิชีวนะในนํ้านม เนื่องจากความสะดวกในการเตรียม

อาหารเลี้ยงเชื้อ และความซับซ้อนในการผลิตน้อยกว่าสามารถลดต้นทุนของชุดทดสอบได้ เชื้อที่มีรายงานการใช้กับวิธีการทดสอบแบบโยเกิร์ต คือ *Streptococcus thermophiles* และ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Yamani et al., 1998) ส่วนเชื้อที่ใช้ในการทดสอบการตกค้างของยาปฏิชีวนะในนํ้านมในปัจจุบันที่ได้รับการยอมรับ คือ *Geobacillus stearothermophilus* เช่น Delvotest[®] (Hennart and Faragher, 2012) ซึ่งอาศัยคุณลักษณะการทนความร้อนของสปอร์ และสปอร์จะถูกกระตุ้นให้เปลี่ยนเป็นเซลล์ปกติ เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม เชื้อนี้เจริญได้ที่อุณหภูมิ 40-75 °C การพัฒนาชุดทดสอบแบบโยเกิร์ต จะเป็นการส่งเสริมให้กระบวนการผลิตและแปรรูปนํ้านมดิบยังคงคุณภาพ การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อพัฒนาชุดทดสอบการตกค้างของยาปฏิชีวนะในนํ้านมดิบด้วยวิธีการทำโยเกิร์ต จากเชื้อ *G. stearothermophilus* ซึ่งถึงแม้จะเป็นเชื้อคนละชนิดกับการผลิตโยเกิร์ตตามปกติ แต่อ้างอิงจากวิธี และลักษณะของสารเมื่อเตรียมเสร็จแล้ว มีลักษณะเป็นครีมข้นเหมือนโยเกิร์ตเพื่อให้ได้ชุดทดสอบที่มีประสิทธิภาพ และลดต้นทุนการผลิตจากกระบวนการผลิตชุดทดสอบแบบเดิม

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่างและการตรวจวิเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อตัวอย่าง

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างนํ้าพวร้อนด้วยวิธี convenient sampling ในพื้นที่จังหวัดราชบุรี และกาญจนบุรี ซึ่งเป็นเขตในบริเวณสถานที่ทำการวิจัย คัดเลือกจากนํ้าพวร้อน 3 แหล่ง ได้แก่ บ่อนํ้าร้อนบ่อคลิ้ง อำเภอสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี บ่อนํ้าร้อนวังกระแจะ อ.วังกระแจะ จังหวัดกาญจนบุรี และบ่อนํ้าร้อนล้นทิน อำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี ซึ่งมีอุณหภูมิอยู่ระหว่าง 40-75 °C ทำการเก็บตัวอย่างนํ้าจากบริเวณต้นนํ้าปริมาณ 50 mL ตัวอย่างนํ้าถูกเก็บใส่ภาชนะบรรจุซึ่ง

ปราศจากเชื้อ และขนส่งด้วยอุณหภูมิ 4°C สู่ห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา โรงพยาบาลสัตว์หนองโพมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เพื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อและวิเคราะห์ต่อไป

Table 1 Reaction mixture for bacterial 16S rRNA

Reagent	Volume (μl)
nuclease free water	67
10X PCR buffer	10
MgSO ₄ ^a	8
dNTPs ^b	2
primers Eub-B	1
primers Eub-A	1
Taq DNA polymerase	1

^aMagnesium sulfate

^bDeoxynucleotide triphosphates

ตัวอย่างน้ำทั้ง 3 ตัวอย่าง ถูกนำมาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar (TSA) และบ่มที่อุณหภูมิ 64°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อการคัดแยกโคโลนีเดี่ยว ซึ่งจะถูกนำไปย้อมสีแกรม และทดสอบทางชีวเคมี ด้วยวิธี motility test, citrate utilization test, urease test, starch hydrolysis, citrate utilization test และ nitrate reduction test นอกจากนั้น เชื้อจากทั้ง 3 แหล่งจะถูกยืนยันสายพันธุ์ ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ universal bacterial primers Eub-A เป็นรีเวิร์สไพรเมอร์ ซึ่งมีลำดับเบส คือ AAGGAGGTGATCCANCCRCA และ Eub-B เป็นฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ ซึ่งมีลำดับเบส คือ AGAGTTTGATCMTGGCTCAG (Kirchman et al., 2003) ลำดับนิวคลีโอไทด์เป้าหมายเท่ากับ 1,551 bp ขั้นตอนการเตรียมองค์ประกอบและสถานะในการทำ PCR แสดงใน Table 1 และ 2

ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาโพลีเมอเรสจะถูกนำมาตรวจหาแถบ DNA ด้วยวิธี electrophoresis ผ่าน 1.5% agarose gel และ DNA product ถูกส่งตรวจหาลำดับสารพันธุกรรมโดย Axil Scientific Pte Ltd. ประเทศสิงคโปร์ ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ นำมาทำการเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลชีวภาพของเชื้ออ้างอิง (GenBank)

Table 2 PCR Reaction Conditions

Step	Temp (°C)	Time (min)	Cycle
Pre-denature	94	3	1
Denaturation	95	0.5	30
Annealing	55	0.5	30
Extension	72	1	30
Final extension	72	5	1

MIC และ MBC testing

ในการพิจารณาคัดเลือกเชื้อ 1 สายพันธุ์จากทั้งหมด 3 ตัวอย่าง เพื่อใช้ในขั้นตอนการพัฒนาชุดทดสอบต่อไป จะทำการพิจารณาจากระดับความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ ด้วยวิธีการหาความเข้มข้นต่ำที่สุดของยาปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) กับยา 5 ชนิด คือ Ampicillin, Penicillin, Amoxycillin, Ceftiofur และ Oxytetracycline การทดสอบทำทั้งหมด 20 ความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะ เริ่มต้นที่ 512 μg/mL และทำ two-fold dilution ด้วย Mueller-Hinton broth จนถึงความเข้มข้นสุดท้ายที่ 0.0009 μg/mL แต่ละความเข้มข้นทำ 3 ซ้ำ และมีตัวควบคุมเป็นยาปฏิชีวนะ และอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ที่ปราศจากเชื้อ ทำการบ่มที่ 64°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การอ่านผลให้อ่านความเข้มข้นสุดท้ายก่อนมีการตกตะกอนเป็นเม็ดกระจุก

ผลการทดสอบจากวิธี MIC จะถูกนำมาหาความเข้มข้นต่ำที่สุดของยาปฏิชีวนะในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration; MBC) โดยนำความเข้มข้นแรกที่มีการตกตะกอน ± 3 ความเข้มข้น มาเพาะลงบน TSA เพื่อดูผลความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่พบการเจริญของเชื้อ ผลการทดสอบที่ได้จาก MIC และ MBC นั้น นำมาใช้พิจารณาคัดเลือกเชื้อที่จะนำไปพัฒนาชุดทดสอบในขั้นตอนต่อไป

กระบวนการการพัฒนาชุดทดสอบ

การพัฒนามีจุดประสงค์เพื่อลดความยุ่งยากในขั้นตอนการเตรียมชุดทดสอบจากวิธีทดสอบแบบเดิม โดยเปลี่ยนเป็นใช้หลักการของการทำโยเกิร์ต คือ ใช้นํ้านมที่ปราศจากเชื้อเป็นอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ ทดสอบสภาวะที่แตกต่าง 4 แบบ คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด (นํ้านมปราศจากเชื้อปริมาตร 100 mL และนํ้านมปราศจากเชื้อ 100 mL ซึ่งมี 1% $C_6H_{14}O_7$, 0.5% $MnCl_2$ และ 0.5% $CaCl_2$) และบ่มใน 2 สภาวะที่แตกต่างกัน คือ บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 64°C และบ่มที่อุณหภูมิ 60°C ในเครื่องเขยที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง หลังจากครบเวลาบ่มเชื้อ จะทำการนับปริมาณเชื้อ ด้วยวิธี spread plate บน Tryptic soy agar (TSA) ที่อุณหภูมิ 64 °C นาน 20-24 ชั่วโมง ที่ระดับเจือจางที่ 10^{-3} - 10^{-5}

