

เอกสารวิชาการ

เรื่องที่ 2

การตรวจคัดกรองยาปฏิชีวนะในน้ำนมโคและนมแพะด้วยเทคนิค

Radio receptor assay

Radio receptor screening assays for antibiotic detection

in dairy and goat milk

โดย

เนาวรัตน์ กำภูศิริ

อภิชญา สังข์ทอง

เลขทะเบียนวิชาการที่

63(2)-0304-014

สถานที่ดำเนินการ

สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

ระยะเวลาดำเนินการ

มีนาคม 2560- มกราคม 2563

การเผยแพร่

เว็บไซต์สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

31 มกราคม 2563

<http://qcontrol.dld.go.th/index.php/2014-01-06-04-45-30/110-e-journal/1046-2020-01-29-02-59-05>

การตรวจคัดกรองยาปฏิชีวนะในน้ำนมโคและนมแพะด้วยเทคนิค

Radio receptor assay

เนาวรัตน์ กำภูศิริ ^{1/} อภิญา สังข์ทอง ^{2/}

บทคัดย่อ

ยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมเป็นปัญหาสำคัญต่อผู้บริโภค จึงจำเป็นต้องเฝ้าระวังอย่างสม่ำเสมอ โดยใช้ผลจากการทดสอบด้วยเทคนิคที่เหมาะสม เทคนิค radio receptor assay เป็นวิธีตรวจคัดกรองที่มีข้อดีคือ สามารถระบุชนิดกลุ่มยาปฏิชีวนะได้ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการเลือกในการตรวจคัดกรองการตกค้างของยาปฏิชีวนะในน้ำนมโคและนมแพะ

เก็บตัวอย่างน้ำนมโค 60 ตัวอย่าง และน้ำนมแพะ 24 ตัวอย่าง รวมเป็น 84 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างนำมาตรวจคัดกรองการตกค้างของยาปฏิชีวนะ 4 กลุ่ม คือ Macrolides, Tetracyclines, Sulfonamides และ Amphenicols กลุ่มยาละไม่น้อยกว่า 20 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค radio receptor assay และตรวจยืนยันผลด้วยเทคนิค LC-MS/MS หรือ HPLC-FD ผลการศึกษาพบว่า การทดสอบด้วยชุดตรวจคัดกรองไม่พบผลลบเทียมในทุกกลุ่มยาปฏิชีวนะทั้งในน้ำโคและน้ำนมแพะ ซึ่งสอดคล้องกับเกณฑ์มติคณะกรรมการยุโรป 2002/657/EC ที่กำหนดให้มีผลไม่สอดคล้องกับเกณฑ์ไม่เกิน 5 % สำหรับผลบวกเทียม พบยังไม่สามารถประเมินได้

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเบื้องต้น อาจประเมินประสิทธิภาพชุดตรวจคัดกรองด้วยเทคนิค radio receptor assay เพื่อใช้เป็นวิธีการเลือกในการตรวจยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมโคและน้ำนมแพะได้โดยการใช้อัตราผลลบเทียม แต่ยังประเมินไม่สมบูรณ์ทุกพารามิเตอร์

คำสำคัญ : การตรวจคัดกรอง ยาปฏิชีวนะ น้ำนมโค นมแพะ Radio receptor assay

เลขทะเบียนวิชาการ : 63(2)-0304-014

^{1/}กลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ปทุมธานี

^{2/}กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ปทุมธานี

Radio receptor screening assays for antibiotic detection in dairy and goat milk

Naovarat Kamposiri¹ Apichaya Sungthong²

Abstract

The radio receptor assay technique is a screening method for detection of antibiotic residues. Which is useful for monitoring antibiotic residues in milk. The objective of this study was to study alternative methods for screening antibiotic residues in cow and goat milk.

60 samples of cow's milk and 24 of goat's milk were collected, all 84 samples were tested for screening of 4 antibiotic groups: Macrolides, Tetracyclines, Sulfonamides and Amphenicols (not less than 20 samples per group) by radio receptor assay technique and confirmed with LC-MS / MS or HPLC-FD technique. The results showed that screening tests did not show false negative results in all antibiotic groups in accordance with the Commission Decision 2002/657/EC stated false compliant rate less than 5 %. False positive can not be evaluate.

This study Is a preliminary study. The effectiveness of the screening method using radio receptor assay may be evaluated as an alternative method for detecting antibiotic residues in cow and goat milk using false negative rate, but still not evaluating all parameters.

Keywords : screening test, antibiotics, dairy milk, goat milk, Radio receptor assay

Registered No. : 63(2)-0304-014

^{1/} Milk and Milk Products Quality Control La Laboratory, Bureau of Quality Control of Livestock Products, Department of Livestock Development, Patumthani

^{2/} Veterinary Public Health Laboratory, Bureau of Quality Control of Livestock Products, Department of Livestock Development, Patumthani

บทนำ

ยาปฏิชีวนะตกค้างในนํ้านมยังคงเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขที่มีผลต่อผู้บริโภคทั่วโลก (FAO, 2019) รวมถึงประเทศไทย ยาปฏิชีวนะส่วนใหญ่ที่พบในนมเนื่องจากการใช้อย่างไม่เหมาะสมในการรักษาโรคติดเชื้อในสัตว์ (Zhang H et al. 2009) ยาปฏิชีวนะบางตัวยังถูกนำมาใช้เป็นสารปรุงแต่งอาหารสัตว์ เป็นแหล่งของยาปฏิชีวนะตกค้างในนม (Na lampang et al. 2007) และในบางครั้งการตกค้างของยาปฏิชีวนะเกิดจากการปนเปื้อนยาปฏิชีวนะในอาหารและแหล่งน้ำใช้ (Alebachew et al. 2016) ในประเทศไทยยังคงมีปัญหาด้านจุลชีพตกค้างในนํ้านม ทั้งนี้เนื่องจากเกษตรกรยังมีความเข้าใจเกี่ยวกับอันตรายของยาต้านจุลชีพที่ตกค้างในนํ้านม จึงไม่มีการคัดแยกนํ้านมที่รีดได้จากแม่โคที่ได้รับยาต้านจุลชีพซึ่งจากผลงานวิจัยของ อีรพงศ์ และคณะ (2535) พบยาตกค้างในนํ้านมดิบในถึงรวมของโรงนมร้อยละ 40

กรมปศุสัตว์ ในฐานะที่มีอำนาจหน้าที่ในการตรวจสอบรับรองคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ระบบการผลิต ปศุสัตว์และสินค้าปศุสัตว์ และกระบวนการอื่นที่เกี่ยวข้องในด้านการปศุสัตว์เพื่อให้ได้มาตรฐานและมีความปลอดภัย สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ จึงจำเป็นต้องหาวิธีวิเคราะห์เพื่อคัดกรองสารตกค้างของยาปฏิชีวนะในนํ้านมโคและนมแพะที่เหมาะสม ทั้งจากสหกรณ์โคนมและศูนย์รวบรวมนํ้านมดิบ เพื่อเป็นการเฝ้าระวังความปลอดภัยของผู้บริโภค

วิธีการตรวจแบบคัดกรอง มีหลายแบบ เช่น วิธีทดสอบด้วยเทคนิคทางชีววิทยา วิธีทดสอบด้วยเทคนิคเหล่านี้ไม่มีความจำเพาะ ผลทดสอบระบุได้ในระดับกลุ่มสารเท่านั้น เช่น ฮอร์โมน สารปฏิชีวนะไม่สามารถแยกและระบุชนิดสารแต่ละชนิดในกลุ่มได้ ข้อดีของวิธีนี้คือ สามารถรู้ผลการตรวจได้อย่างรวดเร็ว ชุดทดสอบที่มีการพัฒนาขึ้นจำหน่าย โดยอาศัยหลักการนี้ ได้แก่ Devotest^R-SP (DMS Food Specialties, The Netherlands), AM-test เป็นต้น วิธีทดสอบด้วยเทคนิคทางชีวเคมี วิธีนี้สามารถออกแบบให้มีความจำเพาะตรวจสอบทั้งกลุ่มที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายกัน/เกี่ยวข้องสัมพันธ์กัน หรือแบบเจาะจงสารชนิดเดียวได้ แต่ข้อด้อยก็คือ ถ้าตัวอย่างนํ้านมที่ตรวจสอบมียาต้านจุลชีพชนิดอื่นๆ ที่ไม่จำเพาะกับชุดตรวจก็จะให้ผลทดสอบเป็นลบได้ วิธีทดสอบด้วยเทคนิคนี้ ได้แก่ Latex agglutination test วิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay หรือ ELISA และ Charm II test เป็นต้น วิธีทดสอบด้วยเทคนิคทางฟิสิกส์เคมี วิธีนี้สามารถแยกสูตรโครงสร้างเคมีและลักษณะโมเลกุลของสารที่สนใจได้และสามารถตรวจสอบหลายชนิดในคราวเดียวกันได้ ได้แก่ วิธี Thin-layer หรือ TLC และวิธี HPLC หรือ High-performance liquid chromatography เป็นต้น

