สำนักงานวิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดและทฤษฎี

2.1.1 ยาปฏิชีวนะในกลุ่มเททระไซคลิน (tetracycline, TCs)

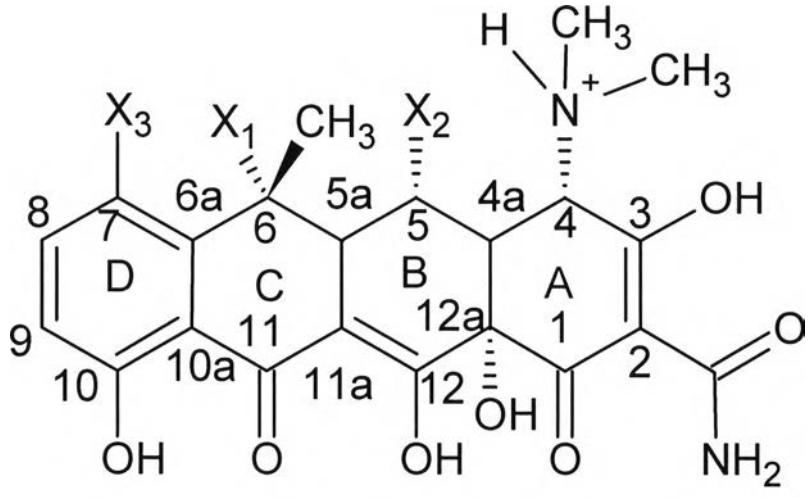
ยากลุ่มเททระไซคลิน (tetracyclines, TCs) เป็นยาที่ออกฤทธิ์กดการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และมีขอบเขตในการออกฤทธิ์กว้าง ทำลายแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ รวมทั้ง *Mycobacteria*, *Mycoplasma*, *Treponema*, *Rickettsiae*, *Cocella*, *Clamydia*, *Actinomyces*, *Amoebae*, *Plasmodium* และไวรัส โดยแบคทีเรียแกรมบวกนั้นไวต่อเททระไซคลินมากกว่าแกรมลบ แต่ก็เกิดการดื้อยาง่ายกว่า ดังนั้นจึงมักใช้ยาเททระไซคลินรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจากแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Haemophilus ducreyi*, *Vibrio cholera* และ *Pseudomonas mallei* เป็นต้น [16] ยาในกลุ่มนี้ผลิตขึ้นมาจากเชื้อราในตระกูล *Streptomyces* โดยสารตัวแรกที่ค้นพบคือ คลอเททระไซคลิน (chlortetracycline, CTC) ค้นพบในปี 1948 โดยแยกได้จากเชื้อ *Streptomyces aureofaciens* อีก 2 ปีต่อมาก็ค้นพบออกซิเททระไซคลิน (oxytetracycline, OTC) โดยแยกได้จากเชื้อ *Streptomyces rimosus* ต่อมาในปี 1952 สามารถผลิตยากลุ่มนี้ในรูปกึ่งสังเคราะห์ขึ้นมาได้ โดยการดึงเอาอะตอมของคลอรีนออกจาก CTC ยาที่ผลิตได้ใหม่นี้จะเรียกว่าเททระไซคลิน (tetracycline, TC) เหมือนชื่อกลุ่มยา ในปัจจุบันนี้ได้มีการผลิตยาในกลุ่มนี้ตัวใหม่ขึ้นมาใช้อีกหลายตัว เช่น ดอกซีไซคลิน (doxycycline, DC) ดีมีคลอไซคลิน (demechlocycline, DMC) เมธาไซคลิน (methacycline, MC) และโรลิเททระไซคลิน (rolitetracycline, RTC) [17]

ยาในกลุ่มเททระไซคลินทุกชนิด มีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกัน กล่าวคือ ประกอบด้วยโครงสร้างวงแหวน 4 อันซึ่งอาจเรียกว่า hydronapthacene skeleton หรือ tetracycline nucleus (รูปที่ 2.1) และตารางที่ 2.1

คุณสมบัติโดยทั่วไปของยาในกลุ่มเททระไซคลิน พบว่ามักเป็นผงยาสีเหลืองอ่อน ไม่มีกลิ่น มีรสขมเล็กน้อย ละลายน้ำได้เล็กน้อย ละลายในแอลกอฮอล์ 50 ส่วน ไม่ละลายในอีเธอร์ คลอโรฟอร์ม และละลายได้ในกรดเจือจาง แต่ถ้าเตรียมในรูปเกลือไฮโดรคลอไรด์จะละลายน้ำได้ดีขึ้น

หอสมุดกลาง สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผงยาละลายน้ำ 10 ส่วน จะได้สารละลายใสแต่ถ้าทิ้งไว้จะขุ่น ผงยาละลายในแอลกอฮอล์ 100 ส่วน เกือบไม่ละลายในอีเธอร์คลอโรฟอร์ม ละลายในสารละลายอัลคาไลน์ไฮดรอกไซด์ และคาร์บอเนต สารละลาย 1% มี pH 1.8- 2.8 ตัวยาเมื่ออยู่ในสภาพผงแห้ง มักมีความคงตัวดี แต่ถ้าอยู่ในรูปสารละลาย จะสลายตัวง่าย พบว่ายาสลายตัวด้วยอีพิเมอไรเซชัน (epimerization) เกิดเป็น4-epitetracycline, anhydrotetracycline, 4-epianhydrotetracycline และสารอื่นๆ และจะสลายเร็วมากที่ pH ต่ำกว่า 2 และจะสลายตัวได้ช้าที่ pH 7 หรือ สูงกว่า และอัตราเร็วการสลายตัวจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีกรดซิตริกอยู่ด้วย ยาในกลุ่มนี้ทุกตัวสามารถจับตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อน กับอนุมูลโลหะชนิดไตรวาเลนท์ (trivalent) และไดวาเลนท์ (divalent) เช่น แคลเซียม อะลูมีนัม แมกนีเซียม และเหล็ก ที่ตำแหน่ง C-11 และ C-12 รวมตัวเป็นสารประกอบที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble complexes) ดังนั้นจึงไม่ควรใช้ยานี้ร่วมกับยาหรือสารอื่นๆ ที่มีอนุมูลโลหะเหล่านี้ เช่น ยาลดกรดและนม ดังนั้น หากยาเททระไซคลินเกิดการรวมตัวกันดังกล่าวก่อนที่ยาจะสลายตัวในกระเพาะอาหารแล้ว ยาก็จะไม่ถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด ดังนั้นในการผลิตยากลุ่มเททระไซคลินจะต้องเตรียมยาให้อยู่ในรูปของเกลือหรือรูปอื่นที่จะทำให้ยาไม่สามารถไปรวมตัวกับโลหะ โดยเฉพาะแคลเซียม ตัวอย่างของยาที่ผลิตขายอยู่ในรูปต่างๆ เช่น oxytetracycline กับ glucosamine เตรียมโดยเติม glucosamine ลงไปจับตัวกับแคลเซียมไอออนหรือ tetracycline- phosphate เตรียมโดยเติม sodiummetaphosphate เรียกว่าสารประกอบ เททระไซคลินฟอสเฟต ซึ่งพบว่ายาตัวนี้จะดูดซึมได้ดีกว่ารูปอื่นๆ ทั้งนี้พบว่า tetracycline ที่อยู่ในรูปของเกลือไฮโดรคลอไรด์เป็นรูปที่มีความทนทานโดยเฉพาะในรูปผง (dry powder) [16]



รูปที่ 2.1 สูตรโครงสร้างของยาในกลุ่มเททระไซคลิน

ตารางที่ 2.1 สูตรโครงสร้างของยาในกลุ่มเททระไซคลิน

ชนิดของยาในกลุ่มเททระไซคลิน (TCs)		X_1	X_2	X_3
เททระไซคลิน	(tetracycline; TC)	$-CH_3$	-H	-H
คลอเททระไซคลิน	(chlotetracycline; CTC)	$-CH_3$	-H	-CL
ออกซีเททระไซคลิน	(oxytetracycline; OTC)	$-CH_3$	-OH	-H
ดอกซีไซคลิน	(doxycycline; DXC, DC)	$-CH_3$	-OH	-H*
โรลิเททระไซคลิน	(rolitetracycline; RTC)	$-CH_3$	-H	-H
ดีเมโคลไซคลิน	(demeclocycline; DMC)	-H	-H	-Cl
มิโนไซคลิน	(minocycline; MNC)	-H	-H	$-N(CH_3)_2$*
เมธาไซคลิน	(methacycline; MTC)	$=CH_2$	-OH	-H*

* ที่ตำแหน่ง C_6 ไม่มี -OH [16]

2.1.2 กลไกการทำงานและขอบเขตการออกฤทธิ์ของยาเททระไซคลิน

เททระไซคลินมีผลต่อจุลชีพและต่อเซลล์ของร่างกายโดยเรียงตามลำดับความสำคัญดังต่อไปนี้

1. การยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์แบคทีเรียที่กำลังเจริญแบ่งเซลล์ ซึ่งเป็นการออกฤทธิ์ที่สำคัญของสารกลุ่มนี้ โดยจะไปเกาะกับส่วน ไรโบโซมย่อย 50s ของ 70s ไรโบโซม ของเชื้อแบคทีเรีย ไปขัดขวางการขนย้ายกรดอะมิโน จาก aminoacyl t-RNA ไปยังส่วนพอลิเปปไทด์ ทำให้แบคทีเรียหยุดการเจริญและแบ่งเซลล์ (bacteriostatic) ถ้าความเข้มข้นของยาสูงๆพบว่ายานี้จะยับยั้งขบวนการสังเคราะห์โปรตีนของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทุกชนิดด้วย และมีฤทธิ์ต่อเซลล์ร่างกายทำให้การทำงานของไตเสียไป

2. กลุ่มยาเททระไซคลินมีฤทธิ์เป็นคีเลติ่งเอเจ่น (chelating agent) ของโลหะชนิดไตรวาเลนท์และไดวาเลนท์ เช่น แมกนีเซียม แมงกานีส และแคลเซียม ดังนั้นยากลุ่มนี้มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์กลุ่มที่มีโลหะดังกล่าวเป็นโคแฟคเตอร์ (cofactor) โดย CTC จะยับยั้งเอนไซม์ organic nitroreductase ของเซลล์แบคทีเรีย

3. กลุ่มยาเททระไซคลินมีฤทธิ์รบกวนขบวนการฟอสฟอรีเลชันของการสร้างกลูโคส (phosphorylation of glucose) ทั้งของเซลล์แบคทีเรียและเซลล์ร่างกาย [18]

ยากลุ่มนี้นำไปใช้โดยให้สัตว์กินเนื้อและสัตว์เคี้ยวเอื้องกิน ให้โดยการฉีดเข้าเส้นเลือดหรือกล้ามเนื้อ หรือให้ยาเข้าทางเต้านมเพื่อรักษาโรคเต้านมอักเสบในโคนม แพะ และแกะ โดยมีขอบเขตในการออกฤทธิ์ดังนี้

1) กลุ่มยาเททระไซคลินใช้ได้ผลดีที่สุดต่อแบคทีเรียพวก *beta hemolytic Streptococci, nonhemolytic Streptococci, Clostridium, Brucella, Hemophius* และ *Klebsiella*

2) กลุ่มยาเททระไซคลินใช้ได้ผลปานกลางต่อแบคทีเรียพวก *Corynebacterium, Pasteurella*, *Salmonella* และ *Bacillus anthracis*

