สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ความปลอดภัยด้านอาหาร (food safety) เป็นสิ่งสำคัญที่ควรคำนึงถึงสำหรับผู้บริโภคและผู้ส่งออกสินค้า เนื่องจากปัจจุบันปัญหาด้านสารพิษตกค้างในอาหารมีมาก ไม่ว่าจะเป็น ยาปฏิชีวนะที่เกิดจากการใช้รักษาโรคสัตว์ หรือสารเร่งเนื้อแดง เพื่อใช้เพิ่มปริมาณผลผลิตในเนื้อสัตว์ ซึ่งส่งผลเสียโดยตรงต่อผู้บริโภค ดังนั้นสินค้าคุณภาพดีต้องปราศจากสารตกค้างดังกล่าว ยาปฏิชีวนะกลุ่มยาเททระไซคลิน (Tetracyclines, TCs) จัดเป็นยาที่ใช้แพร่หลายในปศุสัตว์ จัดอยู่ในกลุ่มที่มีขอบเขตออกฤทธิ์กว้าง (broad spectrum antibiotics) มีคุณสมบัติยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ใช้เพื่อป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อในสัตว์ หากมีการใช้ในระยะยาวโดยไม่หยุดยาตามระยะเวลาที่กำหนดก็จะเกิดการสะสมของยาในอวัยวะต่างๆ ของสัตว์หรือผลิตภัณฑ์สัตว์ หากผู้บริโภครับประทานอาหารที่มีสารตกค้างเข้าไปก็จะเกิดอาการแพ้ยา หรือในรายที่มีอาการแพ้ขั้นรุนแรงก็อาจถึงเสียชีวิตในที่สุด นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดปัญหาการดื้อยาของแบคทีเรียตามมาอีกด้วย [1] จากสาเหตุดังกล่าวทำให้แต่ละประเทศให้ความสำคัญเรื่องความปลอดภัยของอาหารโดยต้องมีการหยุดการใช้ยาภายในเวลาที่กำหนดก่อนการส่งออกหรือวางจำหน่ายผลิตภัณฑ์เพราะหากตรวจพบยาปฏิชีวนะเกินมาตรฐานที่กำหนดสินค้าทั้งหมดก็จะถูกปฏิเสธ ทำให้กระทบกระเทือนต่อเศรษฐกิจของประเทศ นอกจากนี้หน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับความปลอดภัยของอาหารยังได้กำหนดค่าจำกัดของปริมาณสารที่ตกค้างได้สูงสุด (Maximum Residue Limit, MRL)ในผลิตภัณฑ์สัตว์ต่าง ๆ เพื่อการบริโภค [2, 3]

ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการตรวจวิเคราะห์หาสารตกค้างของเททระไซคลินในอาหารก่อนจะนำมาใช้บริโภคหรือส่งออก โดยอาจใช้การตรวจด้วยวิธีทางเคมี คือ โครมาโตกราฟี เช่น liquid chromatography (LC) [4] high-performance liquid chromatography UV detection (HPLC-UV), high-performance liquid chromatography diode array detection (HPLC-DAD) [5] high-performance liquid chromatography mass spectrometry (HPLC- MS) การตรวจสอบด้วยวิธีเหล่านี้มีมีความไว ความถูกต้องและความแม่นยำสูง แต่การตรวจวิเคราะห์ทางเคมีนี้ยังต้องใช้เวลานานในการเตรียมตัวอย่าง

เพื่อการวิเคราะห์เพราะจำเป็นต้องมีการทำความสะอาดและการสกัดตัวอย่างให้มