Agricultural Sci. J. 33 : 6 (Suppl.) : 376-379 (2002) **ว. วิทย. กษ. 33 : 6 (พิเศษ) : 376-379 (2545)**

ประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบยาต้านจุลชีพตกค้างในเนื้อสัตว์ "CM-Test"

Efficiency of Antimicrobial Residue Screening Test Kit for Meat "CM-Test"

ธงชัย เฉลิมชัยกิจ[1] เกรียงศักดิ์ พูนสุข[1] เกรียงศักดิ์ แดงพรหม[1]
มณฑล เลิศวรปรีชา[1] และ กิตติกร โชติสกุลรัตน์[1]
Thongchai Chalermchaikit[1], Kriengsak Poonsook[1], Kriengsuk Dangprom[1],
Monthon Lertworapreecha[1] and Kittikorn Jotisakulratana[1]

Abstract

The concerns of antimicrobial residues in food of animal origins are not only the adverse health effect to consumers but also the impact on exportation. The conventional methods for detecting antimicrobial residues in meat are European Four Plate Test (EFPT) method which use *Bacillus subtilis* and *Micrococcus luteus* in Test agar or Microbial Inhibition Disk Assay (MIDA) which use *Bacillus mycoides, Bacillus subtilis* and *Micrococcus luteus* in Antibiotic medium as indicators. However, EFPT and MIDA are required incubating time at least 18 hours for reading the results. Besides, EFPT and MIDA have been showed low specificity, which lead to false negative results. Therefore, antimicrobial screening test kit for meat has been developed by the full support from Thai Research Fund (TRF). The concept of new developed antimicrobial screening test kit (CM-Test) is tube diffusion method. There are consisted of *Bacillus stearothermophilus* in appropriated medium, which contained in polypropylene tube (1 x 4 cm). The tested results can be read after the meat extract supernatant of 0.1 ml is put into the test kit and incubated at 65±1 °C for 3½ -4½ hours. The color of test kit will not be changed if the sample is positive (contain antimicrobial residue). If the sample is negative, test kit color will be changed to yellow. The prevalence of antimicrobial residues in 300 chicken meat samples and 300 pork samples, randomly purchased from markets and supermarkets in Bangkok during July 2001 to February 2002, had been studied. The results of chicken meat samples were found positive 12.3, 0 and 1.7% by using CM-Test, EFPT and MIDA methods, respectively. The results of pork samples were found positive 8.3, 2 and 2.7% by using CM-Test, EFPT and MIDA methods, respectively. Positive samples were confirmed by Charm II Test™ method. These results reveal that the detection limits developed antimicrobial residue screening test kit are better than conventional methods, EFPT and MIDA.