3) กลุ่มยาเททระไซคลินใช้ไม่ค่อยได้ผลต่อแบคทีเรียพวก *Proteus* spp., *Psudomonas, Acrobacter aerogenes, Streptococcus faecallis, Shigella* และ *Staphylococci* [18]

4) ออกฤทธิ์ทำลาย pathogenic agent บางชนิดที่สารปฏิชีวนะชนิดอื่นทำลายไม่ได้ เช่น Rickettsiae, ไวรัสขนาดใหญ่ เช่น Psittacosis ในสัตว์ และ Lymphogranuloma venereum ในคน

5) ออกฤทธิ์ทำลายเชื้อ Mycoplasma, Spirochete และ Actinomycetes

6) ถ้าให้ปริมาณสูงๆจะออกฤทธิ์ทำลายเชื้อโปรโตซัวได้

สารในกลุ่ม TCs ที่นิยมใช้ในทางสัตวแพทย์ ได้แก่

1) tetracycline hydrochloride (TC-HCl) มีชื่อทางการค้าตามบริษัทที่ผลิตได้แก่ Achromycin, Panmycin และ Polycycine เป็นต้น มีลักษณะเป็นผงผลึกสีเหลือง ไม่มีกลิ่น และละลายน้ำได้ดี ถูกทำลายได้ง่ายโดยสารละลายด่างแก่ และสารละลายกรดที่มี pH ต่ำกว่า 2

2) oxytetracycline hydrochloride (OTC-HCl) มีชื่อทางการค้าว่า Terramycin มีลักษณะเป็นผงผลึกสีเหลือง มีรสขม และไม่มีกลิ่น ละลายได้ดีในน้ำและสารละลายอินทรีย์ นิยมให้โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ

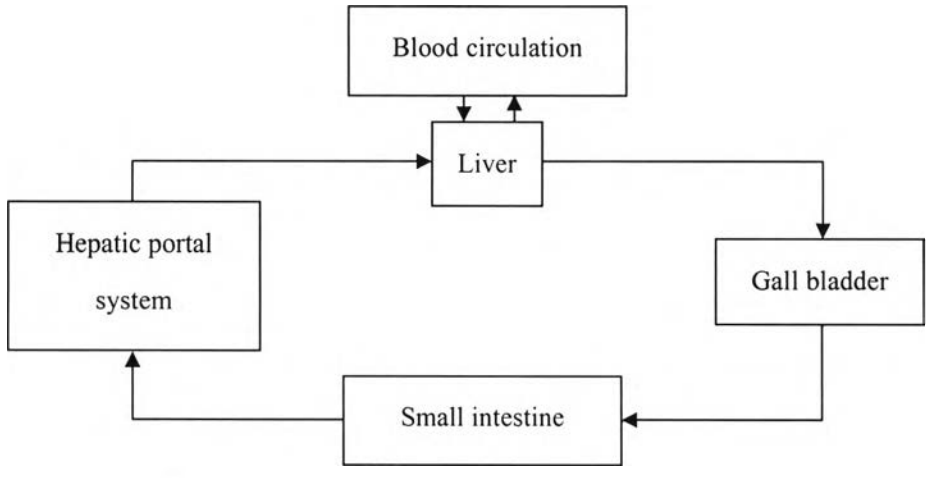
3) chlortetracycline hydrochloride (CTC-HCl) มีชื่อทางการค้าว่า Aureomycin มีลักษณะเป็นผงผลึกสีเหลือง ไม่มีกลิ่น มีรสขม และละลายน้ำได้เพียงเล็กน้อย มีลักษณะเป็นกรดสูงเมื่ออยู่ในรูปสารละลายจึงไม่แนะนำให้ฉีดเข้ากล้ามเนื้อเพราะจะทำให้กล้ามเนื้อเกิดการระคายเคืองและเกิดเนื้อตายได้

4) doxycycline monohydrate (DC) เป็นสารที่ดูดซึมได้ดีและขับถ่ายออกช้ากว่าสารในกลุ่ม TCs ตัวอื่นๆจึงทำให้สารออกฤทธิ์ได้นาน มีค่าครึ่งชีวิตในกระแสเลือดนานถึง 19-20 ชั่วโมง ขนาดสารที่ให้จึงน้อยกว่าและไม่ต้องให้บ่อยเหมือนสารตัวอื่นในกลุ่ม

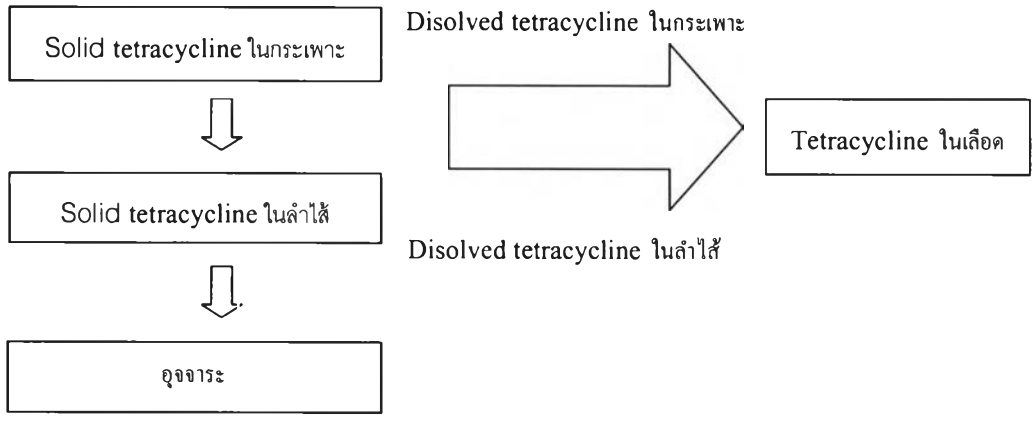
2.1.3 การดูดซึม การกระจายยา และการขับถ่าย

ยาในกลุ่ม TCs จะถูกดูดซึมได้ดีในลำไส้เล็กส่วนต้น โดยยาจะต้องสลายตัวในกระเพาะอาหารก่อน พบว่ายาแต่ละชนิดถูกดูดซึมได้แตกต่างกัน เรียงจากมากไปน้อยได้ดังนี้ ท monocycline > doxycycline > tetracycline > demeclocycline, oxytetracycline > chlotetracycline ในพวกสัตว์กินเนื้อภายหลังจากให้สารในกลุ่ม TCs สารจะถูกดูดซึมได้ดีในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กส่วนต้น สารกลุ่มนี้จะเกาะกับโปรตีนในพลาสมาแบบไม่ถาวร จะแพร่กระจายไปทั่วร่างกายโดยพบปริมาณเข้มข้นสูงสุดที่ ไต ตับ ม้าม และ ภายหลังจากที่ดูดซึมแล้วสารบางส่วนจะไปอยู่ที่ตับแล้วขับออกมากับน้ำดีและถูกดูดซึมที่ลำไส้เล็กอีกเรียกว่าการเกิด enterohepatic recycling (รูปที่ 2.2) จึงยังมีสารบางส่วนคงอยู่ในเลือดเป็นเวลานาน ซึ่งต่างจากสารปฏิชีวนะชนิดอื่นๆ ที่ขับถ่ายออกจากร่างกายอย่างรวดเร็ว โดยจะสามารถขับถ่ายได้ทั้งทางปัสสาวะโดยผ่านไต ทางอุจจาระ และทางน้ำนม สารกลุ่ม

TCs มีการเปลี่ยนแปลงหลายระดับ แต่ที่พบส่วนใหญ่ในปัสสาวะ อุจจาระ และในเนื้อเยื่อจะอยู่ในรูป TC ตั้งต้น ในอุจจาระจะพบสาร TC ในรูปเดิมไม่เปลี่ยนแปลงอยู่ถึง 30% [17]



รูปที่ 2.2 การเกิด enterohepatic cycle ของสารกลุ่ม TCs [14]



รูปที่ 2.3 การดูดซึมของกลุ่มยา TCs (adsorption) [14]

ถึงแม้สารจะถูกขับถ่ายออก แต่ก็มีสารบางส่วนที่ตกค้างอยู่ในร่างกายสัตว์ได้ ที่ผ่านมามีรายงานการตรวจพบยา Tetracycline ในผลิตภัณฑ์สัตว์มากมายเช่น ไข่ไก่ น้ำนม น้ำผึ้งและเนื้อสัตว์ โดยมีรายงานว่าพบในตัวอย่างเนื้อไก่ 1.2% และเนื้อหมูที่ซื้อมาจากตลาด [9] ส่งผลเสียต่อผู้บริโภค โดยเฉพาะอาการการแพ้ที่เกิดจากการไม่ยอมรับยาปฏิชีวนะตัวใดตัวหนึ่ง [1]

2.1.4 ผลกระทบจากการใช้ยาเททระไซคลิน

การเกิดการตกค้างของสาร TCs ในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ ในระดับน้อยกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (part per million: ppm) จะไม่เกิดผลเฉียบพลันต่อผู้บริโภค แต่อาจทำให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้ในระยะยาว เนื่องจากการที่สารตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่บริโภคเข้าไปมีปริมาณน้อยไม่ถึงกับขนาดที่ใช้รักษาโรค จึงไม่ทำให้เชื้อโรคที่มีในร่างการตายแต่กลับทำให้เชื้อโรคนั้นปรับตัวและดื้อต่อยา ทำให้เกิดปัญหาการรักษาโรคในภายหลังได้ และจากคุณสมบัติของ tetracycline (TC) ที่เป็นยาครอบจักรวาล ถ้าตรวจพบในระดับ 5-7 มิลลิกรัมต่อลิตร จะไปฆ่าเชื้อที่มีอยู่ในสภาวะปกติในร่างกาย (normal flora) อันเป็นเหตุให้เกิดการติดเชื้อชนิดอื่นๆ ที่เป็นอันตรายมากขึ้น (superinfectious) ในลำไส้ใหญ่ ทำให้มีอาการท้องเดิน มีไข้จากเชื้อ *Staphylococci* เกิดการติดเชื้อรา *Candida albicans* ในช่องปาก ลำคอ ช่องคลอด หรือทางเดินอาหาร โดยทำให้เชื้อที่ไวต่อยาลดจำนวนลง เช่น แบคทีเรียพวก aerobic และ anaerobic ส่วนเชื้อที่ดื้อยาจะมีจำนวนมากขึ้น เช่น พวก *Enterococci*, *Proteus* และ ยีสต์ ซึ่งเป็นอันตรายมาก แต่เมื่อหยุดยา สภาวะปกติของเชื้ออาจจะกลับคืนสู่สภาวะปกติได้ ส่วนอาการรุนแรงที่เกิดขึ้น แล้วแต่ชนิดของเชื้อ เช่น พบว่าเชื้อ *Staphylococcus* ในทางเดินอาหารที่เกิดในเด็ก มักจะทำให้เด็กท้องร่วง และถ้าเป็นมากๆ อาจถึงตายได้ อาการเป็นพิษต่อระบบทางเดินอาหารคือ ทำให้เกิดการระคายเคืองต่อทางเดินอาหาร เช่น อาจจะเกิดอาการปวดแสบ และจุกเสียดลิ้นปี่ คลื่นไส้อาเจียน ท้องร่วงได้ อาจเป็นพิษต่อไต ทำให้เป็นโรคไตได้ เรียกว่า กลุ่มอาการแฟนโคนี่ (Fanconi syndrome) นอกจากนี้มีผลต่อกระดูกและฟัน โดย TC จะไปจับกับแคลเซียมที่กระดูกและฟัน ยับยั้งการเจริญของกระดูกและฟัน สารที่เกาะบริเวณฟันจะทำให้ฟันเปลี่ยนสีอย่างถาวรเป็นสีน้ำตาลและเมื่อถูกแสงสีน้ำตาลจะยิ่งเข้มขึ้น เนื่องจากสารกลุ่มนี้สามารถผ่านรกได้ ดังนั้นจึงไม่ควรใช้ยาในหญิงที่ตั้งครรภ์ตั้งแต่ 4 เดือนขึ้นไป และในเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 6 ปีนอกจากนี้สาร TCs ทุกชนิดยังทำให้ผิวหนังแพ้ต่อแสง ผิวไหม้ และรู้สึกชาบริเวณที่

