หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วัสดุและวิธีการ

1. **วิธีการเตรียมตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบกับชุดการตรวจสอบ** KS-9, KS-9S **และวิธี** European Four Plate Test (EFPT)

1.1 วิธีการสกัด (Extraction) ตัวอย่างเนื้อเยื่อของสุกรและไก่

(1). บดตัวอย่างที่ต้องการสกัดให้ละเอียดโดยเครื่องตีปั่นเนื้อเยื่อ (Homogenizer ของ Polytron-Kinematica AG.,Swizerland)นาน 10 วินาที เนื้อเยื่อของสุกรและไก่ที่นำมาสกัดคือ กล้ามเนื้อ ตับ และไต

(2). ใส่ตัวอย่างที่บดแล้วปริมาณ 10 กรัม ลงในหลอดขนาด 50 มิลลิลิตร สำหรับเครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge tube)

(3). เติม Phosphate buffer pH 8.0 (ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.523 กรัม, K_2HPO_4 16.73 กรัม และเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างที่ต้องการสกัดหนัก 10 กรัม

(4). ผสมให้เข้ากันแล้วปั่นโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge ของ MSE Scientific Instruments, England) ด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที

(5). เทส่วนใส (Supernatant) ใส่หลอดแก้ว เพื่อนำไปทดสอบ สำหรับตัวอย่างที่ไม่สามารถทำการทดสอบได้ทันทีทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ - 20 °C นานไม่เกิน 20 วัน

1.2 วิธีการเตรียมซีรั่ม

นำเลือดที่ได้จากไก่และสุกรปริมาตร 15 มิลลิลิตร มาปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ด้วยความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แยกเก็บส่วนใส (Supernatant) ใส่หลอดแก้วเพื่อนำไปทดสอบ ถ้ายังไม่ทดสอบทันทีต้องทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°C นานไม่เกิน 20 วัน

1.3 วิธีการเตรียมปัสสาวะ (สำหรับสุกร)

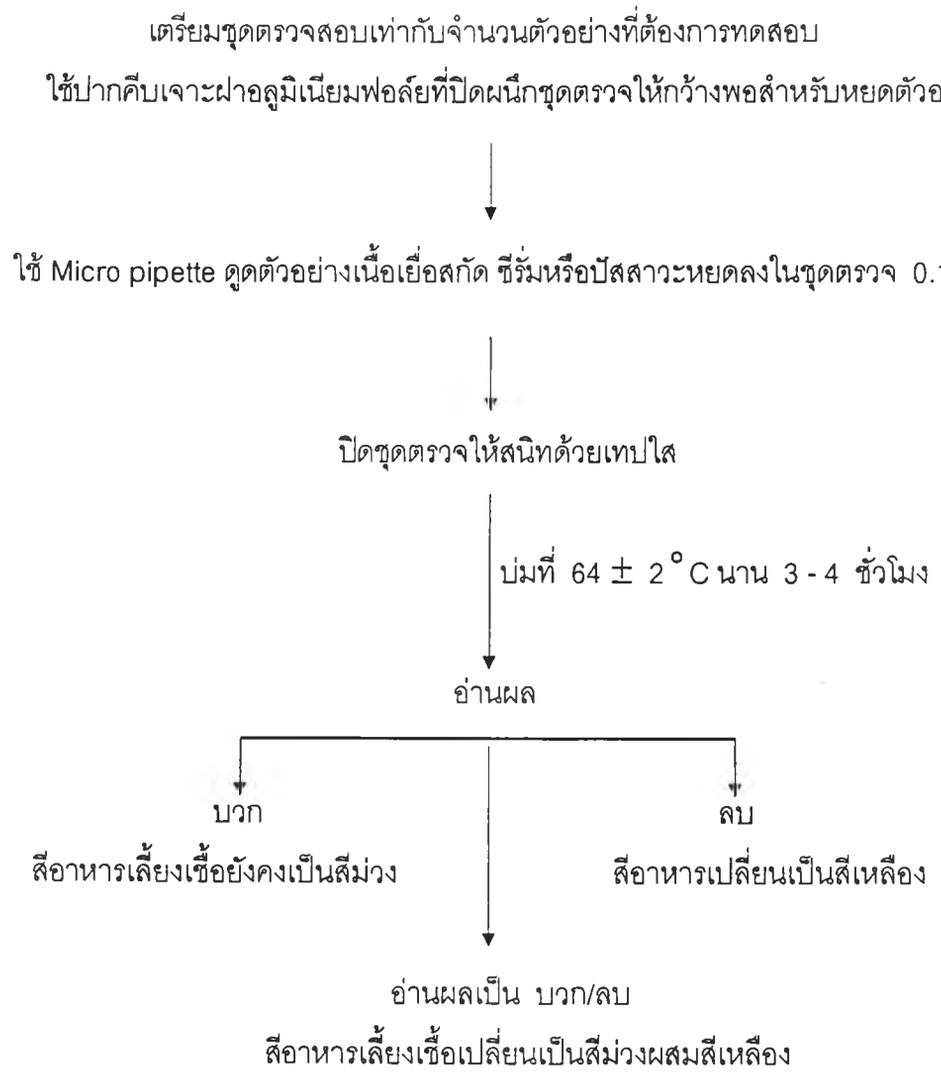
นำน้ำปัสสาวะของสุกรมาปรับระดับความเป็นกรด-ด่างให้อยู่สภาพความเป็นกลางที่ระดับ pH 7.0 ถ้ายังไม่นำไปทดสอบทันทีต้องทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C นานไม่เกิน 20 วัน และก่อนที่จะนำมาทดสอบทุกครั้งต้องนำมาปรับระดับความเป็นกรดด่าง ให้เป็นกลางที่ระดับ pH 7.0

