1. จุดประสงค์ (Purpose)

เพื่อเป็นคู่มือในการทดสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจหาสารตกค้างด้วยวิธีจุลินทรีย์วิเคราะห์ (Modified Six plate test) ตามวิธี Commission Decision 2002/657/EC

2. ขอบเขต (Scope)

วิธีปฏิบัติการงานนี้ใช้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจหาสารตกค้างด้วยวิธีจุลินทรีย์วิเคราะห์ (Modified Six-plate test) ในตัวอย่างเนื้อไก่ในสารต้านจุลชีพจำนวน 20 ชนิด

3. เอกสารที่เกี่ยวข้อง (Normative references)

3.1 Detection of Anti–Bacterial Substance Residues (BQCLP_VPHL_FM_T5.4_06) งานสุขศาสตร์และจุลชีววิทยา กลุ่มตรวจสอบคุณภาพและผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

3.2 การเตรียมและการควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ (BQCLP_VPHL_FM_W5.9_01) งานสุขศาสตร์และจุลชีววิทยา กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

3.3 Reference microorganisms (BQCLP_VPHL_FM_W5.6_01) งานสุขศาสตร์และจุลชีววิทยา กลุ่มตรวจสอบคุณภาพและผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

4. นิยาม (Definition)

4.1 Detection capability (CCβ) means the smallest content of the substance that may be detected, identified and/or quantified in a sample with an error probability of . In β the case of substances for which no permitted limit has been established, the detection capability is the lowest concentration at which a method is able to detect truly contaminated samples with a statistical certainty of 1 – β. In the case of substances with an established permitted limit, this means that the detection capability is the concentration at which the method is able to detect permitted limit concentrations with a statistical certainty of 1 – β.

4.2 Fortified sample material means a sample enriched with a known amount of the analyte to be detected

4.3 Qualitative method means an analytical method which identifies a substance on the basis of its chemical, biological or physical properties

4.4 Ruggedness means the susceptibility of an analytical method to changes in experimental conditions which can be expressed as a list of the sample materials, analytes, storage conditions, environmental and/or sample

preparation conditions under which the method can be applied as presented or with specified minor modifications. For all experimental conditions which could in practice be subject to fluctuation (e.g. stability of reagents, composition of the sample, pH, and temperature) any variations which could affect the analytical result should be indicated.

4.5 Sample blank determination means the complete analytical procedure applied to a test portion taken from a sample from which the analyte is absent.

4.6 Screening method means methods that are used to detect the presence of a substance or class of substances at the level of interest. These methods have the capability for a high sample throughput and are used to sift large numbers of samples for potential non-compliant results. They are specifically designed to avoid false compliant results.

4.7 Specificity means the ability of a method to distinguish between the analyte being measured and other substances. This characteristic is predominantly a function of the measuring technique described, but can vary according to class of compound or matrix.

5. หลักการ (Principle)

การใช้ยาปฏิชีวนะในปศุสัตว์เป็นปัญหาสำคัญอย่างมากที่ทำให้คนเกิดการดื้อยา โดยเกิดจากการบริโภคอาหารที่ได้จากปศุสัตว์ที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อยาจึงทำให้เกิดการดื้อยาในคนขึ้น ดังนั้นสหภาพยุโรปจึงกำหนดค่า Maximum Residue Limits (MRLs) ของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในปศุสัตว์ขึ้นมา (European Regulation No. 470/2009) เพื่อเป็นการเฝ้าระวังการพบสารตกค้างเหล่านี้

ขั้นตอนแรกจะใช้วิธีเบื้องต้น (Screening step) ซึ่งจะสรุปว่าตัวอย่างมียาปฏิชีวนะตกค้างที่ความเข้มข้นที่เท่ากับหรือมากกว่าค่า MRL ที่กำหนดหรือไม่ และตัวอย่างที่พบสารตกค้างจำเป็นต้องมีการยืนยันผลการทดสอบเพื่อหาปริมาณที่แน่นอนของสารนั้น (EC, 2002) วิธีเบื้องต้นมักใช้วิธีทางจุลชีววิทยา (Microbiological screening method) เนื่องจากราคาถูก ง่าย และใช้เครื่องมือราคาไม่แพง โดยวิธีนี้ได้ถูกนำมาใช้นานหลายปีและได้มีความพยายามที่จะทดสอบความใช้ได้ของวิธีเพื่อนำมาหาค่า MRL เช่น วิธีตรวจวิเคราะห์สารตกค้างด้วยวิธีจุลินทรีย์วิเคราะห์ (Modified six-plate test) ของงานสุขศาสตร์และจุลชีววิทยาซึ่งได้พัฒนามาจากวิธีของ Six plate test (Belfast, Northern Ireland) ที่มุ่งหาวิธีทางคุณภาพในการตรวจหาสารตกค้างของสารต้านจุลชีพตกค้างในเนื้อสัตว์และไข่ โดยใช้สายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่ไวต่อยาปฏิชีวนะและอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ จำนวน 6 เพลทที่แตกต่างกัน ซึ่งแต่ละสายพันธุ์มีความจำเพาะต่อการตรวจหากลุ่มยาปฏิชีวนะที่แตกต่างกัน

