บทที่ 3

วิธีการดำเนินการศึกษา

การดำเนินการศึกษาการตรวจหายาปฏิชีวนะตกค้างในนมพาสเจอร์ไรซ์และนมยู เอช ที ประกอบด้วยเนื้อหาดังต่อไปนี้

1. รูปแบบการศึกษา
2. กลุ่มตัวอย่าง และวิธีคัดเลือกตัวอย่าง
3. เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา
4. การหาคุณภาพของเครื่องมือ
5. การเก็บรวบรวมข้อมูลและสถิติที่ใช้
6. วิธีการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

1. รูปแบบการศึกษา

ในการตรวจหายาปฏิชีวนะตกค้างในนมพาสเจอร์ไรซ์และนมยู เอช ทีในครั้งนี้เป็นการศึกษาเชิงสำรวจ (survey research) โดยทำการเก็บตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรซ์และนมยู เอช ที ที่วางจำหน่ายจากห้างสรรพสินค้าและร้านค้าทั่วไป ในเขตเทศบาลเมือง จังหวัดลำปาง

2. กลุ่มตัวอย่าง และวิธีการคัดเลือกตัวอย่าง

2.1 กลุ่มตัวอย่าง

นมพาสเจอร์ไรซ์และนมยู เอช ที ชนิดจืด จากผู้ผลิต 4 และ 5 ราย ตามลำดับ (ซึ่งเป็นผู้ผลิตทั้งหมดที่วางจำหน่ายตามห้าง สรรพสินค้าและร้านค้าทั่วไป ในเขตเทศบาลเมือง จังหวัดลำปาง) สุ่มตัวอย่างนมทั้งสองชนิดจำนวน 5 ตัวอย่างต่อสัปดาห์ต่อราย เป็นเวลา 4 สัปดาห์ติดต่อกัน ในเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2543 รวมตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรซ์และนมยู เอช ที ทั้งหมด 80 และ 100 ตัวอย่าง ตามลำดับ เก็บตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรซ์และนมยู เอช ที ใส่ขวดแก้วขนาดบรรจุ

100 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ประมาณ 50-75 มิลลิลิตร เก็บในถังน้ำแข็งที่มีอุณหภูมิ 0-4 °C แล้วทำการตรวจหายาปฏิชีวนะตกค้างภายใน 24 ชั่วโมง ในกรณีที่ไม่สามารถทำการตรวจสอบได้ภายใน 24 ชั่วโมง ให้เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ –20 °C แล้วปล่อยให้ละลายที่อุณหภูมิห้องก่อนการตรวจสอบ

2.2 วิธีคัดเลือกตัวอย่าง

ทำการสุ่มร้านค้าแบบสุ่มอย่างง่าย (simple random sampling) สัปดาห์ละ 5 ร้าน จากทั้งหมด 17 ร้าน (มีนมพาสเจอร์ไรซ์และนมยู เอช ที วางจำหน่ายครบผู้ผลิตทั้ง 4 และ 5 ราย ตามลำดับ) แล้วสุ่มตัวอย่างนมทั้งสองชนิดที่วางจำหน่ายอยู่ในร้านที่สุ่มได้นั้น โดยใน 1 สัปดาห์ จะได้นมพาสเจอร์ไรซ์ 20 ตัวอย่าง จากผู้ผลิต 4 ราย และได้นมยู เอช ที 25 ตัวอย่างจากผู้ผลิต 5 ราย เมื่อเก็บตัวอย่างครบ 4 สัปดาห์ จะมีตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรซ์ รวมทั้งหมด 80 ตัวอย่าง และมีตัวอย่างนมยู เอช ที รวมทั้งหมด 100 ตัวอย่าง

3. เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

ใช้ชุดตรวจสอบหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมสำเร็จรูป ดีโวลเทสท์-พี (Delvotest-P®: Gist-Brocades, Inc., The Netherlands) ซึ่งประกอบด้วย

1. หลอดพลาสติก (ampoule) ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 ซม. สูง 4 ซม. ภายในบรรจุอาหารแข็งสำหรับเลี้ยงเชื้อและสปอร์ของ *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. โดยใช้ bromthymol blue เป็นตัวบ่งชี้ (indicator) ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเมื่อเกิดสภาพเป็นกรดขึ้น
2. ไปเปตขนาด 100 ไมโครลิตร (micropipette)
3. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ตั้งอุณหภูมิที่ 64 ± 1 °C