โยเกิร์ตที่ได้จะถูกนำมาใช้เพื่อเตรียมชุดทดสอบในขั้นตอนต่อไป โดยการเปรียบเทียบประสิทธิภาพชุดทดสอบ 3 ปัจจัย คือ ปริมาณเชื้อตั้งต้นในชุดทดสอบ (เตรียมชุดทดสอบที่ความเข้มข้นเชื้อ 10^6 , 10^7 และ 10^8 CFU/mL), ส่วนประกอบของชุดทดสอบ (แบบที่ 1 ประกอบด้วยเชื้อผสมกับนํ้ากลั่นปราศจากเชื้อและ 1.2% $Cl_3FeH_{12}O_6$ และแบบที่ 2 ประกอบด้วย เชื้อผสมกับนํ้ากลั่นปราศจากเชื้อ และ 3% $C_6H_{14}O_7$, 1% $MnCl_2$, 1% $CaCl_2$, 1.2% $Cl_3FeH_{12}O_6$) และ pH ของชุดทดสอบ (ทดสอบที่ pH 7.5, 9.5 และ 10) ตัวอย่างของชุดทดสอบจะถูกนำมาทดสอบกับนํ้านมซึ่งผสมด้วยยาปฏิชีวนะ 5 ชนิด โดย

คัดเลือกจากยาปฏิชีวนะที่มีการใช้อย่างแพร่หลายในการเลี้ยงโคนม คือ Ampicillin, Penicillin, Amoxycillin, Ceftiofur, และ Oxytetracycline ประสิทธิภาพของชุดทดสอบถูกประเมินโดยดูจากความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของยาปฏิชีวนะซึ่งชุดทดสอบสามารถตรวจพบการตกค้างได้ (Limit of detection: LOD) ผลการทดสอบทั้งหมดจะถูกนำเสนอด้วยสถิติเชิงพรรณนา

ผลการทดลอง

จากผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำซึ่งได้นํ้าพุร้อน 3 แหล่ง บน TSA พบลักษณะ โคโลนีกลม สีเหลืองอ่อน ขุ่น ผิวมัน ขอบเรียบ บางโคโลนีพบเป็นลอนคลื่น เมื่อนํ้ามาทดสอบทางชีวเคมี ผลพบว่า เชื้อจากทั้ง 3 แหล่งให้ผลเหมือนกัน คือ ให้ผลบวกต่อ motility test, starch hydrolysis, gelatin liquefaction test และ nitrate reduction test และให้ผลลบต่อ citrate utilization test และ urease test รวมถึงการเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 64°C ซึ่งบ่งชี้ว่าเป็นเชื้อ *G. stearothermophilus* (ชื่อเดิม *Bacillus stearothermophilus*)

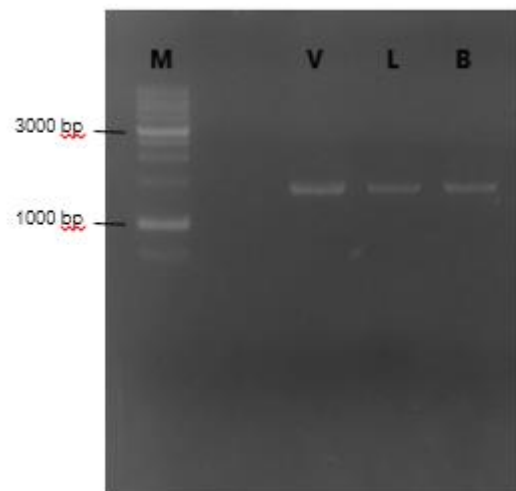


Figure 1 PCR analyses of *Geobacillus* spp. from three locations in Ratchaburi and Kanchanaburi province