ดังนั้นการทดสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจวิเคราะห์สารตกค้างด้วยวิธีจุลินทรีย์วิเคราะห์จึงเป็นสิ่งจำเป็นที่จะช่วยจำกัดวงของกลุ่มยาปฏิชีวนะก่อนที่จะยืนยันด้วยวิธีทางเคมีเพื่อลดค่าใช้จ่าย โดยอาศัยแนวทางของ Commission Decision of 12 August 2002 (2002/657/EC) เพื่อทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีในเนื้อไก่กับ 6 กลุ่มของสารต้านจุลชีพ (20 ชนิด) ที่ 3 ระดับความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพแต่ละชนิด (0.5 MRL, 1.5 MRLs และ 2MRLs) ไม่รวม Blank sample ซึ่งค่า MRL ที่ใช้มาจากข้อกำหนดของสหภาพยุโรป

6. ความปลอดภัย (Safety)

6.1 สวมเสื้อกราวน์และอุปกรณ์ต่างๆ เพื่อความปลอดภัยขณะปฏิบัติงานทุกครั้ง

6.2 เมื่อปฏิบัติงานเกี่ยวกับเชื้อจุลินทรีย์และสารเคมีควรทำภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

6.3 เมื่อมีการใช้สารต้านจุลชีพควรหลีกเลี่ยงการสัมผัสทั้งทางระบบทางเดินหายใจและผิวหนัง

7. อุปกรณ์ (Equipment)

7.1 Incubator set at 30±2^{0}C, and 36±2^{0}C

7.2 Refrigerator set at 2-8^{0}C

7.3 Freezer set at -15^{0}C up

7.4 Centrifuge

7.5 Water bath set at 45±2^{0}C and 80±2^{0}C

7.6 Autoclave

7.7 pH meter

7.8 Zone reader or Metric ruler

7.9 Analytical balance (0.0001 g)

7.10 Sterile Erlenmeyer flask

7.11 Blender

7.12 Petri dishes

7.13 Micropipettes and Sterile micropipette tips

7.14 Sterile pipettes

7.15 Glass beads

7.16 Cellulose membrane 325 P (Wolff Walsnode)

7.17 Filter paper 6 mm in diameter

7.18 Sterile bottles

7.19 Triangular-shape glass rods

7.20 Roux flasks

7.21 Sterile 20x150 mm test tube

7.22 Metal pushers

7.23 Scissors

7.24 Cork borers (inner diameter 8 mm)

7.25 Sterile centrifuge tubes 50 ml

8. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (Culture media and Reagents)

8.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ (Culture media)

8.1.1 Tryptic soy agar (TSA)

Pancreatic digest of casein	15.0	g
Peptic digest of soya bean	5.0	g
Sodium chloride (NaCl)	5.0	g
Agar	15.0	g
Distilled water	1,000	ml

Suspend the entire ingredient in the water and bring to the boil to dissolve completely. If necessary, adjust the pH so that after sterilization it is 7.3±0.2 at 25^{0}C. Dispense the medium in quantities into suitable containers of suitable capacity. Sterilize by autoclaving at 121^{0}C for 15 min. If commercial medium is used, follow the manufacturer's instruction.

8.1.2 Finley and Fields Medium

Nutrient agar	18.0	g
Glucose	5.0	g
Manganese sulphate	0.03	g
Distilled water	1,000	ml

Suspend the entire ingredient in the water and bring to the boil to dissolve completely. If necessary, adjust the pH so that after sterilization it is 7.0±0.2 at 25^{0}C. Dispense the medium in quantities into suitable containers of suitable capacity. Sterilize by autoclaving at 121^{0}C for 15 min. If commercial medium is used, follow the manufacturer's instruction.

8.1.3 Test agar at pH 6.0

Test Agar pH 6.0 (Merck)	25.0	g
Distilled water	1,000	ml

Suspend test agar pH 6.0 medium in the water and bring to the boil to dissolve completely. If necessary, adjust the pH so that after sterilization it is 6.0±0.1 at 25^{0}C. Dispense 100 ml medium into suitable containers. Sterile by autoclaving at 121^{0}C for 15 min.