2. การเตรียมการทดสอบ โดยใช้ชุดตรวจสอบ KS-9 และ KS-9S

(1). ใช้ชุดตรวจสอบ KS-9 และ KS-9S ที่ผลิตโดย คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(2). หลักการ และวิธีการทดสอบด้วยชุดตรวจสอบ KS-9 และ KS-9S

ชุดตรวจสอบ KS-9 เป็นชุดตรวจสอบยาปฏิชีวนะและยาซัลฟา ซึ่งเป็นวิธี Tube diffusion โดยอาศัยหลักการยับยั้งการแบ่งตัวของแบคทีเรีย *B. stearothermophilus* ที่ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เอื้ออำนวยต่อการซึมผ่านของยาปฏิชีวนะ และยาซัลฟา สำหรับชุดตรวจสอบ KS-9S เป็นชุดตรวจสอบที่อาศัยหลักการเดียวกับชุดตรวจสอบ KS-9 แต่แตกต่างกันที่ ชุดตรวจสอบ KS-9S มีส่วนผสมของ Trimethoprim ซึ่งมีประสิทธิภาพในการตรวจสอบยากลุ่ม Sulfonamides ได้ดีขึ้น และวิธีการทดสอบด้วยชุดตรวจสอบ KS-9 และ KS-9S ทำการหยดตัวอย่างที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อของสัตว์ (ตับ ไต และกล้ามเนื้อ) ซีรั่มและปัสสาวะ (เฉพาะในสุกร) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงในหลอดเพาะเลี้ยงเชื้อของชุดตรวจสอบแล้วบ่มในตู้อบหรือ water bath ที่อุณหภูมิ 64± 2 °C นาน 3-4 ชั่วโมง อ่านผลโดยการเปรียบเทียบสีของอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลอง หลอดที่มีสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองอ่านผลเป็นลบแสดงว่าไม่มียาตกค้าง ส่วนหลอดที่สีของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนแปลงยังคงเป็นสีม่วงอ่านผลเป็นบวกแสดงว่ามียาตกค้าง ส่วนหลอดที่มีสีอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีม่วงผสมสีเหลืองอ่านผลเป็นบวก/ลบ แสดงว่าอาจมียาตกค้าง ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ขั้นตอนการตรวจหายาด้านจุลชีพในเนื้อเยื่อสกัด ซีรั่ม ปัสสาวะด้วยชุดตรวจสอบ KS-9 และ KS-9S ตามเอกสารประกอบการใช้ของคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. **วิธีตรวจหายาปฏิชีวนะและยาซัลฟาด้วยวิธี** European Four Plate Test