ถูกแสง เป็นต้น การแพ้ยา TC อาจทำให้เกิดอาการคัน หืด หน้าบวม แต่มีไม่มากและยังอาจเป็นพิษต่อตับได้อีกด้วย [19]

จากสาเหตุดังกล่าวทำให้แต่ละประเทศให้ความสำคัญเรื่องความปลอดภัยของอาหาร โดยต้องมีการหยุดการใช้ยาภายในเวลาที่กำหนด (withdrawal time) ก่อนการส่งออกหรือวางจำหน่ายผลิตภัณฑ์ (ตารางที่ 2.2) เพราะหากตรวจพบยาปฏิชีวนะเกินมาตรฐานที่กำหนด (ตารางที่ 2.3) สินค้าทั้งหมดก็จะถูกปฏิเสธ ทำให้กระทบ กระเทือน ต่อเศรษฐกิจของประเทศ ดังนั้นต้องสามารถตรวจสอบยาปฏิชีวนะแล้วมีค่าไม่เกินค่ามาตรฐานที่กำหนดไว้

ตารางที่ 2.2 ระยะเวลาที่หยุดให้สารปฏิชีวนะในกลุ่มเททระไซคลินก่อนส่งโรงฆ่าของสัตว์ชนิดต่างๆ

สาร	ระยะเวลาที่หยุดให้สารก่อนส่งโรงฆ่า (วัน)		
	โค	สุกร	ไก่
TC-HCl	5	4	-
OTC-HCl	7	26	0
CTC-HCl	3	5	1

หมายเหตุ สัญลักษณ์ (-) ไม่มีรายงาน ที่มา: [17]

ตารางที่ 2.3 มาตรฐานปริมาณของยากลุ่มเททระไซคลินที่มนุษย์จะรับได้ในแต่ละวัน (ADI) และระดับสูงสุดที่อนุญาตให้ตรวจพบได้ในอาหาร (MRLs)

ผลิตภัณฑ์อาหาร	ADI	MRLs (mg/kg)			
		U.S. tolerance[1]	EU[2]	Codex[3]	ประเทศไทย[3]
กล้ามเนื้อ	3 μg/kg ต่อน้ำหนักตัวผู้บริโภค	2	0.1	0.2	0.2
ตับ		6	0.3	0.6	0.6
ไต		12	0.6	1.2	1.2
ไข่		-	0.2	0.2	0.4
นม		0.3	0.1	0.1	0.1
น้ำผึ้ง		-	-	-	0.025

หมายเหตุ 1: TC

2: ผลรวมของสารในกลุ่ม TCs

3: TC/CTC/OTC อย่างหนึ่งอย่างใดหรือผลรวมของยาทั้ง 3 ชนิด

ที่มา: [2, 3, 13]

2.1.5 การตรวจวิเคราะห์เททระไซคลิน

2.1.5.1 การตรวจวิเคราะห์เททระไซคลินด้วยวิธีทางเคมี

เนื่องจาก TC เป็นยาปฏิชีวนะที่มีการนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ทำให้เกิดการตกค้างในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ จึงต้องมีการตรวจหาการตกค้างของ TC ด้วยเทคนิคต่างๆ การตรวจวิเคราะห์เททระไซคลินโดยวิธีทางเคมีนั้นสามารถทำได้หลายเทคนิคดังแสดงในตาราง 2.4 โดยเทคนิคทางเคมีที่เป็นที่นิยม คือ เทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) เป็นเทคนิคที่มีความไวสูง ให้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้องแม่นยำ แต่เทคนิคนี้ต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์แต่ละตัวอย่างนาน จึงทำการตรวจตัวอย่างได้น้อย ต้นทุนในการวิเคราะห์มีราคาสูง เนื่องจากเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้มีราคาแพง อีกทั้งจำเป็นต้องวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ และต้องอาศัยผู้ชำนาญการในการวิเคราะห์อีกด้วย ทำให้ไม่เหมาะกับการตรวจคัดกรองตัวอย่างจำนวนมาก

ตารางที่ 2.4 การตรวจวิเคราะห์เททระไซคลินด้วยวิธีทางเคมี

เทคนิค	ค่า LOD (ppb)	ตัวอย่าง	เอกสารอ้างอิง
HPLC-FL	110	น้ำผึ้ง	[20]
	750	นมพร่องมันเนยและนมที่มีไขมัน	[21]
HPLC-ESI-TOF-MS	0.05	น้ำผึ้ง	[22]
HPLC-UV	50	น้ำผึ้ง	[23]
	12		[24].
	0.02		[22]
HPLC-DAD	113.2 และ 107.7	นมวัวและกล้ามเนื้อ	[5]
	22	ปลา	[25]
LC-UV	15	น้ำผึ้ง	[4]

หมายเหตุ Detector: Fl: fluorescence, ESI-TOF-MS: diode array electrospray time-of-flight- mass spectrometry, UV: Ultraviolet, DAD: diode array detector, LOD: limited of detection

2.1.5.2 การตรวจวิเคราะห์เททระไซคลินโดยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา

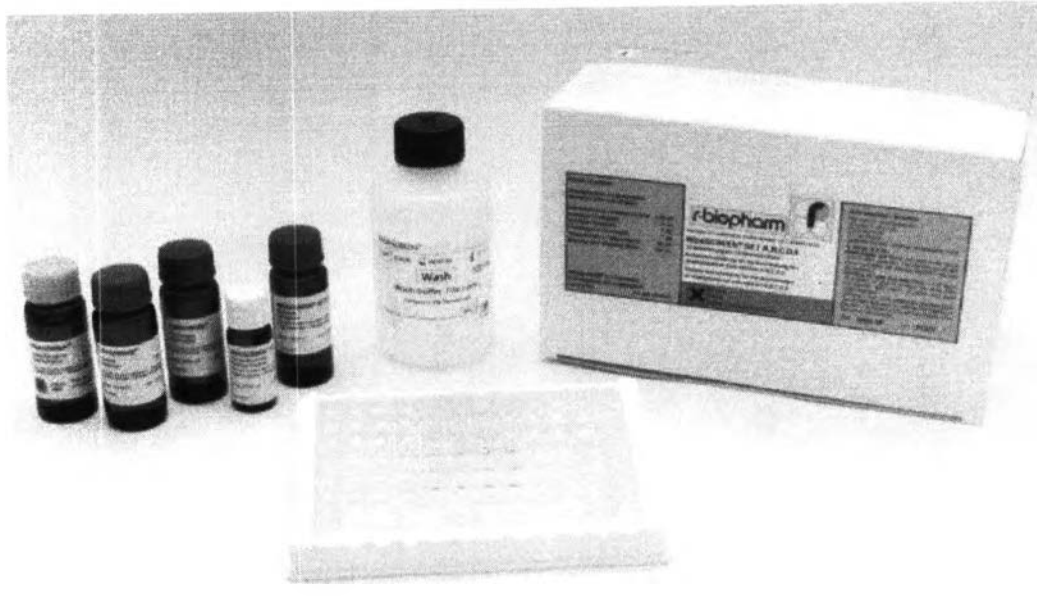
เทคนิคทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยามีความสะดวกในการนำไปใช้ตรวจคัดกรองนอกสถานที่ และประหยัดกว่าเทคนิคทางเคมีดังที่กล่าวไปเบื้องต้น จึงทำให้เทคนิคทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยาเป็นที่นิยมใช้กัน ในปัจจุบันการวิเคราะห์ที่อาศัยวิธีทางอิมมูโนวิทยา (immunological method) ได้แก่ วิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) ที่เป็น immunochromatographic assay (strip test) หรือ sensor chip [26] เทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่มีความไวสูง ให้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้องแม่นยำ และมีความจำเพาะ (specificity) สูง เนื่องจากอาศัยการจับกันของแอนติเจนกับแอนติบอดี [27] สามารถตรวจเททระไซคลิน ได้ในระดับพิโคกรัม (picogram) และนาโนกรัม (nanogram)

ส่วนหลักการของเทคนิค ELISA นั้นอาศัยหลักการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน คือ เททระไซคลินกับแอนติบอดีต่อเททระไซคลินซึ่งมีการติดฉลากด้วยเอนไซม์แทนสาร

กัมมันตภาพรังสี โดยใช้แอนติเจนหรือแอนติบอดีเคลือบติดกับพื้นผิว (solid support) ทำให้เกิดการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ตรวจวัดการจับกันของเอนไซม์ที่ติดฉลากกับแอนติเจนหรือแอนติบอดี ซึ่งเอนไซม์จะเป็นตัวช่วยในการขยายความสามารถในการตรวจสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่เกิดขึ้น จึงเป็นปฏิกิริยาที่มีความไว ความจำเพาะสูง และมีการจับกันอย่างเหนียวแน่น (high affinity) เทคนิค ELISA นี้เป็นวิธีที่อาศัยปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันมีความนิยมมากในปัจจุบัน สามารถใช้ในการวัดระดับสารที่ต้องการตรวจวัดได้อย่างแม่นยำ มีความจำเพาะและความไวสูง สะดวก ใช้งานได้ง่าย ไม่เป็นพิษกับสิ่งแวดล้อม ความถูกต้องสูงให้ผลการตรวจวัดใกล้เคียงกับการตรวจวัดด้วยวิธีทางเคมี แต่ใช้เวลาน้อยและวิเคราะห์ตัวอย่างได้คราวละมากๆ และมีการใช้อย่างแพร่หลาย [28]

เนื่องจากเทคนิค ELISA มีข้อดีในการใช้ตรวจคัดกรองตัวอย่างก่อนส่งตรวจด้วยเทคนิคทางเคมี จึงมีชุดตรวจสอบ TC ออกมาจำนวนมาก ซึ่งในประเทศไทยมีการนำเข้ามาจำหน่าย ตัวอย่างเช่น ชุดตรวจวินิจฉัยสำเร็จรูปยี่ห้อ RIDASCREEN® Tetracycline (รูปที่ 2.4) ที่เป็น indirect ELISA ใช้ตรวจตัวอย่างเนื้อสัตว์ น้ำนม และน้ำผึ้ง ราคาชุดละประมาณ 20,000 – 30,000 บาท [6] มีอายุการใช้งานประมาณ 6 เดือน ถึง 1 ปี สามารถตรวจสาร tetracycline และ rolitetracycline ได้ในระดับ 1.5 ppb ในน้ำนม 15 ppb ในน้ำผึ้ง และ 6 ppb ในเนื้อสัตว์ เกิดการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่ม TCs เท่ากับ 5-125% [29]

ส่วนอีกยี่ห้อ คือ MaxSignal® Tetracyclinerecovery ที่เป็น indirect ELISA มีอายุการใช้งานประมาณ 1 ปีเมื่อเก็บ ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส ใช้ตรวจตัวอย่างเนื้อสัตว์และน้ำผึ้งได้ต่ำสุดที่ 2 และ 2.5 ppb เกิดการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่ม TCs เท่ากับ 6-122% [30]