Keywords: Antimicrobial, Residues, Meat, Test kit

บทคัดย่อ

การตกค้างของสารต้านจุลชีพในอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากสัตว์ นอกจากทำให้ผู้บริโภคเกิดความไม่มั่นใจในความปลอดภัยแล้ว ยังมีผลกระทบโดยตรงต่อการส่งออกเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากสัตว์ ทั้งนี้วิธีการตรวจสอบหาสารต้านจุลชีพตกค้างที่ห้องปฏิบัติการตรวจคุณภาพเนื้อสัตว์ใช้ในปัจจุบันคือ วิธี European Four Plate Test (EFPT) ซึ่งใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* และ *Micrococcus luteus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Test agar หรือวิธี Microbial Inhibition Disk Assay (MIDA) ซึ่งใช้เชื้อ *Bacillus mycoides, Bacillus subtilis* และ *Micrococcus luteus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Antibiotic medium เป็นตัวทดสอบ ทั้งนี้วิธี EFPT และ MIDA ต้องใช้เวลาในการอบเพาะเชื้อนาน 18 ชั่วโมง จึงจะสามารถอ่านการตรวจสอบได้ นอกจากนี้ EFPT และ MIDA ยังมีความจำเพาะ (Specificity) ค่อนข้างต่ำจึงมักเกิดผลลบเท็จ ดังนั้นจึงได้มีการวิจัยและพัฒนาชุดตรวจสอบสารต้านจุลชีพตกค้างในเนื้อสัตว์ขึ้นโดยความสนับสนุนของสำนักงาน กองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และให้ชื่อว่าชุดตรวจ "CM-Test" หลักการของชุดตรวจสอบเป็น Tube Diffusion Method ประกอบด้วยสปอร์ของแบคทีเรีย *Bacillus stearothermophilus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อำนวยต่อการซึมผ่านของสารต้านจุลชีพและบรรจุอยู่ในหลอดพลาสติคขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 ซม. สูง 4 ซม. เมื่อหยอดสารสกัดจากตัวอย่างเนื้อลงไปในชุดตรวจสอบ 0.1 มล. แล้วนำไปอบเพาะที่อุณหภูมิ 65±1 องศาเซลเซียส จะสามารถอ่านผลได้ภายใน 3½ -4½ ชั่วโมง ถ้าสีของชุดตรวจสอบเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแสดงว่าตัวอย่างไม่มีสารต้านจุลชีพตกค้างอยู่ แต่ถ้าสีของชุดตรวจสอบยังคงเป็นสีม่วงแสดงว่ามีสารต้านจุลชีพตกค้าง จากการศึกษาหาความชุกของยาต้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างเนื้อไก่ 300 ตัวอย่าง และเนื้อสุกร 300 ตัวอย่าง จากตลาดสดและซุปเปอร์มาร์เก็ตในเขตกรุงเทพมหานคร ระหว่างเดือนกรกฎาคม พ.ศ.

[1] Development of Antimicrobial Screening Test kit for Meat and Food of Animal Origin Project, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330.
Phone : 218-9586, 218-9671 Facsimile : 218-9587 e-mail : thongchai.c@chula.ac.th.

2544 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2545 ด้วยชุดตรวจสอบ CM-Test วิธีการ EFPT และ MIDA พบว่าสามารถตรวจพบยาตกค้าง 12.3, 0 และ 1.7% ตามลำดับในตัวอย่างเนื้อไก่ ส่วนตัวอย่างเนื้อสุกรตรวจพบ 8.3, 2 และ 2.7% ตามลำดับ ตัวอย่างที่พบสารต้านจุลชีพตกค้างได้ทำการตรวจสอบยืนยันด้วยวิธี Charm II Test™ แสดงว่าชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นใหม่มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบหายาต้านจุลชีพตกค้างได้ดีกว่าวิธีการ EFPT และ MIDA

คำสำคัญ: สารต้านจุลชีพ, สารตกค้าง, เนื้อ, ชุดตรวจสอบ

คำนำ

การป้องกันแก้ไขปัญหายาต้านจุลชีพตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากสัตว์เป็นความสนใจและความตระหนักร่วมของหน่วยงานรัฐและเอกชนที่เกี่ยวข้องกับการคุ้มครองผู้บริโภคและโดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมการปศุสัตว์เพื่อการส่งออก เนื่องจากการตกค้างของยาต้านจุลชีพในอาหารอาจมีผลข้างเคียงต่อผู้บริโภค ดังจะเห็นได้จากสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมได้กำหนดระบบการควบคุมการใช้ยาสำหรับสัตว์ในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ตามมอก.7001-2540 และกรมปศุสัตว์ได้มีการดำเนินการรับรองมาตรฐานฟาร์มเลี้ยงสัตว์ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่องมาตรฐานฟาร์มเลี้ยงสัตว์ของประเทศไทย พ.ศ. 2542 ในส่วนภาคเอกชนโดยเฉพาะอย่างยิ่งฟาร์มปศุสัตว์เพื่อการส่งออกก็มีมาตรการในการป้องกันยาต้านจุลชีพตกค้างในเนื้อสัตว์ เช่น ทำการเปลี่ยนสูตรอาหารในระยะสุดท้ายเป็นอาหารที่ปลอดยาต้านจุลชีพ เป็นต้น ทั้งนี้แม้มีมาตรการต่างๆ ดังกล่าวแล้วก็ยังคงต้องมีการตรวจสอบยาต้านจุลชีพตกค้างในเนื้อสัตว์ก่อนสู่ผู้บริโภคหรือการส่งออกไปยังประเทศคู่ค้าเพื่อความมั่นใจว่าเนื้อสัตว์เหล่านั้นปลอดจากยาต้านจุลชีพจริง นอกจากนี้ฟาร์มปศุสัตว์ส่วนใหญ่ยังมีมาตรการตรวจสอบยาต้านจุลชีพตกค้างในเนื้อล่วงหน้า 7 วัน ก่อนส่งโรงงานฆ่าสัตว์