วิธีการตรวจแบบคัดกรองด้วยเทคนิค radio receptor assay โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป CHARM®II ชุดทดสอบประกอบด้วย 4 ส่วนคือ 1. Binder ซึ่งมี receptor site ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับยาปฏิชีวนะ 2. Tracer เป็นยาปฏิชีวนะที่ติดฉลากด้วยสารไอโซโทปรังสี เช่น ¹⁴C, ³H เป็นต้น 3. Scintillation fluid เป็นสารละลายอินทรีย์ซึ่งจะเกิดการวาวแสงเมื่อได้รับพลังงานจากการสลายตัวของไอโซโทปรังสีจากสถานะที่ไม่เสถียรของนิวเคลียสไปสู่สถานะที่เสถียร 4. Liquid Scintillation

counter and Luminometer เป็นเครื่องนับจำนวนจุดวาบแสงที่เกิดใน Scintillation fluid ซึ่งจะนับจำนวนจุดวาบแสงที่เกิดขึ้นภายใน 1 นาที (count per minute, cpm) (Charm Sciences, Inc., 2014) อาศัยหลักการของการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจง โดยยาที่อยู่ในตัวอย่างน้ำมันและ tracer จะแย่งกันจับกับ Binder ถ้าในน้ำมันมียาในปริมาณมากก็จะแย่งจับกับ binder ได้มากกว่า Tracer เมื่อนำไปอ่านผลด้วยเครื่อง Liquid Scintillation counter and Luminometer จำนวนจุดวาบแสงที่เกิดจากการสลายตัวของไอโซโทปรังสีของ tracer จะมีจำนวนน้อยในทางกลับกันถ้าในตัวอย่างไม่มียาหรือมีปริมาณน้อย tracer ก็จะแย่งจับกับ binder ได้มากกว่า เมื่อนำไปอ่านผลจำนวนจุดวาบแสงที่เกิดจากการสลายตัวของไอโซโทปรังสีของ tracer จะมีจำนวนมากกว่า

ปัจจุบันกรมปศุสัตว์ สหกรณ์โคนมและศูนย์รวบรวมน้ำมันดิบ ยังคงใช้วิธีตรวจแบบคัดกรองด้วยเทคนิคทางชีวเคมี เช่น Delvotest® SP และ AM-test ซึ่งสามารถรู้ผลการตรวจรวดเร็ว ไม่ยุ่งยาก สามารถนำไปใช้ตรวจสอบภายในฟาร์มหรือนอกห้องปฏิบัติการได้ และค่าใช้จ่ายไม่สูง โดยมีค่าใช้จ่าย Delvotest® SP ราคา 210 บาท/ตัวอย่างและ AM-test ราคา 135 บาท/ตัวอย่าง (ต้นทุนการตรวจวิเคราะห์ กลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ปีงบประมาณ 2562) แต่ไม่สามารถบอกชนิดและปริมาณยาปฏิชีวนะในน้ำมันได้ อีกทั้งมีโอกาสเกิดผลบวกเทียม (false positive) จากสารอื่นที่ไม่ใช่ยาปฏิชีวนะแต่มีฤทธิ์ไปยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (จุไรรัตน์ และคณะ, 2541)

อย่างไรก็ตาม วิธีตรวจคัดกรองยังคงมีความจำเป็น ดังนั้นผู้ศึกษาจึงเห็นความสำคัญในการหาวิธีการตรวจแบบคัดกรองด้วยเทคนิค radio receptor assay โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป CHARM II ซึ่งมีข้อดีคือตรวจยาปฏิชีวนะได้หลายชนิดและสามารถบอกชนิดและปริมาณยาปฏิชีวนะในน้ำมันได้ ข้อจำกัดคือเป็นวิธีตรวจคัดกรองเบื้องต้นต้องอาศัยการตรวจยืนยันด้วยวิธีที่แม่นยำและถูกต้องด้วยเครื่องมือขั้นสูง

กรมปศุสัตว์มีการตรวจเพื่อเฝ้าระวังคุณภาพน้ำมันโคด้านการตกค้างของยาปฏิชีวนะ ในตัวอย่างน้ำมันของศูนย์รวบรวมน้ำมันดิบและสหกรณ์โคนมเป็นประจำทุกเดือนอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้ให้น้ำมันที่นำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยและเป็นไปตามมาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 6003-2553 เรื่อง น้ำมันโคดิบ ซึ่งกำหนดว่าต้องไม่พบยาต้านจุลชีพตกค้างในน้ำมัน และปัจจุบันภาครัฐมีการส่งเสริมการเลี้ยงแพะเพื่อรีดนมและนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์และได้รับความนิยมมากยิ่งขึ้น เนื่องจากน้ำแพะมีคุณค่าทางโภชนาการใกล้เคียงกับนมโค น้ำมันแพะมีไขมันขนาดเล็ก ทำให้ร่างกายสามารถดูดซึมนำไปใช้ประโยชน์ได้ง่ายและรวดเร็ว (สุทธิศักดิ์ และคณะ, 2550) ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยต่อผู้บริโภค สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช.) ได้มีการกำหนดมาตรฐานนมแพะ โดยกำหนดตามมาตรฐานสินค้าเกษตร: มกษ. 6006-2551 เรื่อง น้ำมันแพะดิบ ไว้ว่าต้องไม่พบการปนเปื้อนของยาต้านจุลชีพเช่นกัน

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีทางเลือกในการตรวจคัดกรองการตกค้างของยาปฏิชีวนะในน้ำมันโคและนมแพะ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการเฝ้าระวังยาปฏิชีวนะตกค้างในนมต่อไป

และเป็นแนวทางในการตัดสินใจเลือกวิธีที่มีประสิทธิภาพ แม่นยำ เพื่อให้ห้องปฏิบัติการของศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ และสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์สามารถนำไปใช้ในอนาคตได้

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี

1. อุปกรณ์

1.1 ชุดตรวจ Macrolides ในน้ำนมด้วยหลักการ radio receptor assay (Charm® II macrolide test for raw commingled cow milk, Charm Sciences, Inc., USA) ประกอบด้วย ETBL tablet reagents lot ETBL-031, zero control standard lot ZCS-014B , MRL multi-antimicrobial standard lot MA-034

1.2 ชุดตรวจ Tetracyclines ในน้ำนมด้วยหลักการ radio receptor assay (Charm® II tetracycline test for raw commingled cow milk at MRL, Charm Sciences, Inc., USA) ประกอบด้วย TET2 tablet reagents lot TET2-014D, zero control standard lot ZCS-014B, MRL multi-antimicrobial standard lot MRL017C

1.3 ชุดตรวจ Sulfonamides ในน้ำนมด้วยหลักการ radio receptor assay (Charm® II sulfonamide test for raw commingled cow milk at MRL competitive assay, Charm Sciences, Inc., USA) ประกอบด้วย SULFA tablet reagents lot SULFA-028A, zero control standard lot ZCS-014B, 10 ppb sulfamethazine standard lot SM-043A

1.4 ชุดตรวจ Amphenicols ในน้ำนมด้วยหลักการ radio receptor assay (Charm® II test for chloramphenicol and other amphenicols validated in raw commingled cow milk competitive assay, Charm Sciences, Inc., USA) ประกอบด้วย CAP tablet reagents lot CAP-021C, zero control standard lot ZCS-014B, multi-antimicrobial standard lot MA-034

1.5 หลอดแก้วทดลองชนิดโบโรซิลิเกต ขนาด 13x100 มิลลิเมตร พร้อมจุกปิดหลอดทดลอง

1.6 Cotton swab

2. เครื่องมือ

2.1 ไมโครปิเปต ขนาด 100-500 ไมโครลิตรและ 1-5 มิลลิลิตร

2.2 เครื่องเขย่าผสมสารละลาย (vortex mixer)

2.3 เครื่องปั่นเหวี่ยงสารละลาย (centrifuge)

2.4 Charm® II inctronic incubator

2.5 Charm® II analyzer (Liquid Scintillation counter and Luminometer)

2.6 เครื่อง LC-MS/MS ส่วน HPLC ยี่ห้อ Agilent รุ่น 1260 และส่วน Mass Spectrometer ยี่ห้อ AB SCIEX รุ่น API 3000 หรือ API 4000, HPLC-FD ยี่ห้อ Thermoseparation ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

- 2.7 HPLC column ยี่ห้อ Agilent รุ่น Poroshell 120 EC- C18, Zorbax C18
- 2.8 Syringe Filter ชนิด PVDF, nylon
- 2.9 Solid-Phase Extraction (SPE) ชนิด C18
- 2.10 เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge)
- 2.11 เครื่องระเหยแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน N-evaporator

3. สารเคมี

- 3.1 Trichloroacetic acid (TCA)
- 3.2 Hexane
- 3.3 Methanol
- 3.4 Acetonitrile
- 3.5 Phosphate Buffer Saline (PBS)
- 3.6 Sodium Chloride (NaCl)
- 3.7 Ethyl Acetate
- 3.8 Phosphate buffer
- 3.9 Ammonium Acetate
- 3.10 Deionized water (น้ำ DI)
- 3.11 Oxalic acid
- 3.12 Scintillation fluid

4. สารมาตรฐาน

- 4.1 Olendomycin
- 4.2 Erythromycin A
- 4.3 Tylosin A
- 4.4 Josamycin
- 4.5 Tilmicosin
- 4.6 Oxytetracycline
- 4.7 Tetracycline
- 4.8 Chlortetracycline
- 4.9 Doxycycline
- 4.10 Sulfadiazine (SDZ)
- 4.11 Sulfathiazole (STZ)
- 4.12 Sulfamerazine (SMZ)
- 4.13 Sulfamethazine (SMZ)
- 4.14 Sulfamethoxypyridazine (SMPZ)