8.1.4 Test agar at pH 7.2

Peptone P (Oxoid, L49)	7.0	g

Sodium Chloride	5.0	g
Tri Sodium hydrogen orthophosphate	0.8	g
Or (Tri Sodium phosphate 12- hydrate)		
Purify agar (Oxoid, L28)	13.0	g
Distilled water	1,000	ml

Suspend the entire ingredient in the water and bring to the boil to dissolve completely. If necessary, adjust the pH so that after sterilization it is 7.2±0.1 at 25^{0}C. Dispense 100 ml medium into suitable containers. Sterile by autoclaving at 121^{0}C for 15 min.

8.1.5 Test agar at pH 8.0

Test Agar pH 8.0 (Merck)	25.0	g
Distilled water	1,000	ml

Suspend test agar pH 8.0 medium in the water and bring to the boil to dissolve completely. If necessary, adjust the pH so that after sterilization it is 8.0±0.1 at 25^{0}C. Dispense 100 ml medium into suitable containers. Sterile by autoclaving at 121^{0}C for 15 min.

8.1.6 Standard plate count agar (PCA)

Tryptone	5.0	g
Yeast extract	2.5	g
Dextrose	1.0	g
Agar	15.0	g
Distilled water	1,000	ml

Suspend the entire ingredient in the water and bring to the boil to dissolve completely. If necessary, adjust the pH so that after sterilization it is 7.0±0.2 at 25^{0}C. Dispense the medium in quantities into suitable containers of suitable capacity. Sterilize by autoclaving at 121^{0}C for 15 min. If commercial medium is used, follow the manufacturer's instruction.

8.1.7 Nutrient agar (NA)

Peptone	5.0	g
Beef extract	3.0	g
Agar	15.0	g
Distilled water	1,000	ml

Suspend the entire ingredient in the water and bring to the boil to dissolve completely. If necessary, adjust the pH so that after sterilization it is 6.8±0.2 at 25^{0}C. Dispense the medium in quantities into suitable containers of suitable capacity. Sterilize by autoclaving at 121^{0}C for 15 min. If commercial medium is used, follow the manufacturer's instruction.

8.1.8 0.1% Peptone normal saline solution (Diluents, DF)

Sodium chloride	8.5	g
Peptone	1.0	g
Distilled water	1,000	ml

Suspend ingredient in the water. Add the diluents to flasks, bottles or tubes as needed. Sterilize in an autoclave at 121^{0}C for 15 min. The pH should be 7.0±0.2 after sterilization. If commercial medium is used, follow the manufacturer's instruction.

8.2 สารเคมี (Reagents)

8.2.1 Methanol

8.2.2 Ethanol (HPLC grade)

8.2.3 Sodium chloride

8.2.4 Hydrochloric acid (0.1 M)

8.2.5 Sodium hydroxide (0.1 M)

8.2.6 Sodium hydrogen phosphate ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$)

9. สารมาตรฐาน (Standard)

9.1 เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง (Reference microorganisms)

9.1.1 *Bacillus subtilis* BGA strain (Merck)

9.1.2 *Bacillus cereus* ATCC 11778

9.1.3 *Kocuria rhizophila* ATCC 9341

9.1.4 *Escherichia coli* ATCC 11303

9.2 สารต้านจุลชีพ (Antimicrobial agents)

สารต้านจุลชีพที่นำมาศึกษามี 20 ชนิด คือ Amoxillin, Ampicillin, Chlortetracycline, Ciprocloxacin Colistin, Doxycycline, Enrofloxacin, Erythromycin, Gentamycin, Lincomycin, Neomycin, Norfloxacin, Oxytetracycline,

Penicillin G, Spectinomycin, Sulfadiazine, Sulfamethazine, Tilmicosin, Trimethoprim และ Tylosin โดยสารมาจาก Sigma-Aldrich ยกเว้น Ciprofloxacin มาจาก MP

10. ขั้นตอนปฏิบัติงาน (Procedure)

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจวิเคราะห์สารตกค้างด้วยวิธีจุลินทรีย์วิเคราะห์ในตัวอย่างเนื้อไก่ ประกอบด้วย 3 ส่วนหลัก ดังนี้

10.1 การวางแผนการทดลอง

10.1.1 การเลือกตัวอย่างในการทดสอบ

เลือกใช้ตัวอย่างไก่ที่ผ่านการทดสอบด้วยวิธีวิเคราะห์สารตกค้างด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา (Modified Six plate test) แล้วให้ผลเป็นลบแล้วเก็บไว้ที่ ≤-15^{0}C จากนั้นนำตัวอย่างที่จะศึกษาบดให้ละเอียดแล้วแบ่งเป็น 4 ส่วน ส่วนละ 100 กรัม ส่วนแรกเป็นตัวอย่างที่ไม่ใส่สารต้านจุลชีพ (Blank sample) เพื่อเป็นการควบคุมการวิเคราะห์ ส่วนอีก 3 ส่วนที่เหลือใส่สารต้านจุลชีพที่จะศึกษา (Fortified sample) ที่ความเข้มข้นที่ระดับ 0.5MRL, 1MRL และ 2MRLs ตามลำดับ แต่ถ้าตรวจไม่พบที่ระดับข้างต้นอย่างน้อย 10 ตัวอย่าง จะมีการทดสอบเพิ่มเติมจนถึงระดับความเข้มข้น 9MRLs แล้วนำไปเก็บที่ ≤-15^{0}C เป็นเวลา 1 วัน ก่อนดำเนินการทดสอบต่อไปด้วยวิธีด้วยวิธีตรวจวิเคราะห์สารตกค้างด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา โดยความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพที่เลือกใช้ในกาทดสอบตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สารต้านจุลชีพและความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพที่เลือกในการศึกษาการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ

Antimicrobial family	Representative antimicrobial agent	MRL (µg/kg)	Range of concentrations used (µg/ kg)
AMINOGLYCOSIDES	Gentamycin	50	25-450
	Neomycin	500	250-4500
	Spectinomycin	300	150-2700
LINCOSAMIDES	Lincomycin	100	50-900
MACROLIDES	Erythromycin	200	100-400
	Tilmicosin	75	25-675
	Tylosin	100	50-600
MISCELLANEOUS	Trimethoprim	50	25-200
β-LACTAM	Amoxillin	50	25-100
	Ampicillin	50	25-100
	Penicillin G	50	25-150
POLYPEPTIDE	Colistin	150	75-1350
SULFONAMIDES	Salfadiazine	100	50-600
	Sulfamethazine	100	50-500
TETRACYCLINES	Chlortetracycline	100	50-300
	Doxycycline	100	50-300
	Oxytetracycline	100	50-300
QUINOLONES	Ciprofloxacin	100	50-200
	Enrofloxacin	100	50-200
	Norfloxacin	100	50-300

10.1.2 การเตรียมสารต้านจุลชีพในการทดสอบ

การเตรียม Stock ของสารต้านจุลชีพจะเตรียมให้มีระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ส่วนการเตรียม Working จะใช้น้ำกลั่นเพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการก่อนนำไป Spike ลงในตัวอย่างตามที่วางแผนไว้ ซึ่งมีน้ำหนัก 100 กรัม ตามข้อ 10.1.1

10.1.3 การหาพารามิเตอร์ ได้แก่ Detection capability (CCβ), Ruggednes, Specificity และ Stability

10.1.3.1 Detection capability (CCβ)

ทำการทดสอบกับตัวอย่างตามข้อ 10.1.1 ซึ่งตัวอย่างจะมีการชักนำให้เกิดความแปรปรวนมากที่สุด โดยดำเนินการทดสอบ 1 วัน/1 ตัวอย่าง ของสารต้านจุลชีพแต่ละชนิด และมีการเตรียม Working ของสารต้านจุลชีพและเชื้อแบคทีเรียใหม่ทุกครั้งของการทดสอบในแต่ละครั้ง ทั้งนี้เพื่อทำให้สภาวะแวดล้อมเปลี่ยนแปลงในแต่ละการทดสอบ หลังจากการวิเคราะห์ครบทั้ง 20 ตัวอย่างที่ได้ทำการใส่สารต้านจุลชีพที่ระดับความเข้มข้นที่ทดสอบแล้ว ดูว่าระดับความเข้มข้นใดที่ให้ <5% of false compliant result แสดงว่านั้นคือค่า Detection capability (CCβ) ของวิธีทดสอบ (1 false compliant result maximum out of 20 spiked samples)

10.1.3.2 Specificity

มีการเลือกตัวอย่าง Blank sample จำนวน 20 ตัวอย่าง เพื่อตรวจสอบความจำเพาะของวิธีทดสอบ รวมทั้งมีการนำ Fortified sample 20 ตัวอย่าง ที่ทราบความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพทดสอบ โดยได้จากการทดสอบ Detection capability มาทำการศึกษาเพื่อจะได้ทราบ Specificity ของวิธีนี้