วิธีการในการตรวจสอบหายาต้านจุลชีพในเนื้อสัตว์ที่ใช้อยู่ในปัจจุบันคือ วิธี European Four Plate Test (EFPT) โดยการตัดชิ้นเนื้อตัวอย่างวางลงบนจานเพาะเชื้อและทำการอ่านผลหลังจากการอบเพาะจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง หรือใช้วิธี Microbial Inhibition Disk Assay (MIDA) ซึ่งต้องทำการสกัดยาต้านจุลชีพจากตัวอย่างเนื้อด้วย Citrate buffer solution และใช้แผ่นกระดาษกรองเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร จุ่มสารสกัดแล้ววางลงบนจานเพาะเชื้อ 4 ชนิด คล้ายกับวิธี EFPT ทั้งนี้วิธี MIDA ต้องใช้เวลาในการอบเพาะนานเช่นเดียวกับวิธี EFPT จึงทำการอ่านผล ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาชุดตรวจสอบยาต้านจุลชีพตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์อาหารจากสัตว์เช่น ชุดตรวจสอบ Delvotest-SP^{R}, Charm Farm Test^{R} และ AIM-96^{R} เป็นต้น ซึ่งสามารถรู้ผลการตรวจได้ภายใน 3½ -4½ ชั่วโมง และมีความสามารถในการตรวจสอบยาต้านจุลชีพได้ดีกว่าวิธี EFPT และ MIDA แต่ชุดตรวจสอบดังกล่าวยังไม่เป็นที่นิยมใช้กันเนื่องจากมีราคาค่อนข้างสูง ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ดำเนินการวิจัยและพัฒนาชุดตรวจสอบสารต้านจุลชีพตกค้างในเนื้อสัตว์ขึ้นซึ่งอาศัยหลักการ Tube diffusion method และตั้งชื่อชุดตรวจสอบว่า “CM-Test”

รายงานการวิจัยในส่วนนี้เป็นข้อมูลการใช้ชุดตรวจสอบ “CM-Test” ในการตรวจหาความชุกของยาต้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างเนื้อไก่และตัวอย่างเนื้อสุกรที่จำหน่ายในตลาดและซุปเปอร์มาร์เก็ตในเขตกรุงเทพมหานครโดยทำการศึกษาเปรียบเทียบกับวิธีการ EFPT และ MIDA