รูปที่ 2.4 ชุดตรวจวินิจฉัยสำเร็จรูปยี่ห้อ RIDASCREEN® Tetracycline

2.1.6 สถานการณ์และทิศทางการพัฒนาชุดตรวจสอบในประเทศไทย

ประเทศสหรัฐอเมริกาและเยอรมัน เป็นผู้ผลิตชุดตรวจสอบรายใหญ่ที่สุดของโลก (ดังตารางที่ 2.5)

ตารางที่ 2.5 ประเทศผู้ผลิตและผู้ใช้ชุดตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์รายใหญ่ของโลก

ประเทศ	ตลาดด้านการผลิตคิดเป็นร้อยละของมูลค่าตลาดโลก	ตลาดด้านการใช้คิดเป็นร้อยละของมูลค่าตลาดโลก
สหรัฐอเมริกา	48	45
เยอรมัน	29	10
สหภาพยุโรป (ยกเว้นเยอรมัน)	15	22
ประเทศอื่น	8	23

แหล่งข้อมูล : The Theta reports diagnostic market and technology trends: year 2000 and beyond 2000 [18]

โดยประเทศไทยก็เป็นประเทศหนึ่งที่สั่งซื้อชุดตรวจสอบจากต่างประเทศรวมมูลค่ามหาศาลในแต่ละปีและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ประเทศไทยมีการนำเข้าชุดตรวจสอบร้อยละ 95 โดยมีการผลิตภายในประเทศน้อยกว่าร้อยละ 5 ซึ่งส่วนใหญ่ใช้งานด้านการแพทย์ ด้านปศุสัตว์ ด้านสิ่งแวดล้อม และการใช้งานทางการเกษตร เพื่อวินิจฉัยการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร และตรวจสอบสารตกค้างในอาหารด้วย ปัจจุบันมีความตื่นตัวที่จะทำการวิจัยและพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยอยู่พอสมควร เนื่องจากชุดตรวจวินิจฉัยโดยหลักการวิทยาภูมิคุ้มกัน มีการใช้กันอย่างกว้างขวางสามารถนำไปใช้งานได้ทันที โดยไม่ต้องทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมอีก โดยระยะที่ผ่านมามีการพัฒนาอย่างก้าวกระโดดร่วมกับเทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ ทำให้สามารถพัฒนาการผลิตแอนติบอดี และแอนติเจนที่ใช้เป็นส่วนประกอบสำคัญในชุดตรวจที่มีคุณภาพดีขึ้นอย่างชัดเจน รวมถึงการพัฒนาชนิดและคุณภาพของเทคโนโลยีในการวัดและตรวจจับสัญญาณ (signal detection) ที่เกิดจาก

ปฏิกิริยาที่เกิดระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีด้วย ร่วมกับการพัฒนาการเพิ่มความไวของการตรวจวัดอีกด้วย [18] ชุดตรวจสอบที่ใช้ในปัจจุบันมีราคาต่อหน่วยค่อนข้างสูง (รูปที่ 2.5) จากสถานการณ์นี้ทำให้มีความสนใจที่จะทำการพัฒนาและผลิตชุดตรวจวินิจฉัยมากขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากมีโอกาสพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่มีราคาเหมาะสมต่อการใช้งานในสภาวะที่เหมาะกับภูมิภาคและอาจจะสามารถส่งออกไปยังต่างประเทศได้

การวิจัยและพัฒนาชุดตรวจสอบอย่างเป็นระบบ จะทำให้ประเทศไทยสามารถที่จะวิจัยพัฒนาและผลิตชุดตรวจสอบคุณภาพสูงได้ในระดับหนึ่ง ซึ่งจะเป็นผลดีต่อเศรษฐกิจ สุขภาพอนามัยสังคม รวมทั้งต่อการพัฒนาทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีของชาติ อันจะเป็นพื้นฐานของการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพในด้านอื่นๆ ต่อไป [18]

2.1.7 หลักการ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

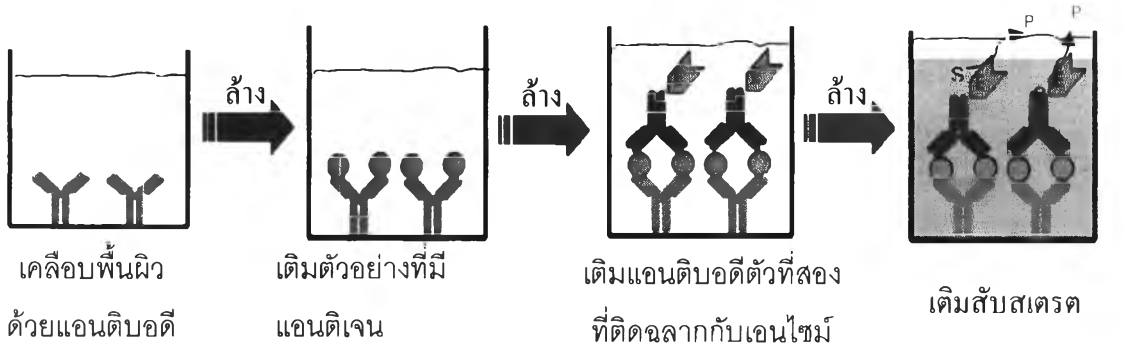
การตรวจที่อาศัยหลักการทางภูมิคุ้มกันวิทยาที่นิยมใช้มากในปัจจุบัน คือ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) หรือ enzyme immunoassay (EIA) ซึ่งใช้แอนติเจนหรือแอนติบอดีเคลือบติดพื้นผิว และตรวจวัดสัญญาณจากปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่ติดฉลากบนแอนติเจนหรือแอนติบอดี วิธี ELISA ได้พัฒนาต่อมาจาก radioimmunoassay (RIA) โดยเปลี่ยนจากการติดฉลากด้วยสารรังสี เป็นการติดฉลากด้วยเอนไซม์ แล้วตรวจวัดปฏิกิริยาด้วยสารที่เป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์และเปลี่ยนสีได้เมื่อกลายเป็นผลิตภัณฑ์ การเปลี่ยนจากสารรังสีมาเป็นเอนไซม์นี้ทำให้การตรวจมีความสะดวกมากขึ้น ไม่ต้องใช้รังสีที่มีอันตราย ทิ้งของเสียได้ง่ายขึ้น และชุดตรวจมีอายุการใช้งานได้นาน เพราะไม่มีการหมดอายุของสารรังสี การพัฒนา ELISA รูปแบบต่างๆทำให้สามารถใช้เทคนิคนี้ในการตรวจสอบทั้งแอนติเจนและแอนติบอดีในแง่คุณภาพหรือปริมาณได้ การตรวจสอบในเชิงปริมาณสามารถทำได้โดยใช้แอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ทราบปริมาณเตรียมเป็นกราฟมาตรฐานสำหรับเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากตัวอย่าง [18] กลไกการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี แบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ competitive ELISA และ non competitive ELISA

2.1.7.1 non competitive ELISA

การทดสอบนี้สามารถใช้ตรวจสอบหาแอนติบอดีและแอนติเจน โดยอาจแบ่งได้เป็น 2 ประเภทหลัก คือ

ก. direct ELISA

หลักการแสดงในรูปที่ 2.5 คือเคลือบจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการตรวจหาในตัวอย่าง เมื่อเติมสิ่งส่งตรวจที่มีแอนติเจน พร้อมกับเติมแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ แอนติเจนทั้งสองจะจับกับแอนติบอดีดังกล่าว จากนั้นล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก แล้วจึงเติมแอนติบอดี ซึ่งมีความจำเพาะต่อแอนติเจน ที่ต้องการตรวจและติดฉลากด้วยเอนไซม์ลงไปในปริมาณที่มากพอ ซึ่งจะไปทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่จับกับแอนติบอดีตัวแรก จากนั้นล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก เติมสับสเตรตของเอนไซม์ แล้วนำไปวัดปริมาณสีที่เกิดขึ้น การเปลี่ยนแปลงสีของสับสเตรต จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของแอนติเจนในตัวอย่างที่ตรวจสอบ อาจเรียกวิธีนี้ว่า sandwich ELISA

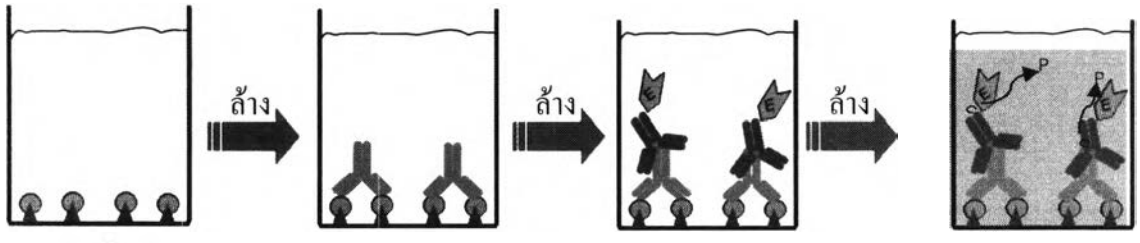


รูปที่ 2.5 หลักการของ direct ELISA

ข. indirect ELISA

หลักการแสดงในรูปที่ 2.6 คือ ดัดแปลงวิธี direct ELISA ให้มีความสะดวกมากขึ้น โดยใช้แอนติบอดีจำเพาะที่ไม่ได้ติดด้วยเอนไซม์ และใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลินติดฉลากด้วยเอนไซม์ (secondary antibody) โดยแอนติบอดีตัวที่สองนี้ จะจับแบบจำเพาะกับแอนติบอดีตัวแรก เพื่อวัดปริมาณของแอนติบอดีตัวแรกซึ่งจับกับแอนติเจนที่ต้องการตรวจ หลังจากล้างส่วนที่ไม่ทำ

ปฏิกิริยาออก การเปลี่ยนแปลงสีของสับสเตรตจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของแอนติบอดีในตัวอย่างที่ตรวจสอบ



เคลือบพื้นผิว ด้วยแอนติเจน | เติมแอนติบอดีที่ จำเพาะ | เติมแอนติบอดีตัวที่สอง ที่ติดฉลากกับเอนไซม์ | เติมสับสเตรต

รูปที่ 2.6 หลักการของ indirect ELISA

2.1.7.2 competitive ELISA

เป็นวิธีการทดสอบที่มักจะใช้สำหรับการตรวจหาแอนติเจนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลน้อย โดยอาศัยการใช้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์หรือใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์เป็นตัวกระทำในการทดสอบ

ก. competitive ELISA ซึ่งใช้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์