4.15 Sulfachloropyridazine (SCP)

4.16 Chloramphenicol

3. ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ

กำหนดขนาดตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างน้ำนมโคและน้ำนมแพะจำนวน 84 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 500 มิลลิลิตร แบ่งเป็นน้ำนมโคจำนวน 60 ตัวอย่างจาก 10 ฟาร์ม น้ำนมแพะจากจังหวัดนนทบุรี จำนวน 24 ตัวอย่าง จาก 4 ฟาร์ม จากพื้นที่จังหวัดลพบุรี นครราชสีมา เพชรบูรณ์ สระแก้ว เนื่องจากมีการเลี้ยงโคนมหนาแน่นในช่วงเดือนเมษายน - มิถุนายน 2560 โดยใช้หลักการของ Guideline for standard method performance requirement (AOAC, 2016) ที่ความน่าจะเป็นที่จะตรวจเจอผลลบ 70% ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จะได้ขนาดตัวอย่างอย่างน้อย 20 ตัวอย่างต่อกลุ่มยา และสุ่มทดสอบโดยใช้วิธี simple random โดยตรวจคัดกรองด้วยชุดทดสอบยาปฏิชีวนะจำนวน 4 กลุ่ม ได้แก่ macrolides tetracyclines amphenicols และ sulfonamides และตรวจยืนยันด้วยเทคนิค LC-MS/MS หรือ HPLC-FD ทุกตัวอย่าง

การเก็บรักษาตัวอย่าง เก็บตัวอย่างน้ำนมโคและนมแพะไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 1-4 องศาเซลเซียส ทำการทดสอบภายใน 5 วันหลังเก็บตัวอย่าง ณ ห้องปฏิบัติการของสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

4. การตรวจคัดกรองการตกค้างของยาปฏิชีวนะในน้ำนม (วิธีทดสอบตามภาคผนวก)

ทำการตรวจคัดกรองการตกค้างของยาปฏิชีวนะในน้ำนมด้วยเทคนิค radio receptor assay โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป Charm[®] II โดยใช้เกณฑ์ตัดสินจากการหาค่า control point (cpm) โดยหากค่า cpm มากกว่า control point ให้รายงานเป็น “ผลลบ”

หากค่า cpm น้อยกว่าหรือเท่ากับ control point แสดงว่าตัวอย่างให้ทดสอบซ้ำตามขั้นตอนปกติแต่เพิ่มตัวอย่างทดสอบเป็น 2 ซ้ำ

ถ้าผลทดสอบทั้ง 2 ซ้ำ ได้ค่า cpm มากกว่า control point รายงานเป็น “ผลลบ”

ถ้าผลทดสอบตั้งแต่ 1 ซ้ำ ได้ค่า cpm น้อยกว่าหรือเท่ากับ control point รายงานเป็น “ผลบวก”

หากค่า cpm อยู่ในช่วงสูงกว่า control point ไม่เกิน 50 cpm ให้วัดค่าซ้ำ หากค่าวัดซ้ำยังคงสูงกว่า control point ให้รายงานเป็น “ผลลบ” แต่ถ้ามีค่าน้อยกว่า control point ให้รายงานเป็น “สงสัยบวก”

5. การตรวจยืนยันการตกค้างของยาปฏิชีวนะในน้ำนม

นำตัวอย่างที่ผลทดสอบด้วยเทคนิค radio receptor assay ให้ผลที่เป็นบวกและสงสัยว่าบวก และตัวอย่างที่ผลเป็นลบ ส่งตรวจยืนยันรวมเป็นจำนวน ณ ห้องปฏิบัติการงานสารตกค้างยาสัตว์และฮอร์โมน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ด้วยเทคนิค Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) สำหรับยาในกลุ่ม

Macrolides, Tetracyclines และ Amphenicols ส่วนยากลุ่ม Sulfonamides ตรวจยืนยันด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection (HPLC-FD)

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ผล positive และ negative โดยคำนวณเป็นอัตราส่วนร้อยละของการพบ

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการทดสอบด้วยเทคนิค radio receptor assay ได้ผล Control point ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เกณฑ์ตัดสินค่ายาปฏิชีวนะในตัวอย่างน้ำนมโคและแพะ

ชนิดตัวอย่าง	ชนิดชุดทดสอบ (ชุดการผลิต)	ความเข้มข้นที่ใช้ในการหา Control point	Control point (cpm)	Control point + 50 (cpm)
น้ำนมโค	Macrolides (ETBL-031)	40 ppb	1182	1232
	Tetracyclines (TET2-014D)	10* ppb	1344	1394
		100** ppb	1052	1102
	Sulfonamides (SULFA-028A)	10 ppb	878	928
	Amphenicol (CAP-021C)	1 ppb	711	761
น้ำนมแพะ	Macrolides (ETBL-031)	40 ppb	1013	1063
	Tetracyclines (TET2-014D)	10 ppb	1390	1440
	Sulfonamides (SULFA-028A)	10 ppb	681	731
	Amphenicol (CAP-021C)	1 ppb	911	961

*ตามเกณฑ์ของ Russian Federation milk import regulation level ** ตามเกณฑ์ EU/CODEX MRL

ก่อนการตรวจคัดกรองต้องมีการควบคุมคุณภาพโดยการอ่านค่า positive control, zero control และทำ spiked sample ได้ค่าดังตารางที่ 2 ซึ่งผลผ่านเกณฑ์การควบคุมคุณภาพทุกหัวข้อสามารถใช้ชุดคัดกรองตรวจตัวอย่างน้ำนมได้

ตารางที่ 2 การควบคุมคุณภาพตัวอย่างควบคุมบวก (positive control) และตัวอย่างควบคุมลบ (zero control) และตัวอย่างที่มีการเติมยา

ชนิดน้ำนม	ชนิดยา	positive control (cpm)	zero control (cpm)	spike		ผลการควบคุม คุณภาพ
				unspiked (cpm)	spiked (cpm)	
น้ำนมโค	Macrolides (40 ppb Erythromycin)	971	1819	1349	804, 749	ผ่าน
	Tetracycline (10 ppb Oxytetracycline)	772	2239	1972	873	ผ่าน
	Tetracycline (100 ppb Oxytetracycline)	752	2050	1972	602	ผ่าน
	Sulfonamides (10 ppb Sulfamethazine)	708	2483	1910	342	ผ่าน
	Sulfonamides (100 ppb Sulfamethazine)	708	2483	1910	436	ผ่าน
	Amphenicols (1 ppb Chloramphenicol)	569	959	1179	567	ผ่าน
น้ำนมแพะ	Macrolides (40 ppb Erythromycin)	946	1897	1873	959, 981, 915, 906, 964, 890	ผ่าน
	Tetracycline (10 ppb Oxytetracycline)	1043	2317	2337	1039	ผ่าน
	Sulfonamides (10 ppb Sulfamethazine)	549	2241	2437	624, 583, 612, 490, 513, 473	ผ่าน
	Amphenicols (1 ppb Chloramphenicol)	729	1120	1157	687, 658, 777, 739, 729, 784	ผ่าน

ตารางที่ 3 ผลการตรวจยาปฏิชีวนะ 4 กลุ่มในตัวอย่างน้ำนมโคด้วยเทคนิค radio receptor assay และยืนยันด้วยเทคนิค LC-MS/MS หรือ HPLC-FD

กลุ่มยา	Radio receptor assay		LC-MS/MS หรือ HPLC-FD	
	ผลบวกและสงสัยบวก	ผลลบ	ผลบวกและสงสัยบวก	ผลลบ
% Macrolides (n = 35)	25.71 (9/35)	74.29 (26/35)	ND (0/9)	ND (0/6)
% Tetracyclines (n = 32)	9.38 (3/32)	90.63 (29/32)	33.33** (1/3)	ND (0/12)
% Sulfonamides* (n = 22)	4.55 (1/22)	95.45 (21/22)	ND (0/1)	ND (0/12)
% Amphenicols (n = 49)	0 (0/49)	100.00 (49/49)	NA (0/0)	ND (0/12)

ND = not detected

NA = not available เนื่องจากไม่มีผลบวกจากการทดสอบด้วยเทคนิค radio receptor assay

* ตรวจยืนยันด้วยเทคนิค HPLC-FD

** พบ Tetracycline 46.3 ppb โดยวิธี LC-MS/MS

ตารางที่ 4 ผลการตรวจยาปฏิชีวนะ 4 กลุ่มในตัวอย่างน้ำมันพะด้วยเทคนิค radio receptor assay และยืนยันด้วยเทคนิค LC-MS/MS หรือ HPLC-FD

กลุ่มยา	Radio receptor assay		LC-MS/MS หรือ HPLC-FD	
	ผลบวกและสงสัยบวก	ผลลบ	ผลบวกและสงสัยบวก	ผลลบ
% Macrolides (n = 21)	47.62 (10/21)	52.38 (11/21)	ND (0/10)	ND (0/10)
% Tetracyclines (n = 21)	0 (0/21)	100.00 (21/21)	NA	ND (0/10)
% Sulfonamides* (n = 21)	0 (0/21)	100.00 (21/21)	NA	ND (0/10)
% Amphenicols (n = 21)	0 (0/21)	100.00 (21/21)	NA	ND (0/10)

ND = not detected

NA = not available เนื่องจากไม่มีผลบวกจากการทดสอบด้วยเทคนิค radio receptor assay

*ตรวจยืนยันด้วยเทคนิค HPLC-FD

ตารางที่ 5 การประเมินประสิทธิภาพผลการตรวจยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมโคด้วยเทคนิค radio receptor assay (RRA) และยืนยันผลด้วยเทคนิค HPLC-FD, LC-MS/MS