เพื่อยืนยันสายพันธุ์ของเชื้อตัวอย่างทั้ง 3 ด้วยวิธีพีซีอาร์ ผลจาก Gel electrophoresis ดังแสดงใน Figure 1 ซึ่งแสดงแถบของสารพันธุกรรมขนาด 1,551 bp ผลการเปรียบเทียบรหัสพันธุกรรมกับข้อมูลอ้างอิงพบว่า เชื้อตัวอย่างจากทั้ง 3 แหล่งมีความสอดคล้องถึง 97% กับ *G. stearothermophilus* strain NASA267 16S ribosomal RNA gene เมื่อทราบสายพันธุ์ของตัวอย่างน้ำพุที่เก็บมาจากทั้ง 3 แหล่งแล้วนั้น ลำดับถัดไป คือ การทดสอบเชื้อจากทั้ง 3 แหล่ง ดูประสิทธิภาพการยับยั้ง และ ทำลายเชื้อ (Minimum Inhibitory Concentration; MIC และ Minimum Bactericidal Concentration; MBC) ผลการทดสอบที่ได้จะใช้เป็นเกณฑ์ในการตัดสินใจคัดเลือก 1 สายพันธุ์ จากทั้งหมด 3 สายพันธุ์ เพื่อใช้ในขั้นตอนการพัฒนาชุดทดสอบการตกค้างยาปฏิชีวนะในลำดับถัดไป ผลการทดสอบ MIC และ MBC แสดงใน Table 3 แสดงความเข้มข้นยาต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี MIC และ MBC พบว่า เชื้อจากน้ำพุร้อนวังกระแจะ จังหวัดกาญจนบุรี มีการรอดชีวิตจากยาปฏิชีวนะทั้ง 5 ชนิด ที่ความเข้มข้นต่ำที่สุด แสดงให้เห็นว่าหากเปรียบเทียบเชื้อ

จากทั้ง 3 แหล่งแล้วนั้น เชื้อจากน้ำพุร้อนวังกระแจะจะมีประสิทธิภาพในการแสดงผลการตกค้างของยาปฏิชีวนะได้ดีที่สุด

จากผลการทดสอบด้วยวิธี MIC และ MBC พบว่า เชื้อ *G. stearothermophilus* ซึ่งได้จากน้ำพุร้อนวังกระแจะ จ.กาญจนบุรี ถูกกำจัดได้ด้วยยาปฏิชีวนะทั้ง 5 ชนิดที่ความเข้มข้นต่ำที่สุด ดังนั้นจึงถูกคัดเลือกสำหรับการพัฒนาชุดทดสอบขั้นต่อไป ขั้นตอนการพัฒนาซึ่งทำการทดสอบประสิทธิภาพของชุดทดสอบจาก 3 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของเชื้อในชุดทดสอบ, ส่วนผสมของชุดทดสอบ และระดับความเป็นกรด-ด่างของชุดทดสอบ พบว่า การบ่มเชื้อ *G. stearothermophilus* กับน้ำนมที่ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 64°C เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง สามารถให้ปริมาณสปอร์สูงสุดได้ที่ 107 CFU/mL และต่ำสุดที่ 105 CFU/mL และชุดทดสอบให้ประสิทธิภาพดีที่สุดในการตรวจการตกค้างของยาปฏิชีวนะ เมื่อเตรียมชุดทดสอบให้มีสปอร์ 106 CFU/mL ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และ 1.2% CL3FeH12O6 ที่ pH 9.5 โดยใช้ bromocresol purple เป็น pH indicator

Table 3 Minimum concentration of antibiotics preventing visible bacterial growth (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) and minimum concentration of antibiotics causing bacteria death (Minimum Bactericidal Concentration; MBC)

Antibiotic	MIC (µg/mL)			MBC (µg/mL)		
	BK ¹	VK ²	LT ³	BK	VK	LT
Ampicillin	0.008	0.004	0.008	0.002	0.002	0.004
Penicillin	0.062	0.062	0.062	0.062	0.062	0.032
Amoxycillin	0.016	0.008	0.016	0.004	0.004	0.008
Ceftiofur	2.000	1.000	2.000	8.000	4.000	8.000
Oxytetracycline	0.500	0.250	0.500	0.250	0.250	0.250