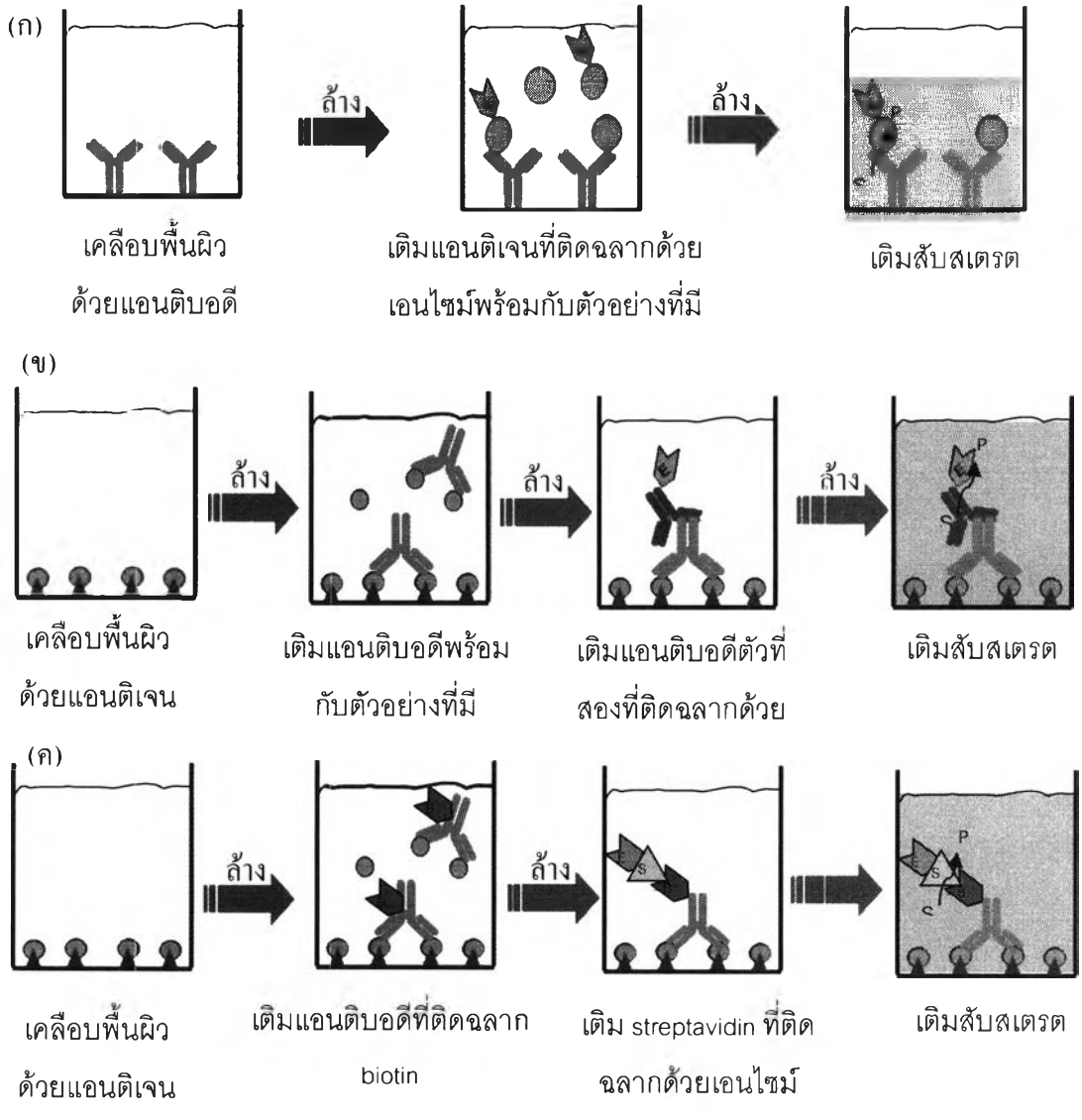
วิธีการทดสอบนี้มีหลักการดังแสดงในรูป 2.7 ก ในการทดสอบจะเคลือบจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมด้วยแอนติบอดี แล้วเติมแอนติเจนติดฉลากด้วยเอนไซม์ซึ่งจำเพาะต่อแอนติบอดีที่เคลือบอยู่ พร้อมกับเติมตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบหาปริมาณแอนติเจน หรือเติมพร้อมกับแอนติเจนมาตรฐาน ซึ่งจำเพาะกับแอนติบอดีนั้นแต่ไม่ได้ติดฉลากด้วยเอนไซม์ หากมีแอนติเจนในตัวอย่างจะเกิดการแย่งจับกับแอนติบอดีที่พื้นผิวระหว่างแอนติเจนกับแอนติเจนที่ติดฉลาก ทำให้แอนติเจนติดฉลากที่เติมลงไปส่วนหนึ่งจับกับแอนติบอดีได้น้อย แล้วล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก เติมสับสเตรตของเอนไซม์แล้วนำไปวัดปริมาณสีที่เกิดขึ้น การเปลี่ยนแปลงสีของ สับสเตรตจะแปรผกผันกับปริมาณของแอนติเจนในตัวอย่างที่ตรวจสอบ

ข. competitive ELISA ซึ่งใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์

วิธีการทดสอบนี้มีหลักการดังแสดงในรูป 2.7 ข จะทำการเคลือบจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมด้วยแอนติเจน แล้วเติมแอนติบอดีติดฉลากด้วยเอนไซม์ซึ่งจำเพาะต่อแอนติเจนที่เคลือบอยู่ พร้อมกับเติมตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบหาปริมาณแอนติเจน หรือเติมพร้อมกับแอนติเจนมาตรฐาน ซึ่งจำเพาะกับแอนติบอดีนั้นแต่ไม่ได้ติดฉลากด้วยเอนไซม์ แอนติบอดีที่ติดฉลากจะเกิดการแย่งจับระหว่างแอนติเจนในตัวอย่างกับแอนติเจนที่เคลือบบนพื้นผิว แล้วล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก เติมสับสเตรตของเอนไซม์แล้วนำไปวัดปริมาณสีที่เกิดขึ้น การเปลี่ยนแปลงสีของสับสเตรตจะแปรผกผันกับปริมาณของแอนติเจนในตัวอย่างที่ตรวจสอบ

นอกจากนี้สามารถเตรียมชุดตรวจสอบแบบ competitive ELISA โดยอาศัยการจับกันระหว่าง biotin และ streptavidin ซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์ (รูปที่ 2.7 ค)โดยทำการเคลือบจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมด้วยแอนติเจน แล้วเติมแอนติบอดีติดฉลากด้วย biotin ซึ่งจำเพาะต่อแอนติเจนที่เคลือบอยู่ พร้อมกับเติมตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบหาปริมาณแอนติเจน หรือเติมพร้อมกับแอนติเจนมาตรฐาน ซึ่งจำเพาะกับแอนติบอดีนั้นแต่ไม่ได้ติดฉลากด้วย biotin แอนติบอดีที่ติดฉลากจะเกิดการแย่งจับระหว่างแอนติเจนในตัวอย่างกับแอนติเจนที่เคลือบบนพื้นผิว แล้วล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก เติม streptavidin ซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์ แล้วล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก เติมสับสเตรตของเอนไซม์แล้วนำไปวัดปริมาณสีที่เกิดขึ้น การเปลี่ยนแปลงสีของสับสเตรตจะแปรผกผันกับปริมาณของแอนติเจนในตัวอย่างที่ตรวจสอบ

หอสมุดกลาง สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.7 หลักการของ Competitive ELISA (ก) ใช้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (ข) ใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (ค) ใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วย biotin

(หมายเหตุ คือแอนติบอดี, คือแอนติเจนเชื่อมโปรตีน, คือแอนติเจนอิสระ คือแอนติบอดีตัวที่สองติดฉลากด้วยเอนไซม์, คือแอนติบอดีติดฉลากด้วย biotin คือ streptavidin ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์)

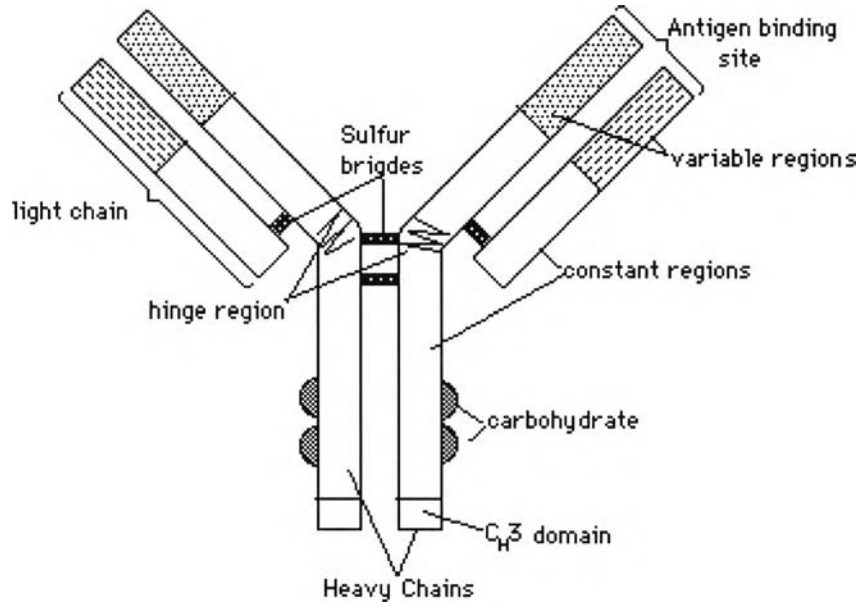
2.1.8 องค์ประกอบที่สำคัญของชุดตรวจ ELISA

2.1.8.1 แอนติเจน (antigen, Ag)

แอนติเจนเป็นปัจจัยสำคัญที่กำหนดความจำเพาะของการตรวจหาแอนติบอดี เนื่องจากในชุดตรวจโดยหลักการวิทยาภูมิคุ้มกันนั้นอาศัยปฏิกิริยาการจับกันแบบจำเพาะระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีเป็นกลไกหลักในการตรวจ ซึ่งจับกับแอนติบอดีได้ดีและสามารถสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะได้ง่าย คุณสมบัติของแอนติเจนสำหรับชุดตรวจวินิจฉัยโดยวิธีทางภูมิคุมกันวิทยา คือ ความจำเพาะ (specificity) ความบริสุทธิ์ (purity) ความคงรูปโครงสร้างของแอนติเจนให้สามารถจับกับแอนติบอดีที่ต้องการได้ (structural integrity) ความสามารถในการผลิตปริมาณมาก (up-scale production) และมีคุณภาพคงที่ (sustainability) [18]

2.1.8.2 แอนติบอดี (antibody, Ab)

แอนติบอดีหรืออิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin, Ig) เป็นไกลโคโปรตีนที่ทำหน้าที่จับกับแอนติเจนตรงบริเวณจำเพาะของโมเลกุลแอนติเจน ที่เรียกว่าอิพิโทป (epitope) สร้างจากเม็ดเลือดขาวชนิดบี-ลิมโฟไซต์ ที่เปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่หลั่งแอนติบอดีเรียกว่า พลาสมาเซลล์ แอนติบอดีที่หลั่งเข้าสู่กระแสเลือดจะทำหน้าที่เป็นตัวจักรสำคัญของระบบภูมิคุ้มกันแบบหลั่งแอนติบอดี (humoral immunity) โครงสร้างของแอนติบอดี (รูปที่ 2.8) ซึ่งความแตกต่างระหว่างพอลีโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดีแสดงดังตารางที่ 2.6