ทำการตรวจหายาปฏิชีวนะและยาซัลฟาตกค้างในตัวอย่างต่าง ๆ จากไก่และสุกรด้วยวิธี European Four Plate Test (EFPT) ตามวิธีของ Okerman et al. (1998) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด คือ

1. Testagar pH 6.0 (Merck, USA)
2. Testagar pH 7..2 (Merck,USA)
3. Testagar pH 8.0 (Merck,USA)

แบคทีเรียที่ใช้ในวิธีการทดสอบนี้คือ *Bacillus subtilis* (Merck,10694) และ *Micrococcus luteus* ATCC 9341 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิดตามคำแนะนำของผู้ผลิต ทำการอบอาหารเลี้ยงเชื้อในตู้นึ่ง (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลานาน 15 นาที เพื่อทำการฆ่าเชื้อที่อาจมีปนเปื้อน จากนั้นอุ่นอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวในอ่างน้ำอุ่น (Water bath) ที่อุณหภูมิ 45- 50°C เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิใกล้เคียงอุณหภูมิของอ่างน้ำอุ่น เติมสารละลายยา Trimethoprim ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Testagar pH 7.2 จนได้ความเข้มข้นของยาในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.05 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร จากนั้นเติมเชื้อ *B. subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด โดยใช้เชื้อที่เตรียมไว้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร/ อาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร เมื่อผสมเข้ากันอย่างทั่วถึงแล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเชื้อแล้ว 5 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อ (Petri dish) ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 90 มิลลิเมตร

สำหรับการเตรียม *M. luteus* นั้น ก่อนใช้ทดสอบจะต้องทำการเพาะเชื้อบน Nutrient agar เพื่อทำให้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วจึงเก็บรวมไว้ในน้ำเกลือปราศจากเชื้อ และปรับความขุ่นของเชื้อ ให้เท่ากับความขุ่นของหลอด Mac Farland No. 2 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-7 °C ได้นาน 7 วัน นำเชื้อ *M. luteus* ที่เตรียมไว้ปริมาตร 2 มิลลิลิตรผสมใน Testagar pH 8.0 ปริมาตร 1 ลิตร ผสมให้ทั่วถึงแล้วเทลงในจานเพาะเชื้อทั้งนี้จานเพาะเชื้อที่เตรียมเสร็จแล้วจะนำมาใช้ทันที และในกรณีที่ใช้ไม่หมดจะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-7 °C และนำมาใช้ได้ในเวลาไม่เกิน 3 วัน

นำตัวอย่างเนื้อเยื่อสกัด ซีรั่ม และปัสสาวะ มาตรวจสอบหายาปฏิชีวนะและยาซัลฟาตกค้าง โดยใช้ Automatic pipette ดูดตัวอย่างที่จะทดสอบปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หยอดลงบนแผ่นกระดาษกรอง (Membrane filter, Cellulose acetate, Adventec Toyo Kaisha

Ltd, Japan) เส้นผ่าศูนย์กลาง 90 มิลลิลิตร แล้ววางแผ่นกระดาษกรองซึ่งชุ่มด้วยตัวอย่างที่หยดไว้ลงบนจานเพาะเชื้อ 4 จานโดยวางแผ่นกระดาษกรองได้ 3-4 ตัวอย่างต่อ 1 จานเพาะเชื้อ และวางให้แต่ละตัวอย่างห่างจากกันอย่างน้อย 2 เซ็นติเมตร จากนั้นทำการอบเพาะเชื้อจานเพาะเชื้อที่มี *B. subtilis* ในตู้อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C และอบจานเพาะเชื้อที่มี *M. luteus* อุณหภูมิที่ 37 °C นาน 18 - 24 ชั่วโมง จึงนำมาอ่านผล ตัวอย่างที่ให้ Inhibition clear zone ขนาดเกินกว่า 2 มิลลิเมตร จากขอบแผ่นกระดาษกรองขึ้นไปแสดงว่ามียาปฏิชีวนะหรือซัลฟาตกค้าง ดังภาพที่ 2

B. subtilis (Merck,10669) 1.0 มิลลิลิตร

+ Testagar pH 6 ,1,000 มิลลิลตร

หรือ Testagar pH 7.2 + Trimethoprim 1,000 มิลลิลตร

หรือ Testagar pH 8.0 1,000 มิลลิลิตร.