¹BK: Bore Klueng Hot Spring

²VK: Wang Kra Chae Hot Spring

³LT: Lin Thin Hot Spring

Table 4 Antibiotic levels detected by the developed test kit and Maximum Residue Limits (MRL) of contamination in milk

Antibiotic	Antibiotic levels (µg/l)			MRL (µg/l)
	-	±	+	
Amoxycillin	1	2	4	4 ¹
Penicillin	<8	-	8	4 ¹
Ampicillin	<8	-	8	10 ²
Ceftiofur	<50	50	100	100 ¹
Oxytetracycline	<50	50-100	200	100 ¹

¹MRL indicated by CIAFS, (2018)²MRL indicated by APVMA, (2017)

ผลจากชุดทดสอบที่มีสภาวะดังกล่าวเพื่อตรวจหาการตกค้างของยาปฏิชีวนะทั้ง 5 ชนิด สามารถให้ผลได้ที่ชั่วโมงที่ 5 เมื่อทำการบ่มที่ 64°C ผลการทดสอบแสดงด้วยค่า detection limits (ppb) แสดงอยู่ใน 3 กลุ่ม คือ ผลบวก (+) หมายถึง สีเปลี่ยนชัดเจน ผลลัพท์ไม่มียาปฏิชีวนะ, ผลลบ (-) หมายถึง สีไม่เปลี่ยน ผลลัพท์มีการตกค้างของยาปฏิชีวนะ และผลกำกวม (±) หมายถึง สีเปลี่ยนไม่ชัดเจน (Table 4) เทียบกับค่ามาตรฐานที่กำหนดให้พบได้ในนํ้านมดิบ ซึ่งกำหนดโดย Codex Alimentarius International Food Standards (CIAFS) (2018) และ Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority (APVMA) (2017) พบว่าประสิทธิภาพของชุดทดสอบทำให้การพัฒนาให้ผลการทดสอบที่ใกล้เคียงกับมาตรฐานที่กำหนดไว้

วิจารณ์ผลการทดลอง

Geobacillus sterothrmophilus เป็นเชื้อที่พบได้ตามธรรมชาติ เช่น นํ้าพุร้อน, ดิน, หรือรวมไปถึงในอุตสาหกรรมการผลิต เช่น โรงงานผลิตนํ้านม (Burgess et al., 2017) ถูกนำมาใช้ในกระบวนการทดสอบประสิทธิภาพเครื่องมือทำปราชจากเชื้อทาง

ห้องปฏิบัติการ รวมถึงหาการตกค้างของยาปฏิชีวนะในนํ้านมดิบ และอาหาร (Tangmunkhong et al., 2007; Gondová et al., 2014; Gaudin, 2017) จากคุณสมบัติทนความร้อนของสปอร์ เมื่อสปอร์อยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม จะถูกกระตุ้นให้พัฒนาไปเป็นเซลล์ปกติได้ ช่วงอุณหภูมิที่ *G. sterothrmophilus* สามารถเจริญได้ คือ 40-75°C (Kotzekidou, 2014; Novik et al., 2018, Coorevits et al., 2012)

หลักการทำชุดทดสอบการตกค้างของยาปฏิชีวนะในนํ้านมดิบโดยทั่วไป คือ การใช้สปอร์ของ *G. sterothrmophilus* ที่ปริมาณหนึ่งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม นำมาใช้ทดสอบกับนํ้านมดิบ เมื่อผ่านระยะเวลาหนึ่งของการบ่มนํ้านมดิบรวมกับเชื้อ จะดูการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น ซึ่งสัมพันธ์กับการตกค้างของยาปฏิชีวนะ เช่น MaxSignal®, ประเทศสหรัฐอเมริกา และ Delvotest®, ประเทศเนเธอร์แลนด์ อย่างไรก็ตาม หลักการทำโยเกิร์ต คือ การใช้นมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเชื้อ *Geobacillus* spp. สามารถแบ่งได้ 2 สายพันธุ์หลักๆ คือ dairy และ non-dairy ซึ่ง non-dairy มีคุณสมบัติในการใช้แลคโตส ในนํ้านมได้ (Burgess et al., 2017)