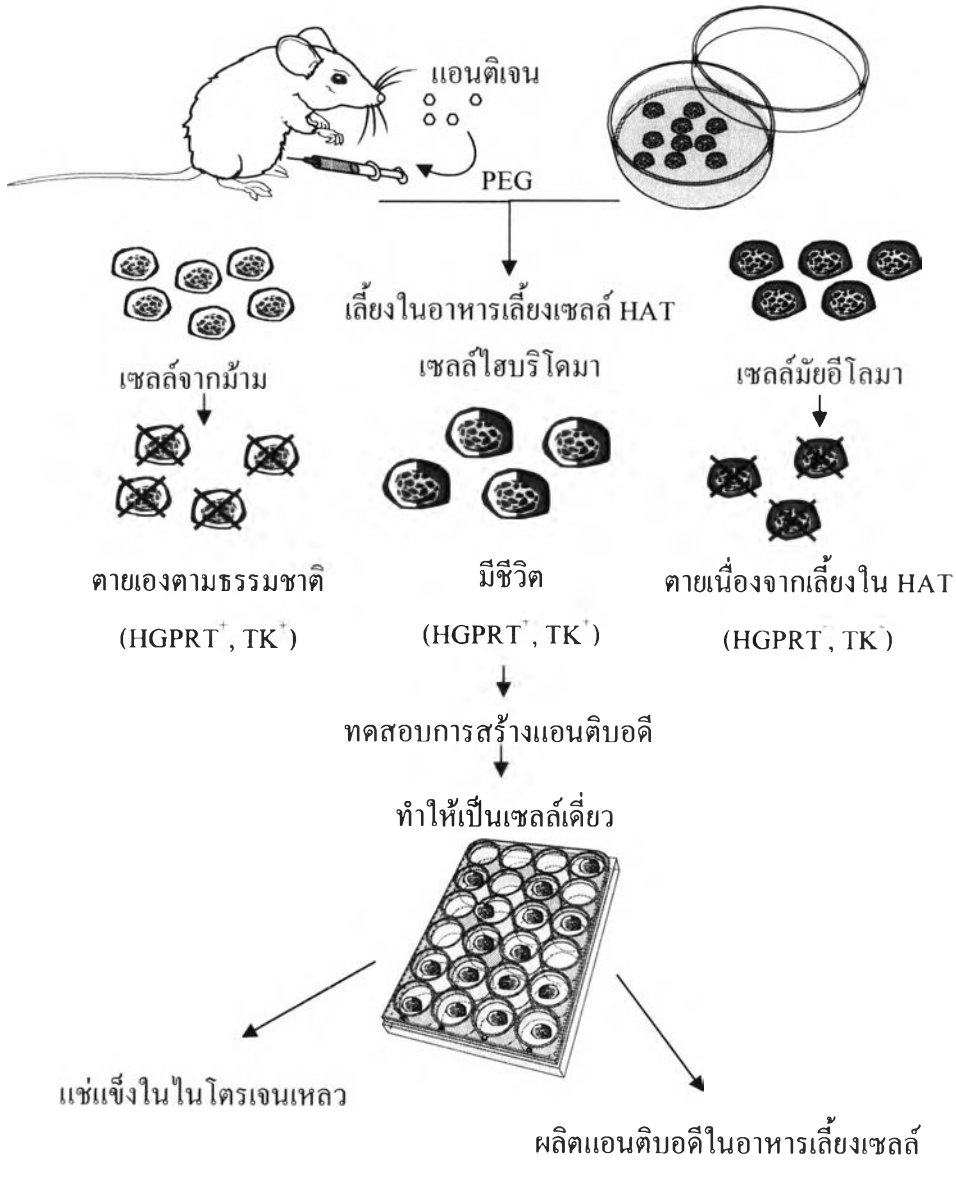
รูปที่ 2.8 โครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบูลิน โปรตีนสายสั้น (light chain) และโปรตีนสายยาว (heavy chain) แต่ละโมเลกุลประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีความแปรปรวนสูง (variable region) ซึ่งมีความแตกต่างกันในแอนติบอดีแต่ละชนิด เป็นบริเวณที่จับกับแอนติเจน (antigen binding site) ส่วนบริเวณที่เหลือเป็นบริเวณคงที่ (constant region) ซึ่งมีความแตกต่างกันตามชนิดของโปรตีน โปรตีนสายยาวจะมีบริเวณข้อพับ (hinge region) [31]

ตารางที่ 2.6 คุณสมบัติและข้อจำกัดในการผลิตระหว่างพอลิโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดี [31]

คุณสมบัติ	พอลิโคลนอลแอนติบอดี	โมโนโคลนอลแอนติบอดี
ความจำเพาะ (specificity)	ความจำเพาะต่ำเกิดการทำปฏิกิริยาข้ามได้กับสารอื่นๆได้	ความจำเพาะสูงเนื่องจากจำเพาะต่ออิพิโทปเดียวเท่านั้น
สัมพรรคภาพ (affinity)	จับได้หลายอิพิโทปต่อแอนติเจน	จับได้อิพิโทปเดียว
ความเข้มข้นแอนติบอดีที่ผลิต	ประมาณ 1 mg/ml	ประมาณ 100-200 µg/ml เมื่อเลี้ยงในถังปฏิกรณ์แบบปั่นกวน
ปริมาณที่ผลิตได้	ประมาณ 100 ml จากซีรัมของกระต่าย	ขึ้นกับขนาดเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ
ความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีที่ผลิต	ขึ้นอยู่กับแอนติเจนที่ใช้กระตุ้นจึงจำเป็นต้องทำให้บริสุทธิ์	จำเพาะกับอิพิโทปเดียวจึงไม่จำเป็นต้องทำให้บริสุทธิ์
เวลาที่ใช้ในการผลิต	ไม่เกิน 6 สัปดาห์	อย่างน้อย 4 เดือน
ต้นทุนในการผลิต	ต่ำ	สูง โดยเฉพาะในเวลาเริ่มต้น
ข้อดีหลัก	ต้นทุนต่ำ ง่ายต่อการผลิต	มีความจำเพาะสูง ขยายขนาดการผลิตได้โดยปรับภาวะการผลิตได้
ข้อเสียหลัก	คุณภาพแอนติบอดีในแต่ละครั้งไม่เหมือนกัน	เสียเวลาและแรงงานในการผลิตมาก

2.1.8.2.1. แหล่งกำเนิดและวิธีการผลิต

โมโนโคลนอลแอนติบอดี ไม่ว่าจะผลิตจากวิธี somatic hybridization หรือโดยวิธีทางพันธุวิศวกรรมก็ตาม ต้องอาศัยเทคโนโลยีจำเพาะ และต้องใช้กระบวนการทางห้องปฏิบัติการที่ซับซ้อน ซึ่งขั้นตอนเหล่านี้มีค่าใช้จ่ายสูงเมื่อเทียบกับการผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งผลิตโดยการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของคนหรือสัตว์ทดลองด้วยแอนติเจน ให้สร้างแอนติบอดีที่ต้องการออกมาในกระแสเลือด หลังจากนั้นจึงแยกแอนติบอดีออกจากซีรัม การผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดี จึงมีค่าใช้จ่ายน้อยกว่าและทำได้ง่ายกว่า อย่างไรก็ตามพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตในสัตว์ต่างชนิดหรือแม้แต่ในสัตว์ชนิดเดียวกันแต่คนละตัวกันก็อาจได้แอนติบอดีที่แตกต่างกันทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ นอกจากนี้พอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้แต่ละครั้งจะมีปริมาณจำกัดและอาจต้องใช้คนหรือสัตว์จำนวนมาก ดังนั้นในการผลิตจึงต้องมีวิธีการควบคุมคุณภาพของพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นทุกๆ ครั้ง ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้น สามารถผลิตได้อย่างไม่จำกัดในด้านปริมาณและคุณภาพ (รูปที่ 2.9) โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์นี้ไปเรื่อยๆ รวมทั้งมีความสะดวกในการควบคุมคุณภาพที่ดีกว่า เนื่องจากทั้งยีนและเซลล์ที่ผลิตแอนติบอดีนั้นจะถูกเก็บรักษาไว้ได้ตลอดไป ในระยะยาวค่าใช้จ่ายในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจึงอาจจะไม่สูงมากนัก [18]



รูปที่ 2.9 ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีในหนูทดลอง [15]

2.1.8.2.2. ความจำเพาะต่อแอนติเจน (Antigen specificity)

ชุดตรวจวินิจฉัยส่วนใหญ่ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีเป็นส่วนประกอบหลัก เนื่องจากมีความจำเพาะแอนติเจนสูงกว่าพอลิโคลนอลแอนติบอดีมาก เนื่องจากผลิตจากเซลล์ที่มีต้นกำเนิดจากเซลล์เดียวกัน จึงมีโมเลกุลของแอนติบอดีที่สร้างขึ้นเหมือนกันทุกประการ ทำให้มีความจำเพาะต่ออิพิโทปเดียว ส่วนพอลิโคลนอลแอนติบอดีประกอบด้วยแอนติบอดีหลายชนิดประกอบกัน โดยที่แต่ละโมเลกุลมีความจำเพาะต่ออิพิโทป แตกต่างกันได้ ซึ่งทำให้พอลิโคลนอลแอนติบอดีที่เตรียมจากเลือดของมนุษย์หรือสัตว์ มีความจำเพาะต่อหลายอิพิโทป บนโมเลกุลของแอนติเจน เมื่อเปรียบเทียบความจำเพาะและปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) ระหว่างพอลีโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดีแล้วจะเห็นได้ว่าพอลีโคลนอลแอนติบอดีมีโอกาสที่จะเกิดปฏิกิริยาข้ามได้มากกว่า [18]

2.1.8.2.3 ความเหนียวแน่นในการจับกับแอนติเจน (Affinity) และอะวิดิตี (Avidity) ของแอนติบอดี

affinity และ avidity เป็นคุณสมบัติของแอนติบอดีแต่ละโมเลกุลโดย ค่า affinity เป็นความเหนียวแน่นของการจับ (strength of binding) ระหว่างอิพิโทปของแอนติเจน กับแขนข้างหนึ่งของแอนติบอดี (monovalent binding site) ส่วน avidity เป็นความเหนียวแน่นของการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีทั้งโมเลกุล (overall strength of binding) คุณสมบัติภายในของแอนติบอดีแต่ละโมเลกุล กำหนดโดยลักษณะโครงสร้างของส่วนที่ใช้จับกับแอนติเจนของโมเลกุลอิมมูโนโกลบูลิน ซึ่งก็คือส่วนของบริเวณแปรผัน (variable region) นั่นเอง affinity เป็นคุณลักษณะจำเพาะของแอนติบอดีแต่ละชนิดและเป็นผลของขบวนการที่เกิดในธรรมชาติ โดยในระหว่างพัฒนาการของบีลิมโฟไซต์ จะมีการจัดเรียงตัวใหม่ (rearrange) ของยีนอิมมูโนโกลบูลินในแบบต่างๆ ทำให้เกิดแอนติบอดีที่มี affinity มากน้อยต่างกันได้

ดังนั้นการผลิตชุดตรวจวินิจฉัยมักจะต้องการโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มี affinity สูง เพื่อให้สามารถจับกับแอนติเจนได้อย่างเหนียวแน่น ดีมากน้อยเพียงใดก็ขึ้นอยู่กับวิธีการในการคัดเลือกเซลล์ต้นกำเนิดของโมโนโคนอลแอนติบอดีนั้น นอกจากนี้วิธีทางพันธุวิศวกรรม ทำให้สามารถเปลี่ยนแปลง affinity ของแอนติบอดีนั้นๆ ได้ โดยการเปลี่ยนแปลงที่ระดับยีนของอิมมูโนโกลบูลิน ทำให้ได้แอนติบอดีที่มี affinity ดีขึ้นกว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จาก บีลิมโฟไซต์ ที่สร้างแอนติบอดีขึ้นเองตามธรรมชาติ ส่วนพอลิโคลนอลแอนติบอดีนั้น avidity และ affinity นี้เป็นผล

เฉลี่ยที่เป็นผลรวมของแอนติบอดีแต่ละโมเลกุลที่ประกอบกันขึ้นมาเป็นพอลิโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งก็มักอยู่ในระดับปานกลางแต่สามารถเพิ่มให้ดีได้ โดยดัดแปลงขั้นตอนการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและขั้นตอนการทำให้พอลิโคลนอลแอนติบอดีมีความบริสุทธิ์มากขึ้น [18]