หรือ

M. luteus 2.0 มิลลิลิตร. + Testagar pH 8.0 1,000 มิลลิลิตร.

↓

ผสมให้ทั่ว แล้วเทลงจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 มม.
ตั้งทิ้งให้แข็งตัว

↓

ใช้ automatic pipette ดูดตัวอย่างแล้วหยดลงแผ่นกระดาษกรองให้เปียกทั่วแผ่น แล้ววางแผ่นกระดาษกรองบนผิวหน้าของอาหารผสมเชื้อที่แข็งตัวแล้ว
(วางแผ่นกระดาษกรองของตัวอย่างเนื้อเยื่อสกัด,ซีรั่ม,ปัสสาวะอย่างละ 1 ตัวอย่างลงบนทุกจาน)
บ่มเชื้อที่ 30 °C นาน 18 - 24 ชม. สำหรับ *B. subtilis*
และบ่มเชื้อที่ 37 °C นาน 18 - 24 ชม. สำหรับ *M. luteus*

↓

อ่านผล

มี clear zone รอบแผ่นกระดาษกรองขนาดเกินกว่า 2 มม	ไม่มี clear zone หรือมี clear zone รอบแผ่นกระดาษกรองต่ำกว่า 2 มม.
บวก	**ลบ**

ภาพที่ 2 ขั้นตอนการตรวจหายาต้านจุลชีพในเนื้อเยื่อสกัด, ซีรั่ม และปัสสาวะ โดยวิธี EFPT

4. การทดสอบแบบ *In vitro*

4.1 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจสอบหาระดับความเข้มข้นของยา Oxytetracycline ,Chlortetracycline , Sulfadiazine , Sulfamethazine ที่ผสมในกล้ามเนื้อ ตับ ไต และซีรั่มของไก่ และยา Oxytetracycline , Sulfamethazine ที่ผสมในกล้ามเนื้อ ตับ ไต ซีรั่ม และปัสสาวะของสุกร ระหว่างชุดตรวจสอบ KS- 9, KS - 9S และ วิธี EFPT

4.1.1 การหาระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของยา Oxytetracycline, Chlortetracycline Sulfadiazine , Sulfamethazine ที่ผสมในกล้ามเนื้อ ตับ ไต และซีรั่มของไก่ และยา Oxytetracycline Sulfamethazine ที่ผสมในกล้ามเนื้อ ตับ ไต ซีรั่ม และปัสสาวะของสุกร ที่ชุดตรวจสอบ KS- 9 และ KS - 9S สามารถตรวจพบได้ 100 %

ทำการผสมยาปฏิชีวนะและยาซัลฟาในกล้ามเนื้อ ตับ ไตไก่และสุกรหนัก 5 กรัม ให้มีความเข้มข้นในระดับต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 2 และ 3 ตามลำดับ จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4- 5^{o}C นาน 20 ชั่วโมง แล้วจึงเติม Phosphate buffer pH 8.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่องตีปั่นเนื้อเยื่อ (Homoginizer) ด้วยความเร็วไม่ต่ำกว่า 25,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที นำส่วนใส (Supernatant) ใส่หลอดแก้วเพื่อนำไปทดสอบกับชุดตรวจสอบ KS- 9 และ KS - 9S (ในกรณีที่ไม่สามารถทดสอบได้ทันทีเก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ - 20 ^{o}C นานไม่เกิน 20 วัน) ทำการทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง ๆ ละ 5 หลอดต่อตัวอย่าง (ทดสอบความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ) นำผลการทดสอบแต่ละครั้งมารวมกันแล้วรายงานเป็นเปอร์เซนต์ที่ชุดตรวจสอบให้ผลบวก