อุปกรณ์และวิธีการ

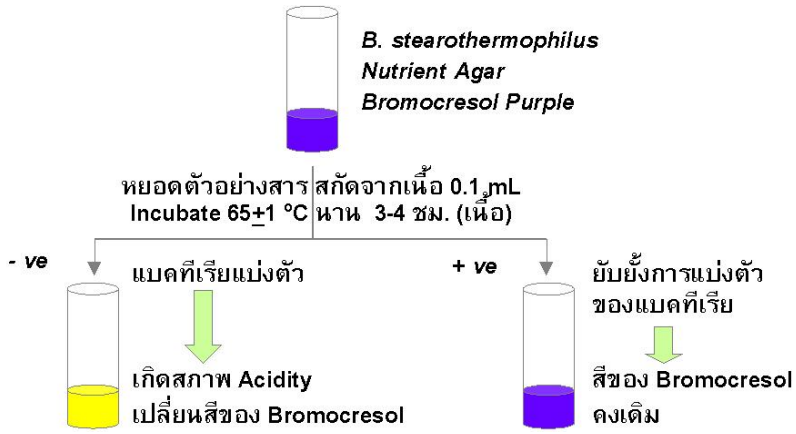
(1) ตัวอย่างเนื้อไก่และเนื้อสุกร

ทำการสุ่มตัวอย่างเนื้อไก่และเนื้อสุกรจากตลาดสด 5 แห่ง และซุปเปอร์มาร์เก็ต 4 แห่ง ในเขตกรุงเทพมหานคร ในช่วงเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2544 ถึงกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2545 ให้ได้จำนวนตัวอย่างเนื้อไก่รวม 300 ตัวอย่าง และตัวอย่างเนื้อสุกรรวม 300 ตัวอย่าง

(2) วิธีการตรวจสอบหายาต้านจุลชีพตกค้าง

(2.1) ชุดตรวจสอบยาต้านจุลชีพ “CM-Test”

ประกอบด้วยสปอร์ของแบคทีเรีย *Bacillus stearothermophilus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมและอำนวยต่อการซึมผ่านของสารต้านจุลชีพและการเจริญเติบโตของสปอร์โดยบรรจุอยู่ในหลอดพลาสติค (Polypropylene) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 ซม. สูง 4 ซม. เมื่อหยอดสารสกัดจากตัวอย่างเนื้อลงไปในชุดตรวจสอบ 0.1 มล. (ทำการสกัดตัวอย่างเนื้อโดยการตีปั่นชิ้นเนื้อ 5 กรัมกับน้ำกลั่น 5 มล.) แล้วนำไปอบเพาะที่อุณหภูมิ 65±1 °ซ จะสามารถอ่านผลได้ภายใน 3½ -4½ ชั่วโมง ถ้าสีของชุดตรวจสอบเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแสดงว่าตัวอย่างไม่มีสารต้านจุลชีพตกค้างอยู่ แต่ถ้าสีของชุดตรวจสอบยังคงเป็นสีม่วงแสดงว่ามีสารต้านจุลชีพตกค้าง (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 หลักการของชุดตรวจสอบเบื้องต้น "CM-Test"

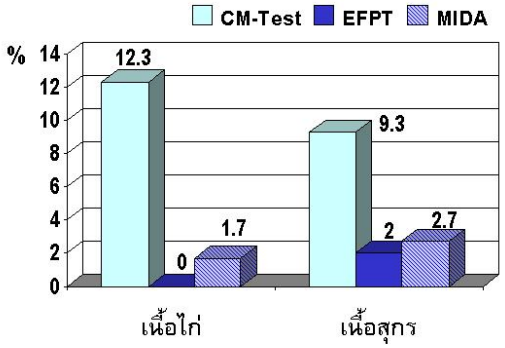
(2.2) European Four Plate Test (EFPT) (Okerman *et al.*, 1998) เป็นวิธีการตรวจสอบหา ยาต้านจุลชีพตกค้างในเนื้อเยื่อโดยใช้หลักการ Microbial inhibition plate assay ทำการทดสอบโดยตัดชิ้นเนื้อตัวอย่างให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 8 มม. และมีความหนาประมาณ 4-6 มม. วางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ใน Test agar pH 6.0, 7.2 และ 8.0 และ *Micrococcus luteus* ใน Test agar pH 8.0 ทำการอ่านผลหลังจากอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง ตัวอย่างที่มี Inhibition zone (หรือ Clear zone) ขนาดเกิน 2 มม. จากขอบชิ้นเนื้อแสดงว่ามียาต้านจุลชีพตกค้าง

