

การพัฒนาชุดตรวจสอบยาปฏิชีวนะตกค้างในนํ้านมโดยวิธีทางจุลชีววิทยา



นางสาวกฤติกา ชินพันธ์

สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2540

ISBN 974-637-554-7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

10 เม.ย. 2546

118746632

**DEVELOPMENT OF MICROBIOLOGICAL TEST KIT
FOR DETECTION OF ANTIBIOTIC RESIDUES IN MILK**



Miss Krittika Chinpan

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medical Microbiology**

Inter-Department of Medical Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 1997

ISBN 974-637-554-7

กฤติกา ชินพันธ์ : การพัฒนาชุดตรวจสอบยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมโดยวิธีทางจุลชีววิทยา
(Development of Microbiological test Kit for Detection of Antibiotic residues in Milk)
อ. ที่ปรึกษา : อ. นายสัตวแพทย์ดร. เกรียงศักดิ์ สายธนู : 147 หน้า. ISBN 974-637-554-7

ทดสอบหาขนาดจุลชีพ 12 ชนิดซึ่งเตรียมจากการผสมยาความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในนมผงละลายน้ำ ด้วยชุดตรวจหาขนาดจุลชีพตกค้างในน้ำนมที่เตรียมขึ้นตามวิธี Tube diffusion โดยใช้ *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* NIZO เป็นเชื้อทดสอบ เปรียบเทียบความเข้มข้นต่ำสุดของยาแต่ละชนิดที่ตรวจพบ 100% โดยชุดตรวจที่เตรียมขึ้นกับค่า Maximum residue limit (MRL) ของยานิตินั้น และกับความเข้มข้นต่ำสุดของยาแต่ละชนิดที่ตรวจพบ 100% โดยชุดตรวจ Delvotest-P® และ ADM®

เตรียมชุดตรวจสอบขนาดจุลชีพตกค้างในน้ำนม (K2) โดยผสมเชื้อ *B. stearothermophilus* ที่ได้จากการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ 65° ซ. เป็นเวลา 18-20 ชม. ลงใน complex media ให้มีปริมาณเชื้อในชุดตรวจเท่ากับ 10⁸ CFU/ml ทดสอบความสามารถของชุดตรวจในการตรวจหาขนาดจุลชีพตกค้างในน้ำนม โดยทดสอบกับนมผงละลายน้ำซึ่งผสมขนาดจุลชีพความเข้มข้นต่าง ๆ (spiked milk) จากการทดลองชุดตรวจ K2 ใช้ตรวจหายากลุ่ม β-lactams ได้ดีกว่าการตรวจหาขนาดจุลชีพกลุ่มอื่น ๆ ความเข้มข้นต่ำสุดของ Ampicillin, Cloxacillin, Penicillin G และ Cephapirin ที่ตรวจพบ 100% เท่ากับ 40, 20, 5 และ 40 ppb ตามลำดับ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ใกล้เคียงกับค่า MRL ของยาแต่ละชนิดนั้น ชุดตรวจ K2 ไม่สามารถตรวจหา Chloramphenicol เข้มข้น 625-40,000 ppb ได้ ความเข้มข้นต่ำสุดของ Streptomycin, Gentamicin, Kanamycin, Erythromycin และ Oxytetracycline ที่ตรวจพบ 100% เท่ากับ 1,500, 480, 7,500, 400 และ 120 ppb ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์การตรวจพบ Sulfamethazine และ Sulfathiazole เข้มข้น 400,000 ppb เท่ากับ 50 และ 33% ความเข้มข้นที่ตรวจพบ 100% ของขนาดจุลชีพเหล่านี้ใกล้เคียงกับความเข้มข้นของยาดังกล่าวที่ตรวจพบ 100% โดยชุดตรวจ Delvotest-P® และ ADM® ซึ่งเตรียมจากหลักการเดียวกัน