เตรียมซีรั่ม ปัสสาวะ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร สำหรับผสมยาปฏิชีวนะและยาซัลฟาที่ความเข้มข้นในระดับต่าง ๆ ที่กำหนดดังแสดงในตาราง 2และ 3 ตามลำดับ เมื่อเตรียมเสร็จแล้วนำมาทดสอบด้วยชุดตรวจสอบ KS- 9 และ KS - 9S โดยทดสอบความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ แล้วนำผลการทดสอบมารวมกันแล้วรายงานเป็นเปอร์เซนต์ที่ชุดตรวจสอบให้ผลบวก

4.1.2 การหาระดับความเข้มข้นของยา Oxytetracycline ,Chlortetracycline Sulfadiazine, Sulfamethazine ที่ผสมในกล้ามเนื้อ ตับ ไต ซีรั่มไก่ และยา Oxytetracycline , Sulfamethazine ที่ผสมในกล้ามเนื้อ ตับ ไต ซีรั่ม ปัสสาวะสุกรโดยวิธี EFPT

การเตรียม Oxytetracycline, Chlortetracycline, Sulfadiazine, Sulfamethazine ที่ผสมในกล้ามเนื้อ ตับ ไต ซีรั่มไก่ และยา Oxytetracycline , Sulfamethazine ที่ผสมในกล้ามเนื้อ ตับ ไต ซีรั่ม และปัสสาวะสุกร ปฏิบัติการเช่นเดียวกันกับ 4.1.1 สำหรับการเตรียมการตรวจสอบ และการอ่านผลใช้หลักการเดียวกันกับวิธี European Four Plate Test (EFPT) โดยทำการทดสอบความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ นำผลการทดสอบมารายงานเป็นเปอร์เซ็นต์ที่ให้ผลบวก

ตารางที่ 2 ระดับความเข้มข้นของยา Oxytetracycline, Chlortetarcycline ,Sulfadiazine และ Sulfamethazine ที่ผสมในกล้ามเนื้อ ตับ ไต และซีรั่มของไก่ เพื่อหาระดับความเข้ม ข้นของยาที่ต่ำสุด (Low Detection limit) ที่ชุดตรวจสอบ KS-9, KS-9S และวิธี EFPT สามารถตรวจพบได้ 100 %

ชนิดของยา	ระดับความเข้มข้นของยา (ไมโครกรัม/ กรัม)											
Chlortetracycline	0.4	0.8	1.0	1.6	2.0	3.0	3.2	6.4				
Oxytetracycline	0.05	0.1	0.2	0.4	0.5	0.6	0.8	1.6	3.2			
Sulfadiazine	0.05	0.1	0.2	0.4	0.5	0.6	0.8	1.5	1.6	3.0	3.2	6.4
Sulfamethazine	0.05	0.1	0.2	0.4	0.5	0.6	0.8	1.5	1.6	3.0	3.2	6.4

ตารางที่ 3 ระดับความเข้มข้นของยา Oxytetracycline, Sulfamethazine ที่ผสมในกล้ามเนื้อตับ ไต ซีรั่ม และปัสสาวะของสุกรเพื่อหา ระดับความเข้มข้น ของยาที่ต่ำสุด (Low Detection limit) ที่ชุดตรวจสอบ KS-9, KS-9S และ วิธี EFPT สามารถตรวจพบได้100 %

ชนิดของยา	ระดับความเข้มข้นของยา (ไมโครกรัม/ กรัม)									
Oxytetracycline	0.05	0.1	0.2	0.4	0.5	0.6	0.8	1.6	3.2	6.4
Sulfamethazine	0.05	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.6	3.2	6.4

4.2. การหากราฟมาตรฐาน (Standard curve) ระหว่างความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะและซัลฟา ที่ผสมในกล้ามเนื้อ ตับ ไต ซีรั่ม ของไก่และสุกร รวมถึงปัสสาวะของสุกร ด้วยวิธี EFPTใช้เชื้อ *B. subtilis* กับอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

ปฏิบัติเช่นเดียวกันกับ 4.1.1 และ 4.1.2 แต่ใช้ระดับความเข้มข้นที่ไว้ในตารางที่ 4 และ 5 ทำการทดสอบในจานที่เหมาะสมและมีความไวสูงสุดในการตรวจสอบด้วยของวิธี EFPT ดังนี้