(2.3) Microbial Inhibition disk assay (MIDA) (ดวงดาว, 2543) เป็นวิธีการทดสอบโดยใช้กระดาษกรองเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 ซม. จุ่มสารสกัดตัวอย่างเนื้อ (ทำการสกัดตัวอย่างเนื้อด้วย Citric Acid-Acetone Buffer) แล้ววางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ *Micrococcus luteus* ใน Antimicrobial test media 5 (AM 5), *Bacillus subtilis* ใน AM 5 และ *Bacillus mycoides* ใน AM 8 ทำการอ่านผลหลังจากอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง ตัวอย่างที่มี Inhibition zone (หรือ Clear zone) ขนาดเกิน 2 มม. จากขอบกระดาษกรองแสดงว่ามียาต้านจุลชีพตกค้าง

(2.4) Charm-II Test™ (Charm 7600 System, Charm Science Inc., U.S.A.) เป็นวิธีการตรวจสอบยืนยันกลุ่มยาต้านจุลชีพโดยใช้หลักการ Microbial receptor assay (Charm II Test, 1995) ซึ่งในการศึกษานี้ทำการทดสอบยาต้านจลชีพ 3 กลุ่ม คือ Beta-lactams, Tetracyclines และ Sulfonamides ในตัวอย่างเนื้อไก่และสุกรที่ให้ผลบวกจากวิธีการตรวจสอบเบื้องต้นด้วย CM-Test, EFPT และ MIDA

ผลและวิจารณ์

ชุดตรวจสอบ "CM-Test" สามารถตรวจพบการตกค้างของยาต้านจุลชีพในตัวอย่างเนื้อไก่ได้ 12.3% (37 ตัวอย่าง) ซึ่งดีกว่าการใช้วิธี EFPT และ MIDA มาก เนื่องจาก 2 วิธีหลังสามารถตรวจพบการตกค้างของยาต้านจุลชีพในตัวอย่างเนื้อไก่เดียวกันได้ 0 และ 1.7% (5 ตัวอย่าง) ตามลำดับ เช่นเดียวกับการตรวจหาการตกค้างของยาต้านจุลชีพในตัวอย่างเนื้อสุกร "CM-Test" สามารถตรวจพบการตกค้างของยาต้านจุลชีพในตัวอย่างเนื้อสุกรได้ 9.3% (28 ตัวอย่าง) ในขณะที่วิธีการ EFPT และ MIDA สามารถตรวจพบการตกค้างของยาต้านจุลชีพในตัวอย่างเนื้อสุกรเดียวกันได้ 2% (6 ตัวอย่าง) และ 2.7% (8 ตัวอย่าง) ตามลำดับ (ภาพที่ 2) แสดงว่าชุดตรวจสอบ "CM-Test" มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบหายาต้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างเนื้อไก่และเนื้อสุกรได้ดีกว่าวิธีการ EFPT และ MIDA เมื่อทำการตรวจสอบยืนยันตัวอย่างเนื้อไก่และเนื้อสุกรที่ให้ผลบวกจากการตรวจด้วย "CM-Test" โดยวิธี Charm-II Test™ เพื่อตรวจสอบว่าเป็นกลุ่มยา Beta-lactams, Tetracyclines และ/หรือ Sulfonamides พบว่าเป็นการตกค้างของยาต้านจุลชีพในกลุ่ม Sulfonamides 58.6 และ 38.1% ในตัวอย่างเนื้อไก่และเนื้อสุกร ตามลำดับ และยาในกลุ่ม Tetracyclines ร่วมกับ Sulfonamides ในตัวอย่างเนื้อสุกร 52.4% ทั้งนี้ตัวอย่างที่ตรวจไม่พบกลุ่มยาดังกล่าวอาจอนุมานได้ว่าเป็นกลุ่มยาอื่นนอกซึ่งไม่ได้ทำการตรวจ เช่น ยาในกลุ่ม Aminoglycosides, Fluoroquinolones, Lincosamides และ Macrolides เป็นต้น ทั้งนี้ความชุกของยาต้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างเนื้อไก่และเนื้อสุกรจากผลการศึกษานี้ พบว่าต่ำกว่าในปี พ.ศ. 2541 มากซึ่งเป็นการสำรวจด้วยชุดตรวจสอบ "KS-9S" โดยตรวจพบยาต้านจุลชีพตกค้างถึง 26 และ 52% ในตัวอย่างเนื้อไก่และเนื้อสุกรที่สุ่มจากตลาดในเขตกรุงเทพมหานคร ตามลำดับ (เกรียงศักดิ์ และคณะ, 2543) แนวโน้มของการตกค้างของยาต้านจุลชีพที่ลดลงน่าจะเนื่องจากได้มีการรณรงค์การใช้ยาต้านจุลชีพในการเลี้ยงสัตว์อย่างเหมาะสมรอบคอบเพิ่มขึ้น รวมทั้งผู้ประกอบการฟาร์มคงมีเข้าใจดีขึ้นในเรื่องการหยุดยาก่อนจำหน่ายสัตว์ออกจากฟาร์ม