		วิธีตรวจคัดกรอง		ประสิทธิภาพของวิธี RRA	
		ผลบวก (RRA)	ผลลบ (RRA)	% False positive	% False negative
วิธีตรวจยืนยัน					
Macrolides	พบสาร	(0/9)	(0/6)	100	0
LC-MS/MS	ไม่พบสาร	(9/9)	(6/6)		
Tetracyclines	พบสาร	(1/3)	(0/12)	66.67	0
LC-MS/MS	ไม่พบสาร	(2/3)	(12/12)		
Sulfonamides	พบสาร	(0/1)	(0/12)	100	0
HPLC-FD	ไม่พบสาร	(1/1)	(12/12)		
Amphenicols	พบสาร	NA	(0/12)	NA	0
LC-MS/MS	ไม่พบสาร	NA	(12/12)		

NA เนื่องจากไม่มีผลบวกจากการทดสอบด้วยเทคนิค เทคนิค radio receptor assay

ตารางที่ 6 การประเมินประสิทธิภาพผลการตรวจยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมแพะด้วยเทคนิค radio receptor assay (RRA) และยืนยันผลด้วยเทคนิค HPLC-FD, LC-MS/MS

		วิธีตรวจคัดกรอง		ประสิทธิภาพของวิธี RRA	
		ผลบวก (RRA)	ผลลบ (RRA)	% False positive	% False negative
วิธีตรวจยืนยัน					
Macrolides	พบสาร	(0/10)	(0/10)	100	0
LC-MS/MS	ไม่พบสาร	(10/10)	(10/10)		
Tetracyclines	พบสาร	NA	(0/10)	NA	0
LC-MS/MS	ไม่พบสาร	NA	(10/10)		
Sulfonamides	พบสาร	NA	(0/10)	NA	0
HPLC-FD	ไม่พบสาร	NA	(10/10)		
Amphenicols	พบสาร	NA	(0/10)	NA	0
LC-MS/MS	ไม่พบสาร	NA	(10/10)		

NA เนื่องจากไม่มีผลบวกจากการทดสอบด้วยเทคนิค เทคนิค radio receptor assay

ในการศึกษาครั้งนี้ทำการตรวจคัดกรองการตกค้างของยาปฏิชีวนะกลุ่ม Macrolides, Tetracyclines, Sulfonamides และ Amphenicols ในน้ำนมโคและน้ำนมแพะด้วยเทคนิค radio receptor assay พบว่าเมื่อนำตัวอย่างน้ำนมมาตรวจคัดกรองยาปฏิชีวนะจำนวน 4 กลุ่มข้างต้น ผลการตรวจพบว่ายาปฏิชีวนะกลุ่ม Macrolides ในตัวอย่างน้ำนมโคมากที่สุดคิดเป็น 25.71% (9/35) รองลงมาได้แก่กลุ่ม Tetracyclines 9.38% (3/32) Sulfonamides 4.55% (1/22) แต่ไม่พบยาปฏิชีวนะกลุ่ม Amphenicols ในขณะที่น้ำนมแพะพบยาปฏิชีวนะกลุ่ม Macrolides เพียงชนิดเดียวคิดเป็น 47.62% (10/21) รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 3 และ 4 เมื่อนำตัวอย่างน้ำนมมาตรวจยืนยันด้วยวิธี LC-MS/MS หรือ HPLC-FD พบว่าตัวอย่างน้ำนมโค พบผลบวกในยาปฏิชีวนะกลุ่ม Tetracyclines คิดเป็น 3.33% (1/3) ส่วนยาในกลุ่มอื่นให้ผลลบทั้งหมด ส่วนตัวอย่างน้ำนมแพะให้ผลลบทั้งหมด (ตารางที่ 5, 6) ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างน้ำนมทั้งในโคและในแพะมีการตกค้างของยาปฏิชีวนะจากการตรวจคัดกรองด้วยเทคนิค radio receptor assay ซึ่งผลบวกที่ได้จากการตรวจอาจให้ผลเป็นผลบวกแท้ (true positive) หรือ ผลบวกเทียม (false positive) ทำให้ผลบวกที่ตรวจพบจำเป็นต้องได้รับการยืนยันด้วยเทคนิคที่มีความน่าเชื่อถืออื่นๆ เช่น LC-MS/MS หรือ HPLC-FD

ในการศึกษาเบื้องต้นครั้งนี้มีการนำตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วยการตรวจคัดกรอง ไปตรวจยืนยันด้วย LC-MS/MS หรือ HPLC-FD เพื่อหาอัตราผลลบแท้ (true negative) และ ผลลบเทียม (false negative) จากผลการทดลอง ไม่พบอัตราผลลบเทียม ในทุกกลุ่มยา คือ Macrolides, Tetracycline, Sulfonamides และ Amphenicols ทั้งน้ำนมโคและน้ำนมแพะ (ตารางที่ 5, 6) แสดงให้เห็นว่าในเบื้องต้นชุดตรวจคัดกรองด้วยเทคนิค radio receptor assay มีประสิทธิภาพสอดคล้องกับการศึกษาของ Gustavsson E. and Sternesjo, ในปี 2004 และเป็นไปตามแนวมติคณะกรรมการยุโรป 2002/657/EC ที่กำหนดว่าการตรวจคัดกรองต้องมีผลไม่สอดคล้องกับเกณฑ์ (ผลลบเทียม) ไม่เกินร้อยละ 5 โดยต้องมีเอกสารยืนยันหรือสืบค้นได้ว่าผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีแล้ว อย่างไรก็ตาม Kroll และคณะ (2000) พบอัตราผลลบลวงสูงถึงร้อยละ 40 ในกรณีที่น้ำนมโคมีจำนวนเซลล์โซมาติกสูง ดังนั้นในการศึกษาเพื่อคัดเลือกชุดตรวจคัดกรองจึงจำเป็นต้องตรวจสอบคุณภาพน้ำนมเสมอ โดยเฉพาะจำนวนเซลล์โซมาติก ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ตัวอย่างน้ำนมโคมีค่าโซมาติกเซลล์อยู่ในช่วง 2,000 – 438,000 เซลล์/มิลลิลิตร ซึ่งอยู่ในช่วงไม่เกิน 1,000,000 เซลล์/มิลลิลิตร ตามที่ระบุไว้ในชุดทดสอบ

อัตราผลบวกเทียมของชุดตรวจคัดกรองยาปฏิชีวนะด้วยเทคนิค radio receptor assay ในน้ำโคและน้ำนมแพะครั้งนี้ พบอัตราผลบวกเทียมตั้งแต่ร้อยละ 66.67 ถึงร้อยละ 100 ทั้งในน้ำนมโคและแพะ ดังแสดงใน

ตารางที่ 5 และ 6 โดยตัวอย่างน้ำนมโคที่ให้ผลบวกต่อยาปฏิชีวนะกลุ่ม Tetracycline ณ ระดับที่ชุดตรวจคัดกรองแจ้งไว้คือ 10 ppb จำนวน 3 จาก 32 ตัวอย่าง (ร้อยละ 9.38) เมื่อยืนยันด้วยวิธี LC-MS/MS พบยา Tetracycline เพียงชนิดเดียวใน 1 ตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 46.3 ppb อย่างไรก็ตามเนื่องจากวิธีตรวจยืนยันมีขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of quantitation: LOQ) ที่ 20 ppb จึงไม่เหมาะสมสำหรับตรวจยืนยันชุดตรวจคัดกรองชุดนี้ อัตราผลบวกเทียมที่ได้จึงอาจสูงมาร้อยละ 66.67 สำหรับ ยากลุ่ม Tetracyclines ในน้ำนมโค ร้อยละ 100 สำหรับยากลุ่ม Macrolides และ Sulfonamides ในน้ำนมโค ส่วนน้ำนมแพะพบอัตราผลบวกเทียมร้อยละ 100 ในยากลุ่ม Macrolides เช่นกัน ดังนั้นจึงไม่ควรนำอัตราผลบวกเทียมมาประเมินประสิทธิภาพชุดตรวจคัดกรองสำหรับยากลุ่ม Tetracyclines ในน้ำนมโค จนกว่าจะมีวิธีตรวจยืนยันที่มี LOQ ต่ำกว่า 10 ppb มาใช้ทดสอบ

สำหรับอัตราผลบวกเทียมของชุดตรวจคัดกรองเมื่อทดสอบยากลุ่ม Macrolides, Sulfonamides และ Amphenicols ที่สูงนั้น อาจเนื่องจากจำนวนตัวอย่างไม่เพียงพอต่อการประเมินประสิทธิภาพชุดตรวจคัดกรอง โดย guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (CRLs, 2010) และ ISO 18330: 2003 milk and milk products-guideline for the standardized description of immunoassays or receptor assays for the detection of antimicrobial residues แนะนำดังนี้ หากทดสอบที่ความน่าจะเป็นที่จะตรวจเจอผลเป็นลบไม่น้อยกว่าร้อยละ 90 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ต้องใช้ตัวอย่างน้ำนม ไม่น้อยกว่า 60 ตัวอย่างต่อการทดสอบ 1 กลุ่มยาปฏิชีวนะ ทำให้ต้องใช้งบประมาณสูงซึ่งเป็นข้อจำกัดประการหนึ่งของการศึกษาเบื้องต้นครั้งนี้