- กลุ่มยา Tetracycline ใช้ Test plate ของ Testagar pH 6.0 เติมเชื้อ *Bacillus subtilis*
- กลุ่มยาซัลฟาใช้ Test plate ของ Testagar pH 7.2 เติมเชื้อ *Bacillus subtilis* และ Trimethoprim ขนาด 0.05 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร

การอ่านและการแปรผล ทำโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ Inhibition clear zone ที่เกิดขึ้น (มิลลิเมตร)ด้วยเครื่องมือวัดที่เรียกว่า Vernear caliper ทำการทดสอบความเข้มข้นละ 3 ครั้ง และคำนวณหาค่าเฉลี่ยในแต่ละความเข้มข้น แล้วนำค่าที่ได้จากการอ่านผลมาวิเคราะห์หาค่า Correlation Coefficiancy โดยใช้ Correlation analysis

ตารางที่ 4 ระดับความเข้มข้นของ Oxytetracycline, Chlortetarcycline ,Sulfadiazine,และ Sulfamethazine ที่ผสมในกล้ามเนื้อ ตับ ไต และซีรั่มของไก่เพื่อหาค่าของกราฟมาตรฐาน (Standard curve)

ชนิดของยา	ระดับความเข้มข้นของยา (ไมโครกรัม/ กรัม)								
Oxytetracycline	0.6	0.8	1.6	2.0	2.5	3.2	3.5	5.0	
Chlortetarcycline	1.6	2.0	2.5	3.0	3.2	5.0	3.2	6.4	10
Sulfadiazine	1.6	3.0	3.2	5.0	6.4	10	15	20	
Sulfamethazine	1.6	3.0	3.2	5.0	6.4	10	15	20	

ตารางที่ 5 ระดับความเข้มข้นของยา Oxytetracycline และ Sulfamethazine ที่ผสมในกล้ามเนื้อ ตับ ไต ซีรั่ม และปัสสาวะของสุกร เพื่อหากราฟมาตรฐาน (Standard curve)

ชนิดของยา	ระดับความเข้มข้นของยา (ไมโครกรัม/ กรัม)							
Oxytetracycline	0.6	0.8	1.0	1.6	2.5	3.2	5.0	
Sulfamethazine	1.6	2.5	3.2	5.0	6.4	10.0	20.0	40.0

5. การทดสอบแบบ *In vivo*

5.1 ในไก่

1. ใช้ไก่พันธุ์เนื้อคละเพศจำนวน 250 ตัว เริ่มเลี้ยงตั้งแต่ไก่อายุ 1 วัน
   - ไก่อายุ 1 - 23 วัน ให้อาหารปกติที่มีขายในท้องตลาด
   - ไก่อายุ 24 - 37 วัน ให้อาหารที่ผสมเองที่ไม่มีการเติม growth promoter ประเภทสารต้านจุลชีพ (ภาคผนวก ข)
   - ทำการทดสอบเพื่อยืนยันความปลอดสารต้านจุลชีพในไก่ทดลองก่อนนำเข้าสู่การทดลอง 2 ครั้ง ด้วยวิธี EFPT และชุดตรวจสอบ KS-9S ดังนี้
     - ครั้งที่ 1 ไก่อายุ 30 วัน เจาะเลือดเก็บซีรั่มมาทดสอบโดยสุ่มจาก 5 %ของไก่ทั้งฝูง
     - ครั้งที่ 2 ไก่อายุ 37 วัน ทำการฆ่าไก่จากการสุ่มไก่ 5% ของไก่ทั้งฝูง เก็บเลือด ตับ ไต และกล้ามเนื้อเพื่อทำการสกัดแล้วทดสอบ เพื่อยืนยันว่าไม่พบการตกค้างของสารต้านจุลชีพใด ๆ จากนั้นจึงคัดเลือกไก่ที่มีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงเข้าสู่การทดลอง
2. แบ่งไก่ทดลองออกเป็น 4 กลุ่มการทดลอง (Treatment group) กลุ่มละ 45 ตัว ให้ยาไก่โดยการละลายน้ำให้กินติดต่อกันนาน 5 วัน
   - 2.1 ไก่ทดลองกลุ่มที่ 1 ได้รับยา Oxytetracycline ขนาด 45 มิลลิกรัม/ กิโลกรัม
   - 2.2 ไก่ทดลองกลุ่มที่ 2 ได้รับยา Chlortetracycline ขนาด 40 มิลลิกรัม/ กิโลกรัม
   - 2.3 ไก่ทดลองกลุ่มที่ 3 ได้รับยา Sulfamethazine ขนาด 30 มิลลิกรัม/ กิโลกรัม
   - 2.4 ไก่ทดลองกลุ่มที่ 4 ได้รับยา Sulfadiazine ขนาด 30 มิลลิกรัม/ กิโลกรัม