10.1.3.3 Ruggedness

เมื่อทราบค่า CCβ ของสารต้านจุลชีพตกค้างแต่ละชนิดแล้วทำการออกแบบการทดลองเพื่อประเมินหา Ruggedness โดยมีการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมใหม่ การเตรียมสารต้านจุลชีพมาตรฐานใหม่ทุกครั้งของการทดสอบ นอกจากนี้มีการให้เจ้าหน้าที่ทำการเลือกวางแผนการทดสอบของ 4 ปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์ (ปัจจัย A, 1.0×10^7 cfu ± 10%) ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อในเพลท (ปัจจัย B, 5 ml ± 10%) ระยะเวลาที่ใช้การบ่มเพลท (ปัจจัย C, 21 hrs ± 10%) และระยะเวลาก่อนบ่มที่วางไว้อุณหภูมิห้อง 30 นาที (มีหรือไม่มีการวางก่อนบ่ม) (ปัจจัย D) ซึ่งปัจจัยเหล่านี้จะนำมาใช้ในการศึกษาทดสอบหา Ruggedness เพื่อวิเคราะห์อิทธิพลและปฏิสัมพันธ์ของแต่ละปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อผลการทดสอบตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การวางแผนการศึกษา Ruggedness

Run	A [a]	B [b]	C [c]	D=ABC [d]	AB+CD	AC+BD	BC+AD
1	-	-	-	+	+	+	+
2	+	-	-	+	-	-	+
3	-	+	-	+	-	+	-
4	+	+	-	-	+	-	-
5	-	-	+	+	+	-	-
6	+	-	+	-	-	+	-
7	-	+	+	-	-	-	+
8	+	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ:

Run 1 = วันที่ 1, [a] = Concentration of bacteria; [b] = Medium quantity; [c] = Incubation time

+ = increasing of the factor, - = decreasing of the factor

AB+CD, AC+BD and BC+AD are the evaluation of the impact of the combination of the different factor

ทั้งนี้การศึกษา Ruggedness จะดูจากค่า CCβ ของสารต้านจุลชีพตามข้อ 10.1.3.1 โดยมุ่งเน้นไปที่การตรวจพบบน 6 เพลท เพื่อเป็นตัวแทน ได้แก่ Ciprofloxacin ที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/กิโลกรัม บนเพลท EC8, Chlortetracycline ที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/กิโลกรัม บนเพลท BC6, Erythromycin ที่ระดับความเข้มข้น 400 ไมโครกรัม/กิโลกรัม บนเพลท KR8, Penicillin G ที่ระดับความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม/กิโลกรัม บนเพลท CM6 และ Sulfamethazine ที่ระดับความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/กิโลกรัม บนเพลท CM7.2 โดยตัวอย่างที่จะทดสอบจะเก็บไว้ที่ ≤-15^{0}C ก่อนการทดสอบตามวิธีวิเคราะห์ ซึ่งในแต่ละการทดสอบในแต่ละวันจะทดสอบกับ Blank sample และตัวอย่างที่ Spike สารต้านจุลชีพที่จะศึกษาอย่างละ 4 ตัวอย่าง ส่วนเพลท CM8 ไม่ได้นำมา ทดสอบเนื่องจากไม่มีความจำเพาะกับสารต้านจุลชีพที่ระดับความเข้มข้นน้อยกว่าค่า 9MRLs

10.1.3.4 Stability

ทำการศึกษา Stability โดยการเก็บตัวอย่าง (Fortified sample และ Blank sample) จำนวนอย่างละ 20 ตัวอย่าง ที่ ≤-15^{0}C เป็นเวลา 1 วัน 7 วัน และ 14 วัน ตามลำดับ ก่อนดำเนินการทดสอบต่อไปด้วยวิธีด้วยวิธีตรวจวิเคราะห์สารตกค้างด้วยวิธีจุลินทรีย์วิเคราะห์ ในแต่ละช่วงเวลาที่เก็บ

10.2 การดำเนินการทดสอบ

ตรวจหาสารตกค้างด้วยวิธีทางจุลินทรีย์วิเคราะห์ในเนื้อไก่ โดยดำเนินตามคู่มือทดสอบ Detection of Anti–Bacterial Substance Residue ของงานสุขศาสตร์และจุลชีววิทยา กลุ่มตรวจสอบคุณภาพและผลผลิตจากสัตว์ โดยมีการให้สัญลักษณ์ในแต่ละเพลทที่ใช้เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ตามตารางที่ 3

ตารางที่ 3 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้บนเพลททดสอบ

Test agar	Name of bacteria	Bacteria strain	Symbol
pH 6.0	*Bacillus subtilis*	BGA	CM6
pH 7.2	*Bacillus subtilis*	BGA	CM7.2
pH 8.0	*Bacillus subtilis*	BGA	CM8
pH 8.0	*Kocuria rhizophila*	ATCC 9341	KR8
pH 6.0	*Bacillus cereus*	ATCC 11778	BC6
pH 8.0	*Escherichia coli*	ATCC 11303	EC8