วิธีการ : อาศัยหลักพื้นฐานในการตรวจสอบทางจุลชีววิทยา โดยที่เชื้อจุลินทรีย์เจริญเติบโตแล้วสร้างกรดขึ้นจากกระบวนการเมตตาบอลิซึม (metabolism) ทำให้สีของ indicator ในอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนแปลง แต่ในกรณีที่น้ำนมมียาปฏิชีวนะตกค้างอยู่ ยาปฏิชีวนะจะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ทำให้ไม่มีการสร้างกรดขึ้น สีของ indicator ในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงไม่เปลี่ยนแปลง (Bishop *et al.*, 1992 อ้างใน พรศิริ ตั้งใจพัฒนา, 2539)

4. การหาคุณภาพเครื่องมือ

1. ทำ positive (+) และ negative control (-) โดยใช้ตัวอย่างควบคุมที่มีและไม่มีเพนนิซิลิน เป็นตัวเปรียบเทียบ

2. ทำการตรวจสอบตัวอย่างน้ำนม ตัวอย่างละ 2 ครั้ง และการทดสอบรวมทั้งการอ่านผล กระทำโดยบุคคลเดียวกันตลอดการทดสอบ

3. เมื่อตรวจสอบพบตัวอย่างนมที่ให้ผลบวก นำตัวอย่างนั้นมาตรวจสอบยืนยันโดยทำการ อุ่นตัวอย่างนมที่อุณหภูมิ 80 °C นาน 3 นาที ก่อนการตรวจสอบซ้ำด้วย Delvotest-P®

5. การเก็บรวบรวมข้อมูลและสถิติที่ใช้

ทำการตรวจหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมและรวบรวมข้อมูล ณ ห้องปฏิบัติการของศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ภาคเหนือ อำเภอห้างฉัตร จังหวัดลำปาง นำข้อมูลที่ได้จากการตรวจสอบมาหาค่าร้อยละของการตกค้างของยาปฏิชีวนะในน้ำนม

6. การวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

6.1 เตรียมตัวอย่าง negative control : เตรียม 10 % skim milk (Difo Laboratoris, Detroit, Michigan, USA) โดยละลายในน้ำกลั่น

6.2 เตรียมตัวอย่าง positive control (Penicillin standard solution) : ผสมสารละลาย Penicillin G (Sigma Chemical Company, St.Louis, USA) ใน 10 % skim milk โดยให้ความเข้มข้นของ Penicillin G เท่ากับ 0.006 I.U/ml.

6.3 ขั้นตอนการวิเคราะห์ตัวอย่าง (เอกสารกำกับของ Delvotest-P®)

1. วาง ampoule ลงในโฟมที่เจาะช่องพอดีกับขนาดของ ampoule
2. ใส่ตัวอย่างนมที่ต้องการตรวจ 100 ไมโครลิตร ลงในหลอด บันทึกชื่อตัวอย่าง
3. ใส่ negative และ positive control 100 ไมโครลิตร อย่างละ 1 หลอด
4. นำไป incubate ใน water bath ที่อุณหภูมิ 64 ± 1 °C นาน 2 ชั่วโมง 30 นาที
5. อ่านผลเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อของ negative control เปลี่ยนเป็นสีเหลืองจนหมด

6. นำตัวอย่างนมที่ให้ผลบวกไปอุ่นที่อุณหภูมิ 80 °C นาน 3 นาที ทิ้งให้เย็น แล้วนำไปตรวจสอบซ้ำด้วย Delvotest-P® อีกครั้งหนึ่ง

7. บันทึกผลการตรวจสอบ

6.4. การอ่านผล

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองทั้งหมด แสดงว่า ให้ผลลบ (- ve) คือ **ไม่พบยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนม** ในปริมาณที่สูงกว่าค่าที่ตรวจสอบได้ (detection limit) หรือเทียบเท่ากับความเข้มข้นของเพนนิซิลินที่น้อยกว่า 0.003 I.U./ml.

2. อาหารเลี้ยงเชื้อมีสีม่วงและมีสีเหลืองบางส่วน แสดงว่า ให้ผลบวก (+ ve) คือ **พบยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนม** ในปริมาณที่ใกล้เคียงกับค่าที่ตรวจสอบได้ หรือเทียบเท่ากับความเข้มข้นของเพนนิซิลินที่ 0.003 - 0.004 I.U./ml.

3. อาหารเลี้ยงเชื้อมีสีม่วง แสดงว่า ให้ผลบวก (+ ve) คือ **พบยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนม** ในปริมาณที่สูงกว่าที่ตรวจสอบได้ หรือเทียบเท่ากับความเข้มข้นของเพนนิซิลินที่มากกว่า 0.004 I.U./ml.

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University