แร่ธาตุในน้ำนม เช่น แคลเซียม และ แมกนีเซียม เป็นตัวส่งเสริม *G. stearothermophilus* ในการสร้างสปอร์ (Burgess, 2016) *G. stearothermophilus* นั้น เจริญได้ดีที่ 60°C และเจริญน้อยสุดที่อุณหภูมิ 45°C เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง จะมีการสร้างสปอร์ได้อยู่ที่ 10^5 – 10^7 spores/mL (Kotzekidou, 2014; Coorevits et al., 2012) ซึ่งจะพบว่า การสร้างสปอร์ของเชื้อ จะมีความผันแปรได้มาก ซึ่งเป็นปัญหาหนึ่งในการควบคุมคุณภาพของชุดทดสอบที่ทำให้ไม่สามารถทำซ้ำความเข้มข้นของเชื้อได้ถึง 10^8 CFU/mL ในทุกครั้งของการทดสอบ

ปัจจัยที่สนับสนุนการทำงานของเชื้อในชุดทดสอบ นอกจากสายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้แล้ว ยังรวมถึงองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณเชื้อตั้งต้นที่ใช้ และความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Tangmunkhong et al., 2007; Gondová et al., 2014; Burgess, 2016) โดยความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่จะมีเปอร์เซ็นต์สปอร์ของ *G. stearothermophilus* สูงที่สุด (ที่ 10^7 CFU/mL) คือ pH ระหว่าง 7.7-8.7 ที่เวลาบ่มประมาณ 16 ชั่วโมง (Yazdany and Lashkari, 1975) ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมจากการทดลองนี้ พบว่า ที่ pH 9.5 ชุดทดสอบจะให้ความแตกต่างของสีที่จุดเริ่มต้น และจุดที่มีการเปลี่ยนสีเนื่องจากการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าที่ระดับ pH อื่นๆ

ปัจจัยที่รบกวนการเปลี่ยนสีของชุดทดสอบ เกิดได้จาก การหลงเหลือของ lactoferrin หรือ lysozyme จากกระบวนการให้ความร้อนที่ไม่เพียงพอก่อนการทดสอบ รวมถึงองค์ประกอบที่แตกต่างกันในน้ำนม เช่น ไขมัน โปรตีน เซลล์ไขมันติด นอกจากนั้นการตกค้างของยาอื่นๆ นอกเหนือจากยาปฏิชีวนะ ซึ่งทำให้เชื้อมีปริมาณลดลง แต่ไม่ได้กำจัดทั้งหมด รวมถึงการตกค้างของยาปฏิชีวนะที่ระดับความเข้มข้นน้อยกว่า detection limits (Gondová et al., 2014; Rueda, 2015)

สอดคล้องกับผลการทดลองนี้ เนื่องจากเมื่อทำการทดสอบชุดทดสอบด้วยน้ำนมดิบ จะให้การเปลี่ยนแปลงของสีไม่ชัดเจนหากเปรียบเทียบกับชุดทดสอบที่ใช้ น้ำนม UHT

การนำเชื้อในสิ่งแวดล้อมมาพัฒนาชุดทดสอบ การตกค้างของยาปฏิชีวนะในอาหาร มีรายงานในการศึกษาของ Phiriyayon et al. (2016) ซึ่งใช้เชื้อที่ปนเปื้อนในอาหารสัตว์ คือ *Bacillus smithii* นำมาพัฒนาการตรวจการตกค้างยาปฏิชีวนะในกระบวนการผลิตอาหารสัตว์ ด้วยวิธีการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งในจานทดลอง (agar well diffusion method) ผลการทดสอบพบว่า เชื้อให้ประสิทธิภาพเทียบเท่ากับเชื้อมาตรฐาน เช่น *G. stearothermophilus* ATCC 7953 ซึ่งเป็นเชื้อมาตรฐาน อย่างไรก็ตาม การเลือกใช้เชื้อที่เป็นมาตรฐาน เช่น ATCC จะเป็นผลดี เนื่องจากสามารถควบคุมคุณภาพของตัววัดทางชีวภาพนั้นๆ ได้ดีกว่า (Guizelini et al., 2012)