2.1.8.2.4 หน้าที่การทำงานของแอนติบอดี (Effector function)

หน้าที่และความสามารถในการทำงานของแอนติบอดี ขึ้นกับโครงสร้างโมเลกุลส่วน heavy chain constant region ว่าเป็นชนิด class หรือ subclass โดย effector function เป็นคุณสมบัติทางชีวภาพของแอนติบอดีแต่ละชนิด ได้แก่ ความสามารถในการกระตุ้นคอมพลีเมนต์ การจับกับที่รับสำหรับส่วน Fc ของผิวเซลล์ชนิดต่างๆ ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้แตกต่างกันไปในแต่ละ isotype และ subclass ของอิมมูโนโกลบูลินนั้นๆ โมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละตัวจะมี effector function ซึ่งมีลักษณะเฉพาะตัว โดยมีส่วน heavy chain ชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น ส่วนพอลิโคลนอลแอนติบอดี มักจะมีความสามารถในด้าน effector function ในระดับปานกลางถึงดีในทุกด้านเนื่องจากอาศัยคุณสมบัติของแอนติบอดีหลาย ๆ ชนิดมาเฉลี่ยกัน [18]

2.1.8.3 เอนไซม์และระบบการตรวจวัดปฏิกิริยา (Detection system)

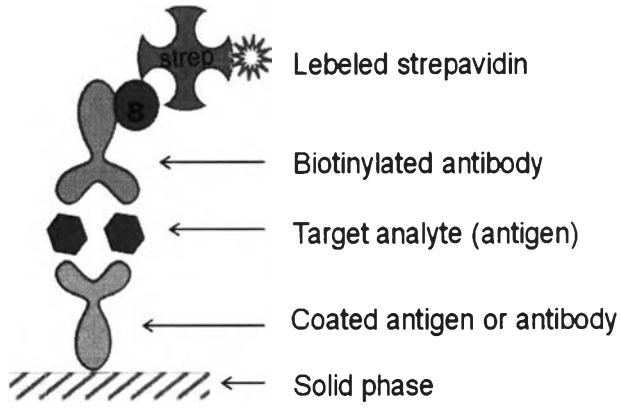
เอนไซม์เป็นสารสำคัญที่ใช้ในชุดตรวจโดยหลักการวิทยาภูมิคุ้มกัน เป็นส่วนของระบบการตรวจวัดปฏิกิริยา ใช้โดยการเชื่อม (conjugate) หรือติดฉลาก (label) เอนไซม์เข้ากับแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ใช้เป็นตัวตรวจวัด เอนไซม์ที่นิยมใช้กันมากในชุดตรวจสอบมี 2 ชนิด คือ Horseradish Peroxidase (HRP) และ Alkaline Phosphatase (AP) เนื่องจากมีคุณสมบัติเหมาะสมกับชุดตรวจสอบเกือบทุกรูปแบบ ชุดตรวจโดยหลักการวิทยาภูมิคุ้มกันที่ใช้ในปัจจุบัน อาศัยการทำปฏิกิริยาจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ซึ่งสามารถตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยอาศัยเอนไซม์และสับสเตรต ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปจนสามารถตรวจวัดได้ เช่น เปลี่ยนสีหรือสามารถดูดกลืนแสงในความยาวคลื่นจำเพาะได้ การเปลี่ยนสีหรือคุณสมบัติของ สับสเตรต นี้จึงเป็นตัวบ่งบอกว่าเกิดการจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี โดยระบบนี้ มักจะตรวจวัดสีที่เกิดขึ้น (colorimetry) โดยอ่านค่าเป็นการดูดกลืนแสง (Absorbance หรือ Optical Density, O.D.) ซึ่งเป็นระบบการตรวจวัดหลักของวิธี ELISA นอกจากนี้อาจสามารถเพิ่มความแรงของสัญญาณการตรวจวัดปฏิกิริยาทำให้ชุดตรวจมีความไวสูงขึ้น โดยอาศัยการจับกันระหว่าง biotin และ streptavidin ซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์ เนื่องจากระบบ

ของ biotin-streptavidin มีสัมพรรคภาพสูงกว่าแอนติบอดีกับแอนติเจน นิยมใช้มากในกรณีที่ต้องการเพิ่มความแรงของสัญญาณให้สามารถตรวจหาสารที่มีปริมาณต่ำได้

biotin-streptavidin อาศัยคุณสมบัติของ biotin ที่สามารถจับกับ streptavidin ได้อย่างแน่นมาก (Kd = 10^{-15} M) ซึ่งมากกว่า affinity ของแอนติเจนและแอนติบอดีโดยเฉลี่ย จึงเป็น detection system ที่มีความไวสูง และใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา ค่อนข้างสั้น (รูปที่ 2.10)

biotin เป็นสารขนาดโมเลกุลเล็กที่มีอยู่ในธรรมชาติ ทำหน้าที่เป็น coenzyme โดยเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ carboxylase โครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วย imidazolinone ring เชื่อมกับ thiophan ring ที่มี valerate side chain สามารถเชื่อมต่อกับ biotin conjugate ค่อนข้างง่ายและได้ผลดี

สารกลุ่ม streptavidin ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยในปัจจุบันได้จากการคัดแปลงโมเลกุลจากสารตั้งต้นที่มีอยู่ในธรรมชาติ 2 แหล่ง คือ avidin และ streptavidin โดย avidin เป็นไกลโคโปรตีนจากไข่ขาว ประกอบด้วย tetramer ที่แต่ละหน่วยสามารถจับ biotin 1 โมเลกุล ทำให้ avidin 1 โมเลกุล สามรถจับกับ 4 โมเลกุล biotin ส่วน streptavidin เป็นโปรตีนซึ่งมีคุณสมบัติเป็นยาปฏิชีวนะ (antibiotics) สร้างโดยเชื้อยีสต์ *Streptomyces* หลายชนิด โดยเฉพาะ *Streptomyces avidinii* มีโครงสร้างสามมิติที่คล้ายกับ avidin และสามารถจับกับ biotin ได้ดีเช่นกัน แต่ streptavidin มีค่า pI ต่ำกว่าและไม่มี carbohydrate group ทำให้มี non-specific binding น้อยกว่า avidin ระบบการตรวจที่ใช้ biotin-streptavidin มีความไวสูง เพราะเกิดการขยายสัญญาณได้ เนื่องจาก biotin มี multiple binding site กับโปรตีนและ streptavidin มี multiple lebeling site นอกจากนี้ยังมี non-specific binding ต่ำ ทำให้ background level ต่ำ [18]



รูปที่ 2.10 ตัวอย่างของ biotin- streptavidin system

2.1.8.4 พื้นผิวสำหรับการยึดตรึง

ชุดตรวจโดยหลักการวิทยาภูมิคุ้มกันที่ใช้ในปัจจุบัน นิยมใช้การเคลือบแอนติเจนหรือแอนติบอดีเข้ากับพื้นผิวในรูปแบบของ solid phase ก่อน เรียกว่า การเคลือบ (coating) หรือ การตรึง (mobilization) หลังจากนั้นจึงทำปฏิกิริยาตามลำดับขั้นตอน แล้วอ่านผลของปฏิกิริยานั้น การใช้ solid phase ยึดตรึงสามารถช่วยให้ขั้นตอนการล้างเอาสารเกินออกได้ดี ทำให้ลดการเกิด background signal ได้ดี และอ่านผลของปฏิกิริยาได้สะดวกขึ้น ซึ่งรูปแบบการใช้ผิวสำหรับยึดตรึงในชุด ELISA มีหลายแบบ ที่เป็นมาตรฐานในปัจจุบัน คือ จานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม หรือ microtitre plate หรือ 96 well-plate ทำจากพลาสติกชนิด polystyrene เป็น พอลิเมอร์แบบ organic ที่มี hydrophobic surface สามารถจับกับแอนติเจนและแอนติบอดีได้ดีและค่อนข้างเกาะ เป็นเนื้อเดียวตลอดพื้นที่ การเคลือบที่ได้มีความเสถียร เมื่อทำใน microtitre plate จะมีคุณสมบัติในการโปร่งแสงที่ดี ทำให้สามารถใช้กับครื่องอ่าน spectrophotometer ได้สะดวก นอกจากรูปแบบที่เป็นเพลทแล้ว อาจใช้หลอด (tube) เม็ด (bead และ microsphere) หรือใช้ membrane ชนิดต่างๆ

2.1.8.5 สับสเตรต (substrate)

การวัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่มีการติดฉลากด้วยเอนไซม์ จะต้องใช้สับสเตรต เป็นตัววัดสามารถเลือกใช้ได้ ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ ซึ่งมีหลายวิธี เช่น colorimetry, fluorometry และ chemiluminescence แต่วิธีที่ได้รับความนิยมมากที่สุด คือ วิธี colorimetry วิธีนี้เป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงสีของสับสเตรต ที่เกิดจากเอนไซม์ แล้วทำการอ่านผลด้วยเครื่องมือที่อ่านค่าการดูดกลืนแสง electrophotometer หรือ ELISA reader substrate ที่ทำให้เกิดสีนี้เรียกว่า chromogenic substrate ซึ่งเดิมไม่มีสีแต่เมื่อทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ทำให้สีเข้มขึ้น โดยสับสเตรต แต่ละชนิดจะอ่านผลค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแตกต่างกัน และการใช้สับสเตรตขึ้นอยู่กับเอนไซม์ที่ใช้ในการตรวจวัดด้วย เช่น เมื่อใช้เอนไซม์ horseradish peroxidase สับสเตรตที่ใช้ได้แก่ ABTS (2, 2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate)) เปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีเขียว อ่านผลที่ค่าการดูดกลืนแสง 415 นาโนเมตร, TMB (3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine) เปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีฟ้า และเมื่อหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดจะมีสีเหลือง อ่านผลที่ค่าการดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร และ OPD (o-phenylenediamine) เปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นส้มหรือสีน้ำตาล อ่านผลที่ค่าการดูดกลืนแสง 492 นาโนเมตร ส่วนเอนไซม์ alkaline phosphatase สับสเตรตที่ใช้ ได้แก่ PNP (p-nitrophenyl phosphate) อ่านผลที่ค่าการดูดกลืนแสง 405 นาโนเมตร, PMP (Phenolphthalein monophosphate) อ่านผลที่ค่าการดูดกลืนแสง 550 นาโนเมตร และ 1NP (1-napthyl phosphate) อ่านผลที่ค่าการดูดกลืนแสง 405 นาโนเมตร

2.1.8.6 การประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ (performance)

ข้อมูลสำคัญที่แสดงถึงประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบโดยวิธีทางด้านวิทยาภูมิคุ้มกัน ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ

1. ความไว (sensitivity) บ่งบอกความสามารถที่จะตรวจพบสารในปริมาณต่ำสุด (lower limit of detection, LOD) ที่สามารถวัดได้ด้วยชุดตรวจสอบนั้น

2. ความแม่นยำ (precision) บ่งบอกความสามารถที่จะให้ผลเหมือนกันเมื่อทดสอบหลายๆ ครั้ง โดยทั่วไปจะระบุเป็น %CV (percent coefficient of variation) และ SD (standard deviation)

3. ความถูกต้อง (accuracy) บ่งบอกความสามารถที่จะให้ผลใกล้เคียงกับค่าจริงหรือค่ามาตรฐาน โดยทั่วไปจะระบุเป็น %recovery