การแปรผลการทดสอบ

ความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพที่ให้ผลบวกต้องให้ค่า Inhibition zone > 2 มิลลิเมตร โดยวัดในส่วนของรัศมีจากชิ้นเนื้อถึงโซนเชื้อที่ขึ้น

10.3 การสรุปผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ

11. การคำนวณ (Calculation)

-

12. การควบคุมคุณภาพ (Quality control)

12.1 ควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อที่นำมาทดสอบตาม BQCLP_VPHL_FM_W5.9_01

12.2 ในการทำการทดสอบทุกครั้งจะมีการทำ Blank plate (Consist of media that add microorganism) เพื่อควบคุมคุณภาพการทดสอบ

12.3 มีการทำสารต้านจุลชีพควบคุมผลการทดสอบทุกครั้ง

12.4 มีการทดสอบ Blank sample ที่ไม่ใส่สารต้านจุลชีพทุกครั้งที่ทดสอบ

13. การบันทึกข้อมูล (Record and Form)

-

14. การรายงาน (Report)

จากการทดสอบความใช้ได้ของวิธีจะอยู่ในเอกสารฉบับนี้ ส่วนข้อมูลดิบเก็บไว้ที่งานสุขศาสตร์และจุลชีววิทยา กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์

14.1 การหา Detection capability (CCβ)

ผลจากการศึกษาจาก 20 ตัวอย่าง ในแต่ละสารต้านจุลชีพที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจได้ตามตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการศึกษาหาค่า Detection capabilities CCβ (μg/kg) ในสารต้านจุลชีพ 20 ชนิด

Antimicrobial family	Antimicrobial agent	MRL muscle (μg/kg)	Mean IZ (mm) ± SD	CCβ (μg/ kg)
AMINOGLYCOSIDES	Gentamycin	50	-	>450
	Neomycin	500	-	>4500
	Spectinomycin	300	-	>2700
LINCOSAMIDES	Lincomycin	100	-	>900
β-LACTAM	Amoxillin	50	2.8±0.5	50
	Ampicillin	50	3.8±0.9	25
	Penicillin G	50	8.7±1.5	25
MACROLIDES	Erythromycin	200	5.9±1.2	400
	Tilmicosin	75	-	>675
	Tylosin	100	-	>900
MISCELLANEOUS	Trimethoprim	50	3.4±0.6	100
POLYPEPTIDE	Colistin	150	-	>1350
SULFONAMIDES	Salfadiazine	100	4.3±2.2	600
	Sulfamethazine	100	3.1±1.5	500

ตารางที่ 4 ผลการศึกษาหาค่า Detection capabilities CCβ (μg/kg) ในสารต้านจุลชีพ 20 ชนิด (ต่อ)

Antimicrobial family	Antimicrobial agent	MRL muscle (μg/kg)	Mean IZ (mm) ± SD	CCβ (μg/ kg)
TETRACYCLINES	Chlortetracycline	100	2.9±0.4	50
	Doxycycline	100	3.3±0.2	100
	Oxytetracycline	100	3.5±0.1	200
QUINOLONES	Ciprofloxacin	100	7.1±1.3	50
	Enrofloxacin	100	8.4±1.2	50
	Norfloxacin	100	7.2±1.2	300

หมายเหตุ IZ = Inhibition zone (mm) , SD = Standard deviation, - = No data

14.2 การหา Specificity

จากการศึกษาในตัวอย่าง Blank sample ของเนื้อไก่จำนวน 20 ตัวอย่าง ไม่พบการเกิด False positive ขึ้น ส่วนผลการทดสอบกับ Fortified sample ของสารต้านจุลชีพ 20 ชนิด โดยทำการทดสอบความเข้มข้นของยาแต่ละชนิดที่ระดับ 0.5MRL, 1MRL และ 2MRLs และถ้าตรวจไม่พบจะทำการทดสอบจนถึงความเข้มข้นของยาที่ระดับ 9MRLs ซึ่ง Spike ลงในตัวอย่างเนื้อไก่ พบว่าแต่ละสารต้านจุลชีพมีความจำเพาะกับเพลททดสอบของวิธีทดสอบ Modified six plate test แตกต่างกันไป ตามตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการศึกษาหาค่า Specificity บนเพลททดสอบ

Antimicrobial family	Representative antibiotics	Specific plate
AMINOGLYCOSIDES	Gentamycin	-
	Neomycin	-
	Spectinomycin	-
LINCOSAMIDES	Lincomycin	-
MACROLIDES	Erythromycin	KR8
	Tylosin	-
MISCELLANEOUS	Trimethoprim	EC8