สรุปผลการทดลอง

ผลทดสอบด้วยเทคนิค radio receptor assay น้ำนมโคและน้ำนมแพะให้ผลที่เป็นบวกและสงสัยว่าบวก จำนวน 23 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่ผลเป็นลบจำนวน 199 ตัวอย่าง ส่งตรวจยืนยันผลบวกรวมเป็นจำนวน 23 ตัวอย่าง ผลลบจำนวน 82 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) สำหรับยากลุ่ม Macrolides Tetracyclines และ Amphenicols ส่วนยากลุ่ม Sulfonamides ตรวจยืนยันด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection (HPLC-FD)

ผลการศึกษาพบว่า การทดสอบด้วยชุดตรวจคัดกรองด้วยเทคนิค radio receptor assay ไม่พบผลลบเทียมในทุกกลุ่มยาปฏิชีวนะทั้งในน้ำโคและน้ำนมแพะ ซึ่งสอดคล้องกับเกณฑ์มติคณะกรรมการยายุโรป

2002/657/EC ที่กำหนดให้มียาปฏิชีวนะตกค้างกับเกณฑ์ไม่เกิน 5 % สำหรับผลบวกเทียมพบยังไม่สามารถประเมินได้

การศึกษาครั้งนี้ เป็นการศึกษเบื้องต้น อาจประเมินประสิทธิภาพชุดตรวจคัดกรองด้วยเทคนิค radio receptor assay เพื่อใช้เป็นวิธีทางเลือกในการตรวจยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมโคและน้ำนมแพะได้โดยการใช้อัตราผลบวกเทียม

ข้อเสนอแนะ

สำหรับพารามิเตอร์ที่สำคัญในการประเมินประสิทธิภาพชุดตรวจคัดกรอง ได้แก่ การหาความจำเพาะ และการประเมินความสามารถในการตรวจวัดยาปฏิชีวนะ ณ ระดับที่แจ้งไว้ในชุดตรวจคัดกรองในการศึกษาครั้งนี้ ได้ผล ดังนี้

การตรวจหาความจำเพาะ คือการหาความสามารถของชุดตรวจคัดกรองในการจำแนกยาปฏิชีวนะที่ตรวจหาออกจากยาชนิดอื่นหรือสารอื่นในตัวอย่าง ตามมติคณะกรรมาธิการยุโรป 2002/657/EC สามารถทำได้โดยการเติมยาปฏิชีวนะตัวอื่นที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับยาที่สนใจหรือมีโอกาสพบ (ใช้ความเข้มข้นประมาณ 10 เท่าของ MRLหรือของระดับการตรวจวัดที่แจ้งไว้ในชุดตรวจคัดกรอง) ลงในตัวอย่างแล้วนำมาทดสอบด้วยชุดตรวจคัดกรอง ซึ่งไม่ควรมียาผลบวกเกิดขึ้น และการตรวจหาผลบวกเทียมคือร้อยละของผลบวกเมื่อทดสอบตัวอย่างที่เป็นลบ สามารถทำได้โดยใช้ตัวอย่างที่เป็นลบ ซึ่งผ่านการเตรียมและตรวจยืนยันผลลบแล้ว (milk free from antimicrobials หรือ negative milk) มาตรวจด้วยชุดคัดกรองแล้วหาร้อยละของผลบวกเทียม จำนวนตัวอย่างที่เหมาะสมให้พิจารณาตามหลักสถิติ โดยทั่วไปนิยมตั้งความน่าจะเป็นที่ตรวจแล้วให้ผลเป็นลบประมาณร้อยละ 90 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จะใช้ตัวอย่างเพื่อทดสอบอย่างน้อย 60 ตัวอย่างขึ้นไป การศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ใช้ milk free from antimicrobials มาทดสอบตามแนวทางข้างต้น จึงไม่สามารถประเมินได้ตามเกณฑ์นี้

การประเมินความสามารถในการตรวจวัดยาปฏิชีวนะ ณ ระดับที่แจ้งไว้ในชุดตรวจคัดกรอง โดยใช้ 10 - 20 ตัวอย่างต่อระดับความเข้มข้นที่ทดสอบ เพื่อให้มีข้อมูลเพียงพอต่อการประเมิน ซึ่งมีแนวทางการประเมินหลายแบบด้วยกัน เช่น การประเมินโดยนิยาม จะทดสอบ 2 ความเข้มข้น ที่สูงกว่าและต่ำกว่าระดับความเข้มข้นที่คาดว่าจะให้ผลบวกร้อยละ 95 หรือประเมินตามระดับแจ้งไว้ในชุดตรวจคัดกรองหรือตาม maximum residue limit (MRL) โดยกำหนดเป็น screening target concentration (STC) คือใช้ positive control sample ที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นมาแล้ว ดังนี้

STC ที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.5 MRL ให้ทดสอบอย่างน้อย 20 ตัวอย่าง โดยมีผลไม่ผ่านเกณฑ์ได้ไม่เกิน 1 ตัวอย่าง ถือว่าชุดตรวจคัดกรองสามารถตรวจวัดได้ที่ระดับต่ำกว่า 0.5 MRL

STC ที่ระดับมากกว่า 0.5 ถึงไม่เกิน 0.9 MRL ให้ทดสอบอย่างน้อย 40 ตัวอย่าง โดยมีผลไม่ผ่านเกณฑ์ได้ไม่เกิน 2 ตัวอย่าง ถือว่าชุดตรวจคัดกรองสามารถตรวจวัดได้ที่ระดับต่ำกว่า MRL

STC ระดับมากกว่า 0.9 MRL ให้ทดสอบอย่างน้อย 60 ตัวอย่าง โดยมีผลไม่ผ่านเกณฑ์ได้ไม่เกิน 3 ตัวอย่าง ถือว่าชุดตรวจคัดกรองสามารถตรวจวัดได้ที่ระดับ MRL

ชุดตรวจคัดกรองด้วยเทคนิค radio receptor assay ที่นำมาศึกษาครั้งนี้ ออกแบบมาเพื่อใช้กับน้ำนมโคเท่านั้น การนำมาใช้ตรวจคัดกรองยาปฏิชีวนะในน้ำนมแพะจึงต้องตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (method validation) ก่อน บางครั้งอาจจำเป็นต้องปรับสภาพตัวอย่างน้ำนมก่อนนำมาทดสอบเพื่อให้มีความแม่นยำ ความเที่ยงและความจำเพาะตามเกณฑ์การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (Beltran et al., 2013)

นอกจากนี้ ยังต้องศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความคงสภาพของน้ำยาชุดทดสอบ ความแตกต่างระหว่างชุดการผลิตของชุดตรวจคัดกรอง การเข้าร่วมกิจกรรมทดสอบความชำนาญเพื่อประกันคุณภาพการตรวจคัดกรอง เป็นต้น

การศึกษาเบื้องต้นครั้งนี้ อาจนำไปใช้ประเมินประสิทธิภาพชุดตรวจคัดกรองด้วยเทคนิค radio receptor assay โดยใช้อัตราผลลบเทียม เพื่อศึกษาวิธีทางเลือกในการตรวจคัดกรองการตกค้างของยาปฏิชีวนะในน้ำนมโคและนมแพะได้

การประเมินความสามารถในการตรวจวัดยาปฏิชีวนะ ณ ระดับที่แจ้งไว้ในชุดตรวจคัดกรองควรมีการเพิ่มจำนวนตัวอย่างเพื่อให้มีข้อมูลเพียงพอต่อการประเมิน คำนึงถึงข้อพึงระวังในการตรวจคัดกรองแต่ละวิธี นอกจากนี้ ยังต้องศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความคงสภาพของน้ำยาชุดทดสอบ ความแตกต่างระหว่างชุดการผลิตของชุดตรวจคัดกรอง การเข้าร่วมกิจกรรมทดสอบความชำนาญเพื่อประกันคุณภาพการตรวจคัดกรอง เป็นต้น

การนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาครั้งนี้ถือเป็นแนวทางในการนำวิธีการตรวจคัดกรองยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนม โดยการตรวจคัดกรองด้วยเทคนิค radio receptor assay โดยเฉพาะยาปฏิชีวนะในกลุ่ม Amphenicols ซึ่งไม่สามารถคัดกรองได้ด้วยชุดทดสอบ AM-test หรือ Delvotest ที่ใช้ในปัจจุบัน และนำมาใช้ในการคัดกรองเพื่อให้ทราบกลุ่มยาปฏิชีวนะตกค้างหากผลทดสอบจากการคัดกรองด้วย AM-test หรือ Delvotest เป็นบวก เพื่อนำไปยืนยันด้วยวิธี HPLC หรือ LC-MS/MS ซึ่งเป็นวิธีที่มีความแม่นยำ ถูกต้อง สามารถระบุชื่อชนิดยาได้อย่างถูกต้องและสามารถวัดปริมาณยาได้ในระดับความเข้มข้นที่สนใจ ต่อไป

ตัวอย่างน้ำนมที่ศึกษาในครั้งนี้ได้จากการสุ่มเก็บตัวอย่างจากฟาร์มโคนมและฟาร์มแพะ พบมีการตกค้างของยาปฏิชีวนะ tetracycline จากการตรวจคัดกรองและตรวจยืนยัน ทำให้ตระหนักได้ว่าในฟาร์มโคนมนั้นอาจยังมีการตกค้างของยาปฏิชีวนะในฟาร์ม และสำหรับกลุ่มยาที่ตรวจพบด้วยการตรวจคัดกรองด้วย

เทคนิค radio receptor assay เช่น ยากลุ่ม Macrolides, Tetracycline และ Sulfonamides ในน้ำนม และ ยากลุ่ม Macrolides ในน้ำนมแพะ ควรมีการเฝ้าระวังต่อไป