2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันมีการตรวจสอบสารตกค้างของยาปฏิชีวนะหลายชนิดในน้ำผึ้ง โดย TCs ก็เป็นยาปฏิชีวนะชนิดหนึ่งที่ใช้เพื่อกำจัด *Bacillus larvae* และ *Streptococcus pluton* ที่เป็นศัตรูทำลายตัวอ่อนผึ้ง โดยก่อให้เกิดโรค American Foul Brood (AFB) และ European Foul Brood (EFB) โดยมีรายงานการตรวจพบยา TC ในปริมาณ 20-50% ของน้ำผึ้งทั้งหมดจากประเทศฝรั่งเศส เบลเยียม และสวิสเซอร์แลนด์ [32] ดังนั้นจึงมีการกำหนดระยะเวลาหยุดใช้ยาในประเทศสหรัฐอเมริกาไว้ที่ 4 สัปดาห์ แต่ในยุโรปยังไม่มีการกำหนดระยะเวลาการหยุดใช้ยาและค่า MRL ของ TCs ในน้ำผึ้งอย่างชัดเจน ดังนั้นค่า MRL จึงแตกต่างกันในแต่ละประเทศ โดยในประเทศสวิสเซอร์แลนด์กำหนดค่า MRL สำหรับ TCs ในน้ำผึ้งที่ 20 ppb [22] ประเทศออสเตรเลีย แคนาดาและเกาหลี 300 ppb สเปน เบลเยียม และ ชิลี เท่ากับ 100, 100 และ 80 ppb ตามลำดับ [23], [33, 34] ส่วนในประเทศไทยไม่อนุญาตให้ตกค้างในน้ำผึ้งเกิน 25 ppb [3]

ที่ผ่านมา radioimmunoassay (RIA) เป็นเทคนิคที่นิยมในช่วงแรกๆ ของเทคนิคทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยา มีการนำมาใช้ตรวจสอบยา TC โดย [12] ได้ผลิตแอนติบอดีต่อ TC โดยทำการเชื่อม TC-HCl เข้ากับ BSA โดยปฏิกิริยา Mannich แล้วฉีดเข้ากระต่าย หลังจากนั้นนำพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาตรวจวัดสาร TC โดยใช้วิธี RIA โดยใช้ตัวแข่งขันที่เป็น [^{3}H] TC พบว่าสามารถตรวจสอบสาร TC ได้ โดยมีค่า LOD ในการวัด และค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้เกิดการยับยั้งลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (50% of inhibition concentration, IC_{50}) เท่ากับ 1 และ 7 ppb ตามลำดับ สามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกับ OTC และ CTC 10 และ 39 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ นำไปตรวจสอบ TC ในตัวอย่างพลาสมาและปัสสาวะของสุนัข พบว่ามี % recovery อยู่ระหว่าง 90 ถึง 95% แต่เนื่องจากเทคนิคนี้ต้องใช้เครื่องมือในการตรวจวัดสารกัมมันตภาพรังสี ซึ่งต้องทำในห้องปฏิบัติการเท่านั้น และอาจก่อให้เกิดปัญหาเกี่ยวกับการใช้และการจัดการของเสียปนเปื้อนจากสารกัมมันตภาพรังสี [35]

ต่อมามีการใช้ชุดตรวจสอบ ELISA ในการตรวจสอบสารเททระไซคลิน TC, OTC และ CTC ที่ตกค้างในพลาสมาของสุกรที่ยังมีชีวิตอยู่ พบปริมาณ TC, OTC และ CTC ที่ตรวจวัดได้น้อยที่สุดของชุดตรวจสอบนี้ คือ 50, 10 และ 100 ppb ตามลำดับ ทำการให้ TC ทางปากสุกร 100 มิลลิกรัมต่อน้ำ 1 ลิตรต่อวัน ฉีด OTC เข้าทางกล้ามเนื้อสุกร 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมสุกรต่อวัน และให้ CTC ทางปากสุกร 1.1 กรัมต่อกิโลกรัมอาหารสัตว์ต่อวัน เป็นเวลา 5 วัน ตรวจสอบโดยนำพลาสมาจากที่ได้จากเลือด

สุกรมาทำ ELISA พบว่าไม่สามารถตรวจสอบ TC, OTC และ CTC ที่ตกค้างอยู่ในเลือดเมื่อเลิกให้ยา 3, 8 และ 4 วันได้ [10]

ในปี 2007 ได้พัฒนาการใช้เทคนิค indirect competitive ELISA (icELISA) ในการตรวจสอบ TC ในน้ำผึ้งโดยใช้พอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกระต่ายด้วยสารในกลุ่ม TCs ที่ถูกทำให้เป็นสารอนุพันธุ์ของ carboxamido และ diazo ก่อนจะเชื่อมต่อกับโปรตีนพาหะ เมื่อนำพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบโดยวิธี icELISA พบค่า LOD เท่ากับ 0.4 ppb เกิดการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่ม TCs คือ RTC, OTC, MC และ CTC ถึง 91, 30, 14 และ 10 % ตามลำดับ และสามารถใช้ในน้ำผึ้งตัวอย่างได้ % recovery อยู่ระหว่าง 79 ถึง 108 % [13]

และในปีเดียวกันได้มีการพัฒนาการใช้เทคนิค ELISA ในการตรวจสอบ TC ในน้ำนมโดยใช้พอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกระต่ายด้วย TC ที่ใช้วิธีในการเชื่อมต่อกับโปรตีนพาหะที่แตกต่างกัน 3 วิธี เมื่อนำพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบโดยวิธี icELISA พบว่ามี IC_{50} เท่ากับ 3930 ppb เกิดการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่ม TCs คือ CTC ถึง 112% และ OTC มากกว่า 2% และสามารถนำไปตรวจในน้ำนมตัวอย่างได้ % recovery อยู่ระหว่าง 74 ถึง 116 % [36]

ต่อมาในปี 2008 มีการใช้พอลิโคลนอลแอนติบอดี ในการตรวจสารตกค้างของ TC ในน้ำผึ้ง โดยมีการพัฒนาสัญญาณ โดยใช้ biotin-avidin และใช้ PBS-EDTA pH 7.2 เป็นตัวละลายน้ำผึ้ง และเป็นตัวละลาย standard TC พบว่าปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้ และ ช่วงความเข้มข้นที่สามารถตรวจได้ (dynamic range) ของ TC เท่ากับ 0.19 ppb และ 1.52 -152 ppb ตามลำดับ ไม่เกิดการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่ม TCs และสามารถนำไปตรวจในน้ำผึ้งตัวอย่างได้ % recovery อยู่ระหว่าง 95 ถึง 101% [37]

และในปีเดียวกันก็ยังใช้พอลิโคลนอลแอนติบอดี ในการตรวจสารตกค้างของ TC น้ำนม โดยใช้ biotin-avidin และ PBS-EDTA pH 7.2 เป็นตัวละลายน้ำนม และเป็นตัวละลาย standard TC พบว่าปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (limit of detection, LOD) และ dynamic range ของ TC เท่ากับ 0.048 ppb และ 0.316 -316 ppb ตามลำดับ เกิดการทำปฏิกิริยาข้ามกับสาร CTC, OTC และ DC เท่ากับ 13.7, 10 และน้อยกว่า 1% ตามลำดับ สามารถนำไปตรวจในน้ำนมตัวอย่างได้ % recovery ประมาณ 90% [34]

การใช้เทคนิค HPLC ที่มีเครื่องตรวจวัดแบบ UV เพื่อตรวจสอบสาร OTC ในน้ำผึ้งโดยสกัดสารตัวอย่างที่ตกค้างด้วย Na_2-EDTA-McIlvaline buffer, pH 4.0 โดยใช้ cationic SPE (solid -phase extraction) โดย เตรียม Oasis MCX column ด้วย methanol 2 มิลลิลิตร ตามด้วยน้ำ milli-Q 2 มิลลิลิตร เทสารตัวอย่างลงไป จากนั้นล้างด้วย HCl 0.1 โมลาร์ และ เมทานอล 1 มิลลิลิตร ทำให้แห้งเป็นเวลา 2 นาที และชะออกด้วยแอมโมเนีย: เมทานอล (5: 95 ปริมาตรต่อปริมาตร) 8 มิลลิลิตร นำไประเหยแห้งด้วยก๊าซไนโตรเจนแล้วปรับปริมาตรด้วย น้ำ milli-Q 1 มิลลิลิตร และกรองผ่าน กระดาษ 0.45 ไมโครเมตร ก่อนนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC mobile phase ที่เหมาะสมคือสารละลาย oxalate buffer: methanol: acetonitrile (45: 40: 15 ปริมาตรต่อปริมาตร) โดยใช้คอลัมน์ R C_{18} Nucleocil ฉีดปริมาตร 20 ไมโครลิตร อัตราการไหลที่ 1.4 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ความยาวคลื่น 356 นาโนเมตร พบ retention time ที่ 12.7 นาที ช่วงกราฟมาตรฐานอยู่ในช่วง 200 -1000 ppb และเมื่อวิเคราะห์ สารที่ความเข้มข้น 100, 500 และ 1000 ppb พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ recovery เฉลี่ยอยู่ที่ 90.7, 78.2 และ 84.9% ตามลำดับ และความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้คือ 25 ppb [33]

ซึ่งจากข้อได้เปรียบของวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยาที่สามารถตรวจสอบสารตกค้างได้ไวและใช้งานสะดวก มีรายงานว่ามีการใช้เทคนิคนี้ตรวจยา TC ในผลิตภัณฑ์จากสัตว์อย่างมากมาย คือ เนื้อหมู เนื้อไก่ วัวควาย ไก่งวง น้ำนม น้ำผึ้ง รวมถึงน้ำและดิน รวมทั้งชุดตรวจสอบแบบนี้ยังสามารถนำมาตรวจสอบนอกห้องปฏิบัติการได้ จึงนำมาใช้ในฟาร์มได้ เป็นการตรวจสอบสารตกค้างเบื้องต้นก่อนจะส่งตรวจทางเคมีต่อไป ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายในการตรวจตัวอย่างได้อย่างมาก [1, 37, 38]

เนื่องจากชุดตรวจ ELISA kit ตรวจ TC ที่ใช้อยู่ภายในประเทศต้องนำเข้าจากต่างประเทศและมีราคาสูง งานวิจัยครั้งนี้จึงมีเป้าหมาย ที่จะพัฒนาชุดตรวจสอบ TC โดยใช้เทคนิคELISA เพื่อให้ได้ชุดตรวจสอบสำหรับใช้ภายในประเทศ ซึ่งสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพ และวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ประสบความสำเร็จในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ TC ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร TC จำนวน 3 โคลน คือ 7-C4, 12-3F และ 5-9H มีไอโซไทป์เป็น IgG_1, IgG_{2a} และ IgG_1 ตามลำดับ โดยฉีดกระตุ้นหนูด้วย สาร TC ที่เชื่อมต่อกับโปรตีน BSA และแอนติบอดีที่ได้มีค่า LOD เท่ากับ 2, 16 และ 56 ppb ตามลำดับ โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่ม TCs ที่นำมาทดสอบ คือ OTC, CTC, DC และ RTC อยู่ในช่วง 2-307% และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารปฏิชีวนะในกลุ่มอื่น จึงเหมาะสำหรับนำมา

พัฒนาเป็นชุดตรวจสอบสารกลุ่ม TC ในลักษณะ generic test kit เพื่อให้ได้ชุดตรวจสอบที่มีคุณภาพต่อไป

I26976780