ภาพที่ 2 เปอร์เซ็นต์การตรวจพบยาต้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างเนื้อไก่ (300 ตัวอย่าง) และเนื้อสุกร (300 ตัวอย่าง) จากตลาดสดและซุปเปอร์มาร์เก็ตในเขตกรุงเทพมหานครระหว่างเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2544 - กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2545 โดยใช้ชุดตรวจ CM-Test เปรียบเทียบกับวิธี EFPT และ MIDA

สรุป

ชุดตรวจสอบหายาต้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างเนื้อเบื้องต้น “CM-Test” มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบหายาต้านจุลชีพตกค้างในตัวอย่างเนื้อไก่และเนื้อสุกรได้ดีกว่าวิธีการ EFPT และ MIDA ซึ่งใช้ในการตรวจสอบเบื้องต้นในปัจจุบัน นอกจากนี้ชุดตรวจสอบ “CM-Test” ยังมีค่าใช้จ่ายที่ถูกกว่าและสามารถรู้ผลการตรวจได้รวดเร็วกว่า

คำขอบคุณ

ขอขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ได้ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย และรศ.น.สพ.ดร. เกรียงศักดิ์ สายธนู ผู้เริ่มการวิจัยและพัฒนาชุดตรวจสอบยาต้านจุลชีพตกค้างในน้ำนมและเนื้อสัตว์ในประเทศไทย รวมทั้งเจ้าหน้าที่และนิสิตในห้องปฏิบัติการของศูนย์ติดตามการดื้อยาฯ คณะสัตว-แพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

เกรียงศักดิ์ สายธนู, ธงชัย เฉลิมชัยกิจ และ ศศิธร คณะรัตน์. 2543. ความสามารถของ “เคเอส-9เอส” ในการตรวจสอบสารต้านจุลชีพในเนื้อไก่และสุกร. ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 26 (15-17 พ.ย. 2543). จัดโดยสัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์ ณ โรงแรม มิราเคิล แกรนด์ กรุงเทพฯ. หน้า 255-262.

ดวงดาว วงศ์สมมาตร์. 2543. Sample examination method for antibiotic residues in livestock and marine food product. กองอาหาร. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (ติดต่อส่วนตัว).

Charm II Test for Beta-lactams in Tissue, Serum, and Urine. 1995. Charm Sciences Inc. Operator’s Manual: 3-5,7-9.

Okerman L., J. van Hoof and W. Debeuckelaere. 1998. Evaluation of the European four-plate test as a tool for screening antibiotic residues in meat samples from retail outlets. JAOAC. 81(1): 51-6.