ความเข้มข้นต่ำสุดของ Sulfamethazine และ Sulfathiazole ที่ตรวจพบ 100 % โดยชุดตรวจ K2 ซึ่งเติม Trimethoprim 0.05 µg/ml เท่ากับ 500 และ 250 ppb ตามลำดับ ความเข้มข้นต่ำสุดของ Sulfamethazine และ Sulfathiazole ที่ตรวจพบ 100% โดยชุดตรวจ K2 ซึ่งเติม Trimethoprim 0.1 µg/ml เท่ากับ 250 ppb

ความเข้มข้นของขนาดจุลชีพชนิดต่าง ๆ ที่ถูกตรวจพบโดยชุดตรวจ K2 ซึ่งเก็บไว้ที่ 7° ซ. ในช่วงเวลา 0-4 เดือน เปลี่ยนแปลงจากความเข้มข้นของยานิตินั้นที่ตรวจพบครั้งแรกภายหลังเตรียมชุดตรวจไม่เกิน 4 เท่า และเวลาอ่านผลเพิ่มจากเดิมไม่เกิน 30 นาที

ภาควิชา สหศาสตร์ชีวจุลชีววิทยาทางการแพทย์.....
สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางการแพทย์.....
ปีการศึกษา.....2540.....

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

C 745495 : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: ANTIBIOTIC RESIDUES / *BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS* / MICROBIOLOGICAL / TUBE DIFFUSION
KRITTIKA CHINPAN : DEVELOPMENT OF MICROBIOLOGICAL TEST KIT FOR DETECTION OF ANTIBIOTIC
RESIDUES IN MILK, THESIS ADVISOR : INSTRUCTOR KRIENGSAG SAITANU, Ph.D., 147 pp

Different concentration of 12 antimicrobial agents were tested by mixing into instant milk powder. Microbiological test kit for detection of antibiotic residues with tube diffusion method using *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* NIZO were employed. Compare minimum concentration of each antimicrobial agent found 100% by the prepared test kit (K2) with Maximum residue limit (MRL) and minimum concentration of that antibiotic found 100% by Delvotest-P® and ADM®.

K2 was prepared by mixing *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* NIZO obtained from culturing in agar media at 65°C for 18-20 hours into complex media. The amount of organism in test kit was equal to 10⁸ CFU/ml. The capability of test kit was tested by using instant milk powder mixed with different concentration of 12 antimicrobial agents (spiked milk). The experiment showed that K2 was better in detection of β-lactams than other antimicrobial agents. Minimum concentration of Ampicillin, Cloxacillin, Penicillin, and Cephapirin found 100% were 40, 20, 5 and 40 ppb respectively which are close to MRL value of each antibiotic. K2 could not detect Chloramphenicol with 625-40,000 ppb concentration. Minimum concentration of Streptomycin, Gentamicin, Kanamycin, Erythromycin and Oxytetracycline found 100% were 1,500, 480, 7,500, 400, and 120 ppb respectively. 400,000 ppb Sulfamethazine and 400,000 ppb Sulfathiazole were found 50, 33%. The concentration found 100% of these antimicrobial agents were close to those found 100% by Delvotest-P® and ADM®.

The minimum concentration of Sulfamethazine and Sulfathiazole found 100% by K2 which added Trimethoprim 0.05 µg/ml were 500 and 250 ppb. The minimum concentration of Sulfamethazine and Sulfathiazole found 100% by K2 which added Trimethoprim 0.1 was 250 ppb.

The concentration of different kinds of antibiotic found by K2 which kept at 7°C for 0-4 months was not changed more than four fold from the first finding and the time of reading extended not more than 30 minutes.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา... สหเวชศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย... ลายมือชื่อนิสิต... Ka. Chir
สาขาวิชา... จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา... [Signature]
ปีการศึกษา... 2540... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม... [Signature]

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากบุคคลหลายฝ่าย ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณและขอบคุณทุกท่านผู้มีรายนามต่อไปนี้

อาจารย์นายสัตวแพทย์ดร. เกรียงศักดิ์ สายธนู ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาอนุเคราะห์เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รวมทั้งให้คำแนะนำตลอดการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ตลอดจนอนุญาตให้ใช้สถานที่และเครื่องมือในการทำวิจัย