ตารางที่ 5 ผลการศึกษาหาค่า Specificity บนเพลททดสอบ (ต่อ)

Antimicrobial family	Representative antibiotics	Specific plate
β-LACTAM	Amoxillin	CM6 (+KR8)
	Ampicillin	CM6 (+KR8)
	Penicillin G	CM6
POLYPEPTIDE	Colistin	-
SULFONAMIDES	Salfadiazine	CM7.2
	Sulfamethazine	CM7.2
TETRACYCLINES	Chlortetracycline	BC6 (+CM6)
	Doxycycline	BC6 (+CM6)
	Oxytetracycline	BC6
TILMICOSIN	Tilmicosin	-
QUINOLONES	Ciprocloxacin	EC8
	Enrofloxacin	EC8
	Norfloxacin	EC8

จากตารางที่ 5 สามารถสรุปเป็นข้อๆ ได้ดังต่อไปนี้

14.2.1 กลุ่ม β-Lactam ได้แก่ Amoxillin, Ampicillin และ Penicillin G จำเพาะกับ CM6 และ KR8 plate ส่วน Penicillin G จำเพาะกับ CM6 plate

14.2.2 กลุ่ม Sulfonamide ได้แก่ Sulfadiazine และ Sulfamethazine จำเพาะกับ CM7.2 plate

14.2.3 กลุ่ม Quinolone ได้แก่ Ciprofloxacin, Enrofloxacin และ Norfloxacin จำเพาะกับ EC8 plate

14.2.4 กลุ่ม Tetracycline จำเพาะกับ BC6 plate และ CM6 plate ซึ่งพบในยา Chlortetracycline และ Doxycycline ส่วนใน Oxytetracycline พบว่ามีความจำเพาะ CM6 plate

14.2.5 กลุ่ม Macrolide ได้แก่ Erythromycin จำเพาะกับ KR8 plate ส่วน Tylosin และ Tilmicosin ไม่มีความจำเพาะเมื่อทำการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นที่ 9MRLs

14.2.6 กลุ่มAminoglycoside, Lincosamide และ Polypeptide พบว่าไม่มีความจำเพาะเมื่อทำการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นที่ 9MRLs

14.3 การหา Ruggedness

จากการประเมินหาค่า Ruggedness โดยมีการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมใหม่ การเตรียมสารต้านจุลชีพมาตรฐานใหม่ทุกครั้งของการทดสอบ ซึ่งทำการเลือกทดสอบ 4 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์ ($1.0x10^7$cfu ± 10%) ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อในเพลท (5 ml ± 10%) ระยะเวลาที่ใช้การบ่มเพลท (21 hrs ± 10%) ระยะเวลาก่อนบ่มที่วางไว้อุณหภูมิห้อง 30 นาที (มีหรือไม่มีการวางก่อนบ่ม) เพื่อวิเคราะห์อิทธิพลและปฏิสัมพันธ์ของแต่ละปัจจัยปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อผลการทดสอบตามตารางที่ 6-7

ตารางที่ 6 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนของ CCβ และ Ruggedness

Antimicrobial Family	Antimicrobial Agent	Tested concentration (µg/kg)	Plate	Mean IZ (mm) ± SD CCβ	Mean IZ (mm) ± SD Ruggedness
β-LACTAM	Penicillin G	25	CM6	8.7±1.5	7.4±1.6
MACROLIDES	Erythromycin	400	KR8	5.9±1.2	5.5±1.6
SULFONAMIDES	Sulfamethazine	500	CM7.2	3.1±1.5	2.6±1.6
TETRACYCLINES	Chlortetracycline	50	BC6	2.9±0.4	2.7±1.3
QUINOLONES	Ciprofloxacin	50	EC8	7.1±1.3	6.5±1.0

หมายเหตุ IZ = Inhibition zone (mm); SD = Standard deviation

จากตารางพบว่าค่าการเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จาก Ruggedness มีแนวโน้มสูงกว่าการเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จาก CCβ ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าปัจจัยทั้งหมดมีผลกระทบต่อผลการทดสอบ

ตารางที่ 7 การวิเคราะห์อิทธิพลและปฏิสัมพันธ์ของแต่ละปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อผลการทดสอบผลการศึกษาปัจจัยต่างๆ ของ Ruggedness