ควรส่งเสริมให้มีระบบเฝ้าระวังสารตกค้างทั้งในรายฟาร์มและรายถังรวม อีกทั้งควรมีการเฝ้าระวังยาปฏิชีวนะกลุ่มอื่นๆ เช่น ยากลุ่ม Beta lactam และ Cephalosporins เนื่องจากในปัจจุบันการเลี้ยงโคนมหรือการเลี้ยงแพะมีการนำยาปฏิชีวนะกลุ่มนี้มาใช้กันอย่างแพร่หลาย รวมไปถึงจนถึงการขยายขอบเขตการเฝ้าระวังการตกค้างของยาปฏิชีวนะในน้ำนมหรือผลิตภัณฑ์นมอื่นๆ เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคมากยิ่งขึ้น อีกทั้งควรมีการพัฒนาและเลือกวิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสมกับการปฏิบัติงานในพื้นที่ที่มีความจำเพาะ ความไว และความแม่นยำมากขึ้น ศูนย์รวมนมหรือหน่วยงานที่ใช้วิธีตรวจคัดกรองควรทำการประเมินประสิทธิภาพของวิธีให้มีความถูกต้อง แม่นยำ และเหมาะสมต่อการใช้งาน ควรหาวิธีตรวจคัดกรองแบบอื่นที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพสูงสุด ควรตรวจพารามิเตอร์อื่นที่เป็นข้อควรระวังในวิธีคัดกรองที่เลือกใช้ด้วย เช่น จำนวนโซมาติกเซลล์ จำนวนจุลินทรีย์ในน้ำนม ความเป็นกรด-ด่าง ในน้ำนมร่วมด้วยเนื่องจากอาจทำให้เกิด false negative และ false positive ได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ น.สพ.วรวิทย์ วราอัสวปติ ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ และเจ้าหน้าที่ทดสอบกลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ทุกท่านที่ช่วยให้การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้สำเร็จได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2561. หลักเกณฑ์การคัดเลือกและประเมินชุดทดสอบและน้ำยาทาง

ห้องปฏิบัติการด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์:

<https://www.plandmsc.com/planinformation/planinform/171-dmsc-evtkrules.html>,

20 มกราคม 2563.

จุไรรัตน์ รุ่งโรจน์ารักษ์. 2541. ชุดทดสอบยาตกค้างในนมและผลิตภัณฑ์นม. วารสารกรมวิทยา

ศาสตร์การแพทย์ 40 (2): 209-220.

ธงชัย เฉลิมชัยกิจ เกรียงศักดิ์ พูนสุข มณฑล เลิศวรปรีชา เกรียงศักดิ์ แดงพรหม กิตติกร โชติสกุลรัตน์. 2546.

การพัฒนาชุดตรวจสอบยาต้านจุลชีพตกค้างในน้ำนมและเนื้อสัตว์. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.).

ณัฐธิดา สุขสาย ณัฐพร รัฐบาลรุ่ง พักตร์วิภา สุวรรณพรหม และหทัยกาญจน์ เขาวนพูนผล. 2559. การใช้ยาปฏิชีวนะในฟาร์มปศุสัตว์: กรณีศึกษาจังหวัดเชียงใหม่. วารสารเภสัชกรรมไทย. 8(2): 282-294.

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. 2553. มาตรฐานสินค้าเกษตร: น้ำนมโคดิบ มกษ. 6003-2553. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. 2551. มาตรฐานสินค้าเกษตร: น้ำนมแพะดิบ มกษ. 6006-2551. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สุจิตตรา พงศ์วิวัฒน์. 2555. คู่มือการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบตามแนวมติคณะกรรมการยุโรป 2002/657/EC สำหรับห้องปฏิบัติการทดสอบด้านสารตกค้างยาสัตว์ วิธียืนยันผลและคัดกรอง. สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์. กรมปศุสัตว์.

สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์ สุวรรณ สุภิมาศ กัลยา เลาสงคราม สายวรุฬ ชัยวานิชศิริ รมณี สงวนดีกุล. 2550. การศึกษาสมบัติพื้นฐานทางด้านเคมี กายภาพ และจุลชีววิทยาของน้ำนมแพะจากแหล่งต่างๆ: รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์การพัฒนานมแพะสู่ชุมชน. ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Alebachew T Lamessa J. Ayichew T. Abebaw G. Review on chemical and drug residue in meat. World J Agric Sci. 2016 12 196-204.

Althaus, R. Torres, A. Peris, C. Beltran, M. C. Fernandez, N. and Molina, M.P. 2003. Accuracy of BRT and Delvotest microbial inhibition tests as affected by composition of ewe's milk. J. Food. Prot. 64(8): 473-476.

AOAC, 2016. Guideline for standard method performance requirements. AOAC official methods of analysis. Appendix F, P. 12.

CHARM SCIENCES Inc. 2014. Charm®II test for chloramphenicol and other amphenicols validated in raw commingled cow milk. In: Operator's Manual. Lawrence, Massachusetts, USA. 1-7.

CHARM SCIENCES Inc. 2014. Charm®II Beta-lactam test for cow milk at MRL (Maximum residue limit). In: Operator's Manual. Lawrence, Massachusetts, USA. 1-6.

CHARM SCIENCES Inc. 2014. Charm®II Macrolide test for raw commingled and Pasteurized cow milk. In: Operator's Manual. Lawrence, Massachusetts, USA. 1-6.

CHARM SCIENCES Inc. 2014. Charm®II test sulfonamide test for raw commingled cow milk at MRL (Maximum residue limit). In: Operator's Manual. Lawrence, Massachusetts, USA. 1-6.

CHARM SCIENCES Inc. 2014. Charm®II tetracycline test for raw commingled cow milk at MRL (Maximum residue limit). In: Operator's Manual. Lawrence, Massachusetts, USA. 1-6.

- Gustavsson, E. and Sternesjo, A. 2004. Biosensor analysis of B-lactams in milk: Comparison with microbiological, immunological, and receptor-based screening methods. Article (PDF Available) in Journal of AQAC International. 87(3). 614-20
- Na lampang K, Chongsuvivatwong V, Kitikoon V. 2007. Pattern and determinant of antibiotics used on dairy farms in Songkhla province, Southern Thailand. Trop Anim Health Prod. 39(5): 355–61.
- Navratiova, P. 2008. Screening methods used for the detection of veterinary drug residues in raw cow milk- A Review. Czech J. Food Sci. 26(6): 393-401.
- Zhang H, Ren Y, Bao X. 2009. Simultaneous determination of (fluoro) quinolones antibacterials residues in bovine milk using ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. J Pharm Biomed Anal. 49(2): 367–74.

ภาคผนวก

a. การตรวจการตกค้างของยาในกลุ่ม macrolides ในน้ำนมโคและน้ำนมแพะโดยใช้ชุดทดสอบ Charm® II macrolide test for raw commingled cow milk มีขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียมสารมาตรฐาน นำ MRRL tablet reagents (green และ white tablet) ออกจากตู้แช่แข็ง โดยสามารถเก็บไว้ใช้งานที่อุณหภูมิห้องได้นานถึง 12 ชั่วโมง
2. การเตรียม zero control standard โดยละลายในน้ำอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดี เก็บไว้ในตู้เย็นหรือแช่บนถาดน้ำแข็ง สามารถใช้งานได้ 72 ชั่วโมงหลังเตรียม
3. การเตรียม positive control standard นำ MRL multi-antimicrobial standard ซึ่งมี erythromycin 40 ppb ละลายใน 50 mL zero control standard หรือ macrolide/lincosamide-free milk แล้วเขย่าให้เข้ากัน แช่เย็น สามารถใช้งานได้ 48 ชั่วโมงหลังเตรียม
4. การหา control point จากการหาค่าเฉลี่ยของการอ่าน count per minute ของ zero control standard จำนวน 6 ซ้ำ โดยต้องไม่มีค่าหนึ่งค่าใดที่แตกต่างจากค่าเฉลี่ยเกิน 15 % หากมีค่าที่เกินต้องทดสอบเพิ่มเพื่อทดแทนค่านั้น จนทุกค่าอยู่ในช่วงไม่เกิน 15 % แล้วหาค่าเฉลี่ยใหม่ ค่าที่ได้ เรียกว่า zero control average นำค่านี้ไปลบออก 35 % ของ zero control average จะได้ค่า control point
5. การทวนสอบประจำวันก่อนการทดสอบ โดยแต่ละวันต้องมีการทดสอบที่ให้ผลลบอย่างน้อย 1 การทดสอบและผลลบอย่างน้อย 1 การทดสอบ เพื่อตรวจสอบว่าอุปกรณ์ สารเคมีและค่า control point ยังใช้งานได้
6. ขั้นตอนการทดสอบตัวอย่างน้ำนมโคและน้ำนมแพะ
 - 6.1 ใส่ white reagent tablet (binder) ลงในหลอดแก้วทดลอง ปิดเต้าน้ำบริสุทธิ์ปริมาณ

300±100 ไมโครลิตรใส่ลงไป เขย่าและผสมสารให้เข้ากันด้วย vortex mixer นานอย่างน้อย 10 วินาที

6.2 ปิเปตตัวอย่างน้ำนมปริมาตร 5±0.25 มิลลิลิตรลงไป ผสมให้เข้ากันโดยเขย่าขึ้นลง 10 รอบ เป็นเวลา 10 วินาที