อาจารย์นายสัตวแพทย์ดร. ชงชัย เฉลิมชัยกิจ รองคณบดีฝ่ายวิชาการ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, รองศาสตราจารย์แพทย์หญิงสมใจ เจริญประยูร, อาจารย์นายแพทย์อนันต์ จงเดสิง, อาจารย์นายแพทย์ธานี นวังกส์ตฤศาสน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ข้อคิดและคำแนะนำในการศึกษาวิจัยจนสำเร็จลงไปด้วยดี

รองศาสตราจารย์ดร. วิมลมาศ ลิปิพันธ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาเป็นประธานสอบวิทยานิพนธ์ และศาสตราจารย์ดร.สพญ. มาลินี ลิ้มโกศา ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และให้คำแนะนำในการปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

เจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับการช่วยเหลือและให้ความร่วมมือในการทำกรวิจัย

สุดท้ายผู้วิจัยขอกราบขอบคุณบิดา-มารดา และขอบคุณจอยกับปิ๊อป สำหรับความรัก ความเข้าใจ การดูแลเอาใจใส่ กำลังใจและการสนับสนุน จนทำให้ผู้วิจัยสามารถทำงานครั้งนี้ให้สำเร็จลงได้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
รายการตารางประกอบ.....	ช
รายการภาพประกอบ.....	ฎ
คำย่อที่ใช้ในวิทยานิพนธ์.....	ฐ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. ปรัชศน์วรรณกรรม.....	13
3. วัสดุและวิธีการ.....	33
4. ผลการทดลอง.....	62
5. ข้อเสนอสรุปและวิจารณ์ผล.....	114
รายการอ้างอิง.....	123
ภาคผนวก ก.....	135
ภาคผนวก ข.....	144
ภาคผนวก ค.....	145
ประวัติผู้เขียน.....	147

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1. ตัวอย่างจุลินทรีย์มาตรฐานที่ใช้เตรียมชุดตรวจหายาด้านจุลชีพตกค้างโดยอาศัย หลักการยับยั้งการแบ่งตัวของจุลินทรีย์	15
2. ปริมาณต่ำสุดของยาด้านจุลชีพบางชนิดที่ตรวจพบโดยวิธีการตรวจต่าง ๆ	22
3. ชุดตรวจหายาด้านจุลชีพในน้ำมันโดยวิธีอิมมิวโนเอสเส	26
4. ปริมาณต่ำสุดของยาด้านจุลชีพในน้ำมันที่ตรวจพบ 100 เปอร์เซ็นต์โดยวิธี Charm II Test®	29
5. ความเข้มข้น stock solution, working solution, ตัวทำละลาย และตัวเจือจาง ของยาด้านจุลชีพต่าง ๆ	46
6. ความเข้มข้นของยาด้านจุลชีพที่ใช้ทดสอบหาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม และ ทดสอบหา dose response curve ของชุดตรวจในการตรวจหายาด้านจุลชีพ ชนิดต่าง ๆ ในน้ำมัน	47
7. ความเข้มข้นของน้ำมันผสมยาด้านจุลชีพ 2 และ 3 ชนิดที่ใช้ทดสอบ	50
8. ความเข้มข้นของยาด้านจุลชีพที่ใช้ทดสอบหา dose response curve ของวิธีการตรวจต่าง ๆ	54
9. ความเร็วในการเจริญเติบโตของ <i>B. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> ที่เตรียมจาก broth media 72 ชม. ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่าง ๆ	68
10. ความเร็วในการเจริญเติบโตของ <i>B. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> ที่เตรียมจาก broth media 18-20 ชม. ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่าง ๆ	69