สรุป

จากผลการทดลองนี้พบว่าเชื้อจากน้ำพूरอนที่ถูกคัดเลือกในการศึกษานั้นมีประสิทธิภาพในการให้ผลการทดสอบการตกค้างของยาปฏิชีวนะได้ใกล้เคียงกับระดับที่กำหนดไว้ของ CIAFS และ APVMA เมื่อชุดทดสอบมีปริมาณสปอร์ที่ 10^6 CFU/mL ที่ pH 9.5 ระยะเวลาการอ่านผลที่ 5 ชั่วโมง อีกทั้งหากพิจารณาถึงต้นทุนการผลิตของวิธีนี้แล้ว สามารถลดค่าใช้จ่ายในการตรวจการตกค้างของยาปฏิชีวนะในน้ำนมให้อยู่ที่ตัวอย่างละไม่เกิน 3 บาท อย่างไรก็ตาม การศึกษาพบปัญหา คือ ปริมาณสปอร์ที่ได้จากขั้นตอนการบ่มมีปริมาณไม่คงที่เป็นผลทำให้ชุดทดสอบที่ได้มีความคลาดเคลื่อนในการตรวจ ดังนั้น จำเป็นต้องทำการพัฒนากระบวนการบ่มโยเกิร์ต เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่จะทำให้ได้จำนวนสปอร์ในปริมาณที่คงที่

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนเงินทุนจาก บริษัท ฮูเวฟาร์มา (ประเทศไทย) จำกัด รหัสโครงการ สฟ.62/HUVE03 ขอขอบคุณหน่วยงานชั้นสูตรโรคสัตว์ กำแพงแสนสำหรับการสนับสนุนอุปกรณ์ในการทำการศึกษา

Conflict of interest

บทความนี้ไม่มีการขัดผลประโยชน์ (conflict of interest) ทั้งในส่วนของผู้ร่วมประพันธ์และในด้านอื่นๆ

เอกสารอ้างอิง

Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority (APVMA). 2017. Agricultural and Veterinary Chemicals Code Instrument No. 4 (MRL Standard) 2012: 283 pages.

Guizelini, B.P., L.P.S. Vandenberghe, S.R.B.R. Sella, C.R. Soccol. 2012. Study of the influence of sporulation conditions on heat resistance of *Geobacillus stearothermophilus* used in the development of biological indicators for steam sterilization. Arch Microbiol. DOI 10.1007/s00203-012-0832-z.

Burgess, S. 2016. Characterisation of dairy strains of *Geobacillus stearothermophilus* and a genomics insight into its growth and survival during dairy manufacture. PhD thesis. Massey University. New Zealand. 248 pages.

Burgess, S.A., S.H. Flint, D. Lindsay, M.P. Cox, and P.J. Biggs. 2017. Insights into the *Geobacillus stearothermophilus* species

based on phylogenomic principles. BMC Microbiology. 17(140): 1-12.

Chinpan, K. 2003. Development of microbiological test kit for detection of antibiotic residues in milk. MS Thesis. Chulalongkorn University, Bangkok. (in Thai)

Codex Alimentarius International Food Standards (CIAFS). 2018. Maximum residue limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods CX/MRL 2-2018: 46 pages.

Coorevits, A., A.E. Dinsdale, G. Halket, L. Lebbe, P.D. Vos, A.V. Landschoot, and N.A. Logan. 2012. Taxonomic revision of the genus *Geobacillus*: emendation of *Geobacillus*, *G. stearothermophilus*, *G. jurassicus*, *G. toebii*, *G. thermodenitrificans* and *G. thermoglucosidans* (nom. corrig, formerly 'thermoglucosidasius'); transfer of *Bacillus thermantarcticus* to the genus as *G. thermantarcticus* comb. nov.; proposal of *Caldibacillus debilis* gen. nov., comb. nov.; transfer of *G. tepidamans* to *Anoxybacillus* as *A. tepidamans* comb. nov.; and proposal of *Anoxybacillus caldiproteolyticus* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 62: 1470–1485.