3. ไก่กลุ่มควบคุม 1 กลุ่ม จำนวน 45 ตัว ให้อาหารที่ผสมเองและไม่มีการเติม growth promoter ประเภทสารต้านจุลชีพตลอดการทดลอง
4. หลังการให้ยาครั้งสุดท้ายโดยนับจากเวลาที่ไก่กินน้ำหมด ทำการฆ่าไก่ตามระยะเวลาที่กำหนด คือ 6 24 48 72 96 120 168 และ 216 ชั่วโมง โดยฆ่าไก่ที่มีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงกลุ่มละ 5 ตัว ของทุกระยะเวลาที่กำหนด
5. เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อจากไก่ทุกกลุ่มได้แก่
   5.1 กล้ามเนื้อประกอบด้วยกล้ามเนื้อหน้าอกและกล้ามเนื้อขา หนักประมาณ 100 - 200 กรัม
   5.2 ตับ น้ำหนักประมาณ 100 - 150 กรัม
   5.3 ไต น้ำหนักประมาณ 50 - 100 กรัม
   5.4 เลือดเพื่อปั่นเป็นซีรั่ม ประมาณ 30 - 50 มิลลิลิตร

ทำการสกัดและตรวจหายาตกค้างทุกชนิดโดยใช้ชุดตรวจสอบ KS- 9 และ KS- 9S โดยทำการทดสอบตัวอย่างละ 5 หลอด (5 ซ้ำ) พร้อมด้วยการเปรียบเทียบกับวิธี European Four Plate Test (EFPT) ทำการทดสอบ 1 ครั้ง หากทำการสกัดไม่ทันเก็บรักษากล้ามเนื้อ ตับไต และซีรั่ม ไว้ที่อุณหภูมิ - 20°C นานไม่เกิน 20 วัน

5.2 ในสุกร

1. ใช้สุกรขุนน้ำหนักเฉลี่ย 60 กิโลกรัม (อายุประมาณ 4.5 เดือน) คลอเพศโดยใช้สุกรของฟาร์มสถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตกาฬสินธุ์ จ. กาฬสินธุ์ จำนวน 60 ตัวก่อนนำสุกรเข้าสู่การทดลอง ให้สุกรกินอาหารที่ไม่มียาปฏิชีวนะและซัลฟาผสม (ภาคผนวก ข) เป็นเวลานาน 30 วัน และทำการตรวจสอบยืนยันเพื่อความมั่นใจว่าเนื้อเยื่อและซีรั่มของสุกรเหล่านั้นปลอดภัยจาก ยาตกค้างของสุกรโดยตรวจซีรั่ม ด้วยวิธี EFPT และชุดตรวจสอบ KS- 9S เป็นจำนวน 3 ครั้ง คือ

ครั้งที่ 1 หลังเปลี่ยนอาหารเป็นสูตรที่ไม่มียาปฏิชีวนะและซัลฟา 15 วัน
ครั้งที่ 2 หลังเปลี่ยนอาหารเป็นสูตรที่ไม่มียาปฏิชีวนะและซัลฟา 21 วัน
ครั้งที่ 3 หลังเปลี่ยนอาหารเป็นสูตรที่ไม่มียาปฏิชีวนะและซัลฟา 28 วัน