11. ความเร็วในการเจริญเติบโตของ *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* ที่เตรียมจาก agar media 72 ชม. ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่าง ๆ 70
12. ความเร็วในการเจริญเติบโตของ *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* ที่เตรียมจาก agar media 18-20 ชม. ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่าง ๆ 71
13. ความเข้มข้นของยาด้านจุลชีพ 12 ชนิดที่ตรวจพบโดยชุดตรวจซึ่งเตรียมจาก *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งนาน 18-20 ชม. ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 18 สูตร 73
14. เปอร์เซ็นต์ผลบวกของการตรวจหา Chloramphenicol ในน้ำนมด้วยชุดตรวจ K1 และ K2 87
15. ความเข้มข้นของยาด้านจุลชีพในรูปของยาผสมที่ตรวจพบ 100% โดยชุดตรวจ K2 เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของยาด้านจุลชีพแต่ละชนิดที่ตรวจพบ 100% โดยชุดตรวจ K2 91
16. เปอร์เซ็นต์ผลบวกของการตรวจหา Sulfamethazine โดยชุดตรวจ K2 และ ชุดตรวจ K2 ที่เติม Trimethoprim 0.05 และ 0.1 µg/mL 93
17. เปอร์เซ็นต์ผลบวกของการตรวจหา Sulfathiazole โดยชุดตรวจ K2 และ ชุดตรวจ K2 ที่เติม Trimethoprim 0.05 และ 0.1 µg/mL 94
18. ความเข้มข้นของยาด้านจุลชีพที่ตรวจพบโดยชุดตรวจ K2L1, K2L2 และ K2L3 เมื่อเก็บชุดตรวจไว้นาน 0-4 เดือน 96
19. เปอร์เซ็นต์ที่ให้ผลบวกของชุดตรวจ K2 และวิธีทดสอบอื่นอีก 6 วิธี ในการตรวจหา Ampicillin ในน้ำนม 101
20. เปอร์เซ็นต์ที่ให้ผลบวกของชุดตรวจ K2 และวิธีทดสอบอื่นอีก 6 วิธี ในการตรวจหา Cloxacillin ในน้ำนม 102

21. เปอร์เซ็นต์ที่ให้ผลบวกของชุดตรวจ K2 และวิธีทดสอบอื่นอีก 6 วิธี 103
ในการตรวจหา Penicillin G ในน้ำนม
22. เปอร์เซ็นต์ที่ให้ผลบวกของชุดตรวจ K2 และวิธีทดสอบอื่นอีก 6 วิธี 104
ในการตรวจหา Cephapirin ในน้ำนม
23. เปอร์เซ็นต์ที่ให้ผลบวกของชุดตรวจ K2 และวิธีทดสอบอื่นอีก 6 วิธี 105
ในการตรวจหา Streptomycin ในน้ำนม
24. เปอร์เซ็นต์ที่ให้ผลบวกของชุดตรวจ K2 และวิธีทดสอบอื่นอีก 6 วิธี 106
ในการตรวจหา Gentamicin ในน้ำนม
25. เปอร์เซ็นต์ที่ให้ผลบวกของชุดตรวจ K2 และวิธีทดสอบอื่นอีก 6 วิธี 107
ในการตรวจหา Kanamycin ในน้ำนม
26. เปอร์เซ็นต์ที่ให้ผลบวกของชุดตรวจ K2 และวิธีทดสอบอื่นอีก 6 วิธี 108
ในการตรวจหา Erythromycin ในน้ำนม
27. เปอร์เซ็นต์ที่ให้ผลบวกของชุดตรวจ K2 และวิธีทดสอบอื่นอีก 6 วิธี 109
ในการตรวจหา Oxytetracycline ในน้ำนม
28. เปอร์เซ็นต์ที่ให้ผลบวกของชุดตรวจ K2 และวิธีทดสอบอื่นอีก 6 วิธี 110
ในการตรวจหา Sulfamethazine ในน้ำนม
29. เปอร์เซ็นต์ที่ให้ผลบวกของชุดตรวจ K2 และวิธีทดสอบอื่นอีก 6 วิธี 111
ในการตรวจหา Sulfathiazole ในน้ำนม
30. เปอร์เซ็นต์ที่ให้ผลบวกของชุดตรวจ K2 และวิธีทดสอบอื่นอีก 6 วิธี 112
ในการตรวจหา Chloramphenicol ในน้ำนม
31. ความเข้มข้นต่ำสุดของยาต้านจุลชีพในน้ำนมที่ตรวจพบ 100 เปอร์เซ็นต์ 113
โดยวิธีการตรวจต่าง ๆ