Department of Livestock Development (DLD). 2010. Standard methods for the

- examination of dairy products. Bangkok. Thailand. (in Thai)
- Gaudin, V. 2017. State of the art in the validation of screening methods for the control of antibiotic residues: is there a need for further development?. Food Addit Contam Part A 34(9): 1528–1552.
- Gondová, Z., I. Kožárová, Z. Poláková, and M. Mad'arová. 2014. Comparison of four microbiological inhibition tests for the screening of antimicrobial residues in the tissues of food-producing animals. Ital J Anim Sci 13(3521): 728-734.
- Stephen L.A.H. and J. Faragher. 2012. Validation of the Delvotest SP NT DA Performance Tested MethodSM 011101. Journal of AOAC International. 95(1): 252-259.
- Jayalakshmi, K., M. Paramasivam, M. Sasikala, and A. Sumithra. 2017. Review on antibiotic residues in animal products and its impact on environments and human health. J Entomol Zool Stud 5(3): 1446-1451.
- Kirchman, D.L., L. Yu, and M.T. Cottrell. 2003. Diversity and abundance of uncultured cytophaga-like bacteria in the Delaware Estuary. Appl Environ Microbiol 69(11): 6587–6596.
- Kotzekidou, P. 2014. *Geobacillus stearothermophilus* (Formerly *Bacillus stearothermophilus*). Encyclopedia of Food Microbiology 1: 129-134.
- National Bureau of Agricultural Commodity and Food Standards (NBACFS). 2017. Guidance in the application of Thai agricultural standard: good manufacturing practices for milk collection center. Ministry of Agriculture and Cooperatives. (in Thai)
- Novik G., V. Savich, and O. Meerovskaya. 2018. *Geobacillus* bacteria: potential commercial applications in industry, bioremediation, and bioenergy production. In: Growing and handling of bacterial cultures. 36 pages.
- Phiriyayon. S., W. Jantaramongkon, and S. Aimhun. 2016. Development of test kit for antibiotic determination in animal feed production by microbiological assay. BQCLP E-JOURNAL. 8(1): 266-296. (in Thai)
- Priyanka, S. Panigrahi, M. Sheoran, and S. Ganguly. 2017. Antibiotic residues in milk- a serious public health hazard. J Environ Life Sci 2(4): 99-102.
- Rueda, T.R. 2015. Evaluation of false positive results in microbial inhibitor tests for screening antibiotics in goat milk. Ph.D. Thesis. Universitat Politècnica de València. Spain. 196 pages.
- Sumpradit, N., S. Suttajit, S. Poonpolsub, R. Chuanchuen, and P. Prakongsai. 2015. Landscape of antimicrobial resistance situation and action in Thailand. 1st ed. Bangkok: Aksorn Grphic and Design Publishing Limited Partnership. 143 pages. (in Thai)

- Suriyasathaporn W., V. Chupia, T. Sing-Lah, K. Wongsawan, R. Mektrirat, and W. Chaisri. 2012. Increases of antibiotic resistance in excessive use of antibiotics in smallholder dairy farms in northern Thailand. *Asian-Australasian J Anim Sci* 25(9): 1322-1328.
- Tangmunkhong, P., S. Viriyarampa, S. Cumsing, and P. Jala. 2007. New test kit for detection antibiotic residue in milk. Proceedings of the 45th Kasetsart University Annual Conference: Animals and Veterinary Medicine, Bangkok, Thailand. 30 Jan - 2 Feb 2007: 458-463. (in Thai)
- Yamani, M.I., L.M.A. Al-Kurd, M.S.Y. Haddadi, and R.K. Robinson. 1999. A simple test for the detection of antibiotics and other chemical residues in ex-farm milk. *Food Control* 10: 35-39.
- Yazdany, S. and K.B. Lashkari. 1975. Effect of pH on sporulation of *Bacillus stearothermophilus*. *Appl Microbiol* 30(1): 1-3.