2. แบ่งสุกรทดลองออกเป็น 2 กลุ่มการทดลอง กลุ่มละ 20 ตัว และให้ยาปฏิชีวนะโดยวิธีผสมอาหารให้กิน
   2.1 สุกรทดลองกลุ่มที่ 1 ได้รับยา Oxytetracycline ที่ระดับความเข้มข้น 140 ไมโครกรัม/ กรัม ติดต่อกัน 5 วัน
   2.2 สุกรทดลองกลุ่มที่ 2 ได้รับยา Sulfamethazine ที่ระดับความเข้มข้น 110 ไมโครกรัม/ กรัม ติดต่อกัน 5 วัน
3. สุกรกลุ่มควบคุม 1 กลุ่ม จำนวน 20 ตัว ให้อาหารสูตรที่ไม่มียาปฏิชีวนะและยาซัลฟาตกค้างตลอดการทดลอง
4. หลังให้ยาครบ 5 วันแล้วให้เปลี่ยนอาหารเป็นสูตรที่ไม่มียาปฏิชีวนะและยาซัลฟาผสมและฆ่าสุกรตามระยะเวลาที่กำหนดหลังให้ยาวันสุดท้ายคือ
   4.1 ยา Oxytetracycline ฆ่าวันที่ 1, 3, 5, 7 และ 10
   4.2 ยา Sulfamethazine ฆ่าวันที่ 2,4, 6, 9 และ 11

   โดยทำการฆ่าสุกรกลุ่มทดลองกลุ่มละ 4 ตัว และกลุ่มควบคุม 2 ตัว ของแต่ละระยะเวลาที่กำหนดเก็บปัสสาวะ เลือด ตับไตและกล้ามเนื้อบริเวณคอ เพื่อนำมาสกัดและตรวจสอบโดยใช้ชุดตรวจสอบKS- 9 และKS- 9S โดยทำการทดสอบตัวอย่างละ 5 หลอด (5ซ้ำ) พร้อมด้วยการเปรียบเทียบกับวิธี EFPT หากทำการสกัดไม่ทันเก็บรักษาเนื้อเยื่อและซีรั่มไว้ที่อุณหภูมิ -20 $^{\circ}$C นานไม่เกิน 20 วัน

6. **การทดสอบความน่าเชื่อถือ** (Validity test) **ของชุดตรวจสอบ** KS-9, KS-9S **และวิธี** EFPT

สำหรับการทดสอบความน่าเชื่อถือของชุดตรวจสอบ KS-9, KS-9S และวิธี EFPTจะทำการวิเคราะห์ จากผลการตรวจที่ทดสอบในกล้ามเนื้อ ตับ ไต และซีรั่มของกลุ่มไก่ หลังจากได้รับยา Oxytetracycline , Chlortetracycline , Sulfadiazine และ Sulfamethazine ในชั่วโมงที่ 6 และ 24 หลังหยุดให้ยาเปรียบเทียบกับกลุ่มไก่ที่ไม่ได้รับยา และจากผลที่ทดสอบในกล้ามเนื้อ ตับ ไต ซีรั่ม ปัสสาวะของกลุ่มสุกร หลังจากได้รับยา Oxytetracycline ในวันที่ 1 และ 3 หลังหยุดยา และ Sulfamethazine ในวันที่ 2 และ 4 หลังหยุดให้ยาตามลำดับ เปรียบเทียบกับกลุ่มสุกรที่ไม่ได้รับยา และคำนวณหาค่าความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) และความแม่นยำ (Accuracy) โดยใช้วิธีการ 2x2 Table ตามสูตรข้างล่างนี้

	สัตว์ที่ได้รับยา	สัตว์ที่ไม่ได้รับยา	
ผลการตรวจด้วยชุดตรวจสอบ +ve	a	b	a + b
ผลการตรวจด้วยชุดตรวจสอบ - ve	c	d	c + d
	a + c	b + d	n

Sensitivity true positive predictive value หรือความไว = a / a + c

Positive predictive value = a / a + b

Specificity True Negative หรือความจำเพาะ = d / b + d

Negative predictive value = d / c + d

Accuracy of the test หรือความแม่นยำ = (a + d) / n