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. ขั้นตอนการตรวจหายาด้านจุลชีพตกค้างในน้ำนมตามข้อกำหนด EEC. No. 2377/90	11
2. หลักการทดสอบโดยวิธีไมโครเบียร์เชพเตอร์	28
3. ขั้นตอนการตรวจหายาด้านจุลชีพในก้อนนมด้วยชุดตรวจ ADM [®]	55
4. ขั้นตอนการตรวจหายาด้านจุลชีพในน้ำนมด้วยชุดตรวจ Delvotest-P [®]	56
5. ขั้นตอนการตรวจหายาด้านจุลชีพในน้ำนมด้วยชุดตรวจ AIM 96 [®]	57
6. ขั้นตอนการตรวจหายาด้านจุลชีพในน้ำนมด้วยชุดตรวจ Charm Farm [®]	58
7. ขั้นตอนการตรวจหายาด้านจุลชีพในน้ำนมด้วยวิธี <i>B. stearothermophilus</i> Disk assay	59
8. ขั้นตอนการตรวจหายาด้านจุลชีพในน้ำนมด้วยวิธี <i>B. subtilis</i> Disk assay	60
9. ขั้นตอนการตรวจหายาด้านจุลชีพในน้ำนมด้วยชุดตรวจ Charm II [®]	61
10. กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ผลบวกของการตรวจหา Ampicillin ในน้ำนม ด้วยชุดตรวจ K1 และ K2	76
11. กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ผลบวกของการตรวจหา Cloxacillin ในน้ำนม ด้วยชุดตรวจ K1 และ K2	77
12. กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ผลบวกของการตรวจหา Penicillin G ในน้ำนม ด้วยชุดตรวจ K1 และ K2	78

13. กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ผลบวกของการตรวจหา Cephapirin ในน้ำนม
ด้วยชุดตรวจ K1 และ K2 79
14. กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ผลบวกของการตรวจหา Streptomycin ในน้ำนม
ด้วยชุดตรวจ K1 และ K2 80
15. กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ผลบวกของการตรวจหา Gentamicin ในน้ำนม
ด้วยชุดตรวจ K1 และ K2 81
16. กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ผลบวกของการตรวจหา Kanamycin ในน้ำนม
ด้วยชุดตรวจ K1 และ K2 82
17. กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ผลบวกของการตรวจหา Erythromycin ในน้ำนม
ด้วยชุดตรวจ K1 และ K2 83
18. กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ผลบวกของการตรวจหา Oxytetracycline ในน้ำนม
ด้วยชุดตรวจ K1 และ K2 84
19. กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ผลบวกของการตรวจหา Sulfamethazine ในน้ำนม
ด้วยชุดตรวจ K1 และ K2 85
20. กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ผลบวกของการตรวจหา Sulfathiazole ในน้ำนม
ด้วยชุดตรวจ K1 และ K2 86

คำย่อที่ใช้ในวิทยานิพนธ์

AC	Ampicillin
ATP	Adenosine triphosphate
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoides</i> ATCC 11778
<i>B. stearothermophilus</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> NIZO
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633
CEP	Cephapirin
CFU	Colony forming unit
CP	Chloramphenicol
CX	Cloxacillin
DW	Distilled water
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536
EEC	European Economic Community
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EM	Erythromycin
et al.	et alli.
FDA	Food and Drug Administration
g.	gravity
GC	Gas Chromatography
GM	Gentamicin

HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IDF	International Dairy Federation
KM	Kanamycin
<i>L. bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
MRL	Maximum Residue Limit
μ	micron
μg	microgram
μl	microlitre
<i>M. luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341
ml	millilitre
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
NaOH	Sodium hydroxide
NCTR	National Center for Toxicological Research
No.	number
NSS	normal saline solution
OTC	Oxytetracycline
ppb	part per brilliant
<i>S. thermophilus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i> strain T.J.