Plate	Response	Factor				Interaction		
		A [a]	B [b]	C [c]	D=ABC [d]	AB+CD	AC+BD	BC+AD
CM6	Impact (+/-/=)	+	-	-	+	+	-	+
KR8	Response	A [a]	B [b]	C [c]	D=ABC [d]	AB+CD	AC+BD	BC+AD
	Impact (+/-/=)	-	=	+	+	+	-	+
CM7.2	Response	A [a]	B [b]	C [c]	D=ABC [d]	AB+CD	AC+BD	BC+AD
	Impact (+/-/=)	+	-	+	+	-	-	+
BC6	Response	A [a]	B [b]	C [c]	D=ABC [d]	AB+CD	AC+BD	BC+AD
	Impact (+/-/=)	-	-	-	+	-	+	-
EC8	Response	A [a]	B [b]	C [c]	D=ABC [d]	AB+CD	AC+BD	BC+AD
	Impact (+/-/=)	-	-	-	+	-	-	-

หมายเหตุ A คือความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์ (1.0×10^7 cfu ± 10%)

B คือปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อในเพลท (5 ml ± 10%)

C คือระยะเวลาที่ใช้การบ่มเพลท (21 hrs ± 10%)

D คือระยะเวลาก่อนบ่มที่วางไว้อุณหภูมิห้อง 30 นาที (มีหรือไม่มีการวางก่อนบ่ม)

+/-/ = คือผลกระทบในเชิงบวก ลบ และเหมือนเดิมเมื่อเทียบกับการดำเนินการตามปกติ

จากตารางข้างต้นแสดงให้เห็นว่าผลกระทบที่สำคัญของการรวมปัจจัยต่างๆเข้าด้วยกันคือ A+, B+, C-,D- และ (การเพิ่มความเข้มข้นของแบคทีเรีย การเพิ่มปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ การลดระยะเวลาการบ่ม และการไม่วางไว้อุณหภูมิห้อง 30 นาที) นั้นคือการเพิ่มความเข้มข้นของแบคทีเรียหรือการเพิ่มปริมาณอาหารเลี้ยงจะทำให้ความไวของวิธีนี้ลดน้อยลง นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าระยะเวลาการบ่มที่ลดลงจะทำให้ความไวลดลงด้วย ซึ่งอาจสรุปได้ว่าการเพิ่มขึ้นของปัจจัย A และ B อาจทำให้อัตราการเกิด False negative เพิ่มขึ้น ขณะที่การเพิ่มระยะเวลาการบ่มนานขึ้นและระยะเวลาก่อนบ่มที่วางไว้อุณหภูมิห้องให้นานขึ้นจะเพิ่มความไวของวิธีนี้มากขึ้น

10.4 การหาค่า Stability

จากผลการศึกษา Stability โดยมีการการเก็บตัวอย่าง (Fortified sample และ Blank sample) ที่ ≤-15^{0}C เป็นเวลา 1 วัน 7 วัน และ 14 วัน ตามลำดับ ก่อนดำเนินการทดสอบต่อไปด้วยวิธีด้วยวิธีตรวจวิเคราะห์สารตกค้างด้วยวิธีทางจุลินทรีย์วิเคราะห์ โดยทำ 20 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 20 ซ้ำในแต่ละช่วงเวลาที่เก็บแล้วหาค่าเฉลี่ย พบว่าผลที่ได้ยังคงให้ผลเดิมไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่ขนาดของ Inhibition zone มีขนาดเล็กลงเมื่อเก็บตัวอย่างไม่เกิน 14 วัน ตามตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ผลการศึกษาเปรียบเทียบขนาดของ Inhibition zone ของช่วงเวลาการเก็บรักษาต่างๆ

Antimicrobial Agent	MRL Spike in muscle(µg/kg)	Mean IZ (mm) (1 day)	Mean IZ (mm) (7 days)	Mean IZ (mm) (14 days)
Amoxillin	50	2.8	2.8	2.5
Ampicillin	25	3.8	3.6	3.2
Penicillin G	25	8.7	8.6	8.4
Erythromycin	400	5.9	5.5	5.2
Trimethoprim	100	3.4	3.1	3.0
Salfadiazine	600	4.3	4.2	4.0
Sulfamethazine	500	3.1	3.0	2.8
Chlortetracycline	50	2.9	2.8	2.8
Doxycycline	100	3.3	3.2	3.0
Oxytetracycline	200	3.5	3.4	3.2
Ciprofloxacin	50	7.1	6.9	6.8
Enrofloxacin	50	8.4	8.2	7.9
Norfloxacin	300	7.2	7.0	6.9

15. รายละเอียดอื่นๆ (Other)

-

16. เอกสารอ้างอิง (References)

EC 2002. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Official Journal of the European Communities. L221: 8-36.

Anonymous. 2010. Document of 21st 871 of January 2010. Guidelines for the validation of 872 screening methods for residues of veterinary medicines.