6.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

6.4 เติม green reagent tablet ลงไป ผสมให้เข้ากันโดยเขย่าขึ้นลง 10 รอบ เป็นเวลา 10 วินาที (ขั้นตอนนี้ทำให้เสร็จภายใน 40 วินาที)

6.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

6.6 จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,400 รอบต่อนาที นาน 3 นาที หลังจากนั้นให้เทน้ำนมออกทันที โดยคว่ำหลอดลง อาจใช้ cotton swab เช็ดคราบไขมันออก

6.7 ใช้ cotton swab เช็ดคราบไขมันออกและเช็ดให้แห้ง ระวังไม่ให้โดนตะกอน

6.8 ปิเปตน้ำบริสุทธิ์ปริมาตร 300±100 ไมโครลิตรใส่ลงไป เขย่าให้ตะกอนละลาย

6.9 เติม 3.0±0.5 มิลลิลิตร scintillation fluid ปิดจุกหลอดทดลองแล้วเขย่าจนได้สารผสมมีสีขุ่นสม่ำเสมอ

6.10 นำไปเข้าเครื่อง Charm® II analyzer อ่านค่าใน [¹⁴C] channel เป็นเวลา 60 วินาที หากค่า count per minute (cpm) หากค่าอยู่ในช่วง +50 จาก control point ให้วัดค่าใหม่

6.11 การแปลผล

หากค่า cpm มากกว่า control point ให้รายงานเป็น “ผลลบ”

หากค่า cpm น้อยกว่าหรือเท่ากับ control point แสดงว่าตัวอย่างให้

ผลทดสอบเป็น “สงสัยบวก” จำเป็นต้องทดสอบเพิ่มเติม

6.12 การทดสอบเพื่อตัดสิน “สงสัยบวก”

6.13 ให้ทดสอบซ้ำตามขั้นตอนปกติแต่เพิ่มตัวอย่างทดสอบเป็น 2 ซ้ำ ทั้งนี้ผลการทวนสอบประจำวันก่อนการทดสอบต้องใช้งานได้ปกติ

6.14 ถ้าผลทดสอบทั้ง 2 ซ้ำ ได้ค่า cpm มากกว่า control point รายงานเป็น “ผลลบ”

6.15 ถ้าผลทดสอบตั้งแต่ 1 ซ้ำ ได้ค่า cpm น้อยกว่าหรือเท่ากับ control point รายงานเป็น “ผลบวก”

b. การตรวจการตกค้างของยาในกลุ่ม tetracyclines ในน้ำนมโคและน้ำนมแพะโดยใช้ชุดทดสอบ Charm® II tetracycline test for raw commingled cow milk at MRL มีขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียมสารมาตรฐาน นำ TET2 tablet reagents (orange และ white tablet) ออกจากตู้แช่แข็งโดยสามารถเก็บไว้ใช้งานที่อุณหภูมิห้องได้นานถึง 12 ชั่วโมง

2. การเตรียม zero control standard โดยละลายในน้ำอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดี เก็บไว้ในตู้เย็นหรือแช่บนถาดน้ำแข็ง สามารถใช้งานได้ 72 ชั่วโมงหลังเตรียม

3. การเตรียม positive control standard นำ MRL multi-antimicrobial standard ซึ่งมี

oxytetracycline 100 ppb ละลายใน 50 mL zero control standard หรือ tetracycline drug-free milk แล้วเขย่าให้เข้ากัน แช่เย็น สามารถใช้งานได้ 48 ชั่วโมงหลังเตรียม

4. การหา control point จากการหาค่าเฉลี่ยของการอ่าน count per minute ของ positive control standard จำนวน 6 ซ้ำ โดยต้องไม่มีค่าหนึ่งค่าใดที่แตกต่างจากค่าเฉลี่ยเกิน 15 % หากมีค่าที่เกิน ต้องทดสอบเพิ่มเพื่อทดแทนค่าที่เกิน จนทุกค่าอยู่ในช่วงไม่เกิน 15 % แล้วหาค่าเฉลี่ยใหม่ ค่าที่ได้ เรียกว่า zero control average นำค่านี้ไปบวกเพิ่ม 40 % ของ zero control average จะได้ค่า control point

การหาค่า control point เพื่อคัดกรองที่ระดับ Russian Federation milk import regulation 10 ppb โดยหาค่าเฉลี่ยของการอ่าน count per minute ของ zero control standard จำนวน 6 ซ้ำ หรือหาค่าเฉลี่ยของการอ่าน count per minute ของ positive control standard จำนวน 3 ซ้ำ โดยต้องไม่มีค่าหนึ่งค่าใดที่แตกต่างจากค่าเฉลี่ยเกิน 15 % หากมีค่าที่เกินต้องทดสอบเพิ่มเพื่อทดแทนค่าที่เกิน จนทุกค่าอยู่ในช่วงไม่เกิน 15 % แล้วหาค่าเฉลี่ยใหม่ ค่าที่ได้ เรียกว่า zero control average นำค่านี้ไปบวกเพิ่ม 40 % ของ zero control average จะได้ค่า control point

5. การทวนสอบประจำวันก่อนการทดสอบ โดยแต่ละวันต้องมีการทดสอบที่ให้ผลบวกอย่างน้อย 1 การทดสอบและผลลบอย่างน้อย 1 การทดสอบ เพื่อตรวจสอบว่าอุปกรณ์ สารเคมีและค่า control point ยังใช้งานได้

6. ขั้นตอนการทดสอบตัวอย่างน้ำนมโคและน้ำนมแพะ

6.1 ใส่ white reagent tablet (binder) ลงในหลอดแก้วทดลอง ปิดเต้าน้ำบริสุทธิ์ปริมาตร 300 ± 100 ไมโครลิตรใส่ลงไป เขย่าและผสมสารให้เข้ากันด้วย vortex mixer นานอย่างน้อย 10 วินาที

6.2 ปิดเต้าตัวอย่างน้ำนมปริมาตร 5 ± 0.25 มิลลิลิตรลงไป ผสมให้เข้ากันโดยเขย่าขึ้นลง 10 รอบ เป็นเวลา 10 วินาที

6.3 เติม orange tablet reagents ลงไป ผสมให้เข้ากันโดยเขย่าขึ้นลง 10 รอบ เป็นเวลา 10 วินาที (ขั้นตอนนี้ทำให้เสร็จภายใน 40 วินาที)

6.4 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที

6.5 จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,400 รอบต่อนาที นาน 5 นาที หลังจากนั้นให้เทน้ำนมออกทันที โดยคว่ำหลอดลง อาจใช้ cotton swab เช็ดคราบไขมันออก

6.6 ใช้ cotton swab เช็ดคราบไขมันออกและเช็ดให้แห้ง ระวังไม่ให้โดนตะกอน

6.7 ปิดเต้าน้ำบริสุทธิ์ปริมาตร 300 ± 100 ไมโครลิตรใส่ลงไป เขย่าให้ตะกอนละลาย

6.8 เติม 3.0 ± 0.5 มิลลิลิตร scintillation fluid ปิดจุกหลอดทดลองแล้วเขย่าจนได้สารผสมมีสีขุ่นสม่ำเสมอ

6.9 นำไปเข้าเครื่อง Charm® II analyzer อ่านค่าใน [³H] channel เป็นเวลา 60 วินาที หากค่า count per minute (cpm) หากค่าอยู่ในช่วง +50 จาก control point ให้วัดค่าใหม่

6.10 การแปลผล

หากค่า cpm มากกว่า control point ให้รายงานเป็น “ผลลบ”

หากค่า cpm น้อยกว่าหรือเท่ากับ control point แสดงว่าตัวอย่างให้ผลทดสอบเป็น “สงสัยบวก” จำเป็นต้องทดสอบเพิ่มเติม

6.11 การทดสอบเพื่อตัดสิน “สงสัยบวก” ทดสอบที่ EU/CODEX MRL ผสมตัวอย่างน้ำนมกับ zero control ในอัตราส่วน 1:2 ผสมให้เข้ากัน กรณีทดสอบที่ระดับ Russian Federation milk import regulation ไม่ต้องผสมตัวอย่างน้ำนมกับ zero control

6.12 ถ้าผลทดสอบทั้ง 2 ซ้ำ ได้ค่า cpm มากกว่า control point รายงานเป็น “ผลลบ”

6.13 ถ้าผลทดสอบตั้งแต่ 1 ซ้ำ ได้ค่า cpm น้อยกว่าหรือเท่ากับ control point รายงานเป็น “ผลบวก”

c. การตรวจการตกค้างของยาในกลุ่ม amphenicols ในน้ำนมโคและน้ำนมแพะโดยใช้ชุดทดสอบ Charm® II test for chloramphenicol and other amphenicols validated in raw commingled cow milk competitive assay มีขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียมสารมาตรฐาน นำ CAP tablet reagents (black และ white tablet) ออกจากตู้แช่แข็งโดยสามารถเก็บไว้ใช้งานที่อุณหภูมิห้องได้นานถึง 12 ชั่วโมง

2. การเตรียม zero control standard โดยละลายในน้ำอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดี เก็บไว้ในตู้เย็นหรือแช่น้ำแข็ง สามารถใช้งานได้ 72 ชั่วโมงหลังเตรียม เก็บที่ -15 องศาเซลเซียส สามารถใช้งานได้ 2 เดือนหลังเตรียม ก่อนใช้ต้องทำให้เย็นที่ 0-4.5 องศาเซลเซียส

3. การเตรียม positive control standard นำ MRL multi-antimicrobial standard ซึ่งมี chloramphenicol 1 ppb ละลายใน 100 mL zero control standard หรือ s chloramphenicol -free milk แล้วเขย่าให้เข้ากัน เก็บที่ -15 องศาเซลเซียส สามารถใช้งานได้ 2 เดือนหลังเตรียม ก่อนใช้ต้องแช่ในตู้เย็น 15 นาที

4. การหา control point จากการหาค่าเฉลี่ยของการอ่าน count per minute ของ positive control standard จำนวน 6 ซ้ำ โดยต้องไม่มีค่าหนึ่งค่าใดที่แตกต่างจากค่าเฉลี่ยเกิน 25 % หากมีค่าที่เกินต้องทดสอบเพิ่มเพื่อทดแทนค่านั้น จนทุกค่าอยู่ในช่วงไม่เกิน 25% แล้วหาค่าเฉลี่ยใหม่ ค่าที่ได้ เรียกว่า positive average นำค่านี้ไปบวกเพิ่ม 25% ของ control average จะได้ค่า control point

5. การทวนสอบประจำวันก่อนการทดสอบ โดยแต่ละวันต้องมีการทดสอบที่ให้ผลบวกอย่างน้อย 1 การทดสอบและผลลบอย่างน้อย 1 การทดสอบ เพื่อตรวจสอบว่าอุปกรณ์ สารเคมีและค่า control point ยังใช้งานได้

6. ขั้นตอนการทดสอบตัวอย่างน้ำนมโคและน้ำนมแพะ

6.1 ใส่ white reagent tablet (binder) ลงในหลอดแก้วทดลอง ปิเปตน้ำบริสุทธิ์ปริมาตร 300 ± 100 ไมโครลิตรใส่ลงไป เขย่าและผสมสารให้เข้ากันด้วย vortex mixer นานอย่างน้อย 10 วินาที

6.2 ปิเปตตัวอย่างน้ำนมปริมาตร 1 ± 0.05 มิลลิลิตรลงไป ตัวอย่างน้ำนมควรมีอุณหภูมิ 4 ± 2 องศาเซลเซียส

6.3 เติม green tablet reagents ลงไป ผสมให้เข้ากันโดยเขย่าขึ้นลง 10 รอบ เป็นเวลา 10 วินาที (ขั้นตอนนี้ทำให้เสร็จภายใน 40 วินาที)

6.4 ใส่ black tablet reagents ลงไป เขย่าและผสมสารให้เข้ากันด้วย vortex mixer นานอย่างน้อย 10 วินาที

6.5 นำไปแช่ใน ice bath ที่อุณหภูมิ 2 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที

6.6 จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,400 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ห้ามเทน้ำมันออก

6.7 ให้ใช้ค้อนๆนำส่วน skim ที่อยู่ใต้ชั้นไขมันออกมา 300 ไมโครลิตร โดยไม่ให้โดนตะกอน

6.8 ปีเติม 3.0 ± 0.5 มิลลิลิตร scintillation fluid ปิดจุกหลอดทดลองแล้วเขย่าจนได้สารผสมมีสีขุ่นสม่ำเสมอ

6.9 นำไปเข้าเครื่อง Charm® II analyzer อ่านค่าใน [^3H] channel เป็นเวลา 60 วินาที หากค่า count per minute (cpm) หากค่าอยู่ในช่วง +50 จาก control point ให้วัดค่าใหม่

6.10 การแปลผล

หากค่า cpm มากกว่า control point ให้รายงานเป็น “ผลลบ”

หากค่า cpm น้อยกว่าหรือเท่ากับ control point แสดงว่าตัวอย่างให้ผลทดสอบเป็น “สงสัยบวก” จำเป็นต้องทดสอบเพิ่มเติม

6.11 การทดสอบเพื่อตัดสิน “สงสัยบวก” ทดสอบที่ EU MRL ผสมตัวอย่างน้ำมันกับ zero control ในอัตราส่วน 1:9 ผสมให้เข้ากัน กรณีทดสอบที่ระดับ EU MRL ผสมตัวอย่างน้ำมันกับ zero control ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากัน

6.12 ถ้าผลทดสอบทั้ง 2 ซ้ำ ได้ค่า cpm มากกว่า control point รายงานเป็น “ผลลบ”

6.13 ถ้าผลทดสอบตั้งแต่ 1 ซ้ำ ได้ค่า cpm น้อยกว่าหรือเท่ากับ control point รายงานเป็น “ผลบวก”

d. การตรวจการตกค้างของยาในกลุ่ม sulfonamides ในน้ำมันโคและน้ำมันแพะโดยใช้ชุดทดสอบ Charm® II sulfonamide test for raw commingled cow milk at MRL competitive assay มีขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียมสารมาตรฐาน นำ SULFA tablet reagents (pink และ white tablet) ออกจากตู้แช่แข็งโดยสามารถเก็บไว้ใช้งานที่อุณหภูมิห้องได้นานถึง 12 ชั่วโมง

2. การเตรียม zero control standard โดยละลายในน้ำอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดี เก็บไว้ในตู้เย็นหรือแช่บนภาคน้ำแข็ง สามารถใช้งานได้ 72 ชั่วโมงหลังเตรียม

3. การเตรียม positive control standard นำ MRL multi-antimicrobial standard ซึ่งมี sulfamethazine 10 ppb ละลายใน 100 mL zero control standard หรือ sulfa drug-free milk แล้วเขย่าให้เข้ากัน แช่เย็น สามารถใช้งานได้ 48 ชั่วโมงหลังเตรียม

4. การหา control point จากการหาค่าเฉลี่ยของการอ่าน count per minute ของ positive control standard จำนวน 6 ซ้ำ โดยต้องไม่มีค่าหนึ่งค่าใดที่แตกต่างจากค่าเฉลี่ยเกิน 15 % หากมีค่าที่เกิน ต้องทดสอบเพิ่มเพื่อทดแทนค่าที่เกิน จนทุกค่าอยู่ในช่วงไม่เกิน 15 % แล้วหาค่าเฉลี่ยใหม่ ค่าที่ได้ เรียกว่า zero control average นำค่านี้ไปบวกเพิ่ม 24 % ของ control average จะได้ค่า control point

5. การทวนสอบประจำวันก่อนการทดสอบ โดยแต่ละวันต้องมีการทดสอบที่ให้ผลบวกอย่างน้อย 1 การทดสอบและผลบวกอย่างน้อย 1 การทดสอบ เพื่อตรวจสอบว่าอุปกรณ์ สารเคมีและค่า control point ยังใช้งานได้

6. ขั้นตอนการทดสอบตัวอย่างน้ำมันโคและน้ำมันแพะ

6.1 ใส่ white reagent tablet (binder) ลงในหลอดแก้วทดลอง ปิเปตน้ำบริสุทธิ์ปริมาตร 300 ± 100 ไมโครลิตรใส่ลงไป เขย่าและผสมสารให้เข้ากันด้วย vortex mixer นานอย่างน้อย 10 วินาที

6.2 ปิเปตตัวอย่างน้ำมันปริมาตร 5 ± 0.25 มิลลิลิตรลงไป ผสมให้เข้ากันโดยเขย่าขึ้นลง 10 รอบ เป็นเวลา 10 วินาที

6.3 เติม pink tablet reagents ลงไป ผสมให้เข้ากันโดยเขย่าขึ้นลง 15 รอบ เป็นเวลา 15 วินาที (ขั้นตอนนี้ทำให้เสร็จภายใน 40 วินาที)

6.4 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 85 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที

6.5 จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,400 รอบต่อนาที นาน 3 นาที หลังจากนั้นให้น้ำมันออกทันที โดยคว่ำหลอดลง อาจใช้ cotton swab เช็ดคราบไขมันออก

6.6 ใช้ cotton swab เช็ดคราบไขมันออกและเช็ดให้แห้ง ระวังไม่ให้โดนตะกอน

6.7 ปิเปตน้ำบริสุทธิ์ปริมาตร 300 ± 100 ไมโครลิตรใส่ลงไป เขย่าให้ตะกอนละลาย

6.8 เติม 3.0 ± 0.5 มิลลิลิตร scintillation fluid ปิดจุกหลอดทดลองแล้วเขย่าจนได้สารผสม มีสีขุ่นสม่ำเสมอ

6.9 นำไปเข้าเครื่อง Charm® II analyzer อ่านค่าใน [^3H] channel เป็นเวลา 60 วินาที หากค่า count per minute (cpm) หากค่าอยู่ในช่วง +50 จาก control point ให้วัดค่าใหม่

6.10 การแปลผล

หากค่า cpm มากกว่า control point ให้รายงานเป็น “ผลลบ”

หากค่า cpm น้อยกว่าหรือเท่ากับ control point แสดงว่าตัวอย่างให้ผลทดสอบเป็น “สงสัยบวก” จำเป็นต้องทดสอบเพิ่มเติม

6.11 การทดสอบเพื่อตัดสิน “สงสัยบวก” ทดสอบที่ EU MRL ผสมตัวอย่างน้ำมันกับ zero control ในอัตราส่วน 1:9 ผสมให้เข้ากัน กรณีทดสอบที่ระดับ EU MRL ผสมตัวอย่างน้ำมันกับ zero control ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากัน

6.12 ถ้าผลทดสอบทั้ง 2 ซ้ำ ได้ค่า cpm มากกว่า control point รายงานเป็น “ผลลบ”

6.13 ถ้าผลทดสอบตั้งแต่ 1 ซ้ำ ได้ค่า cpm น้อยกว่าหรือเท่ากับ control point รายงาน
เป็น “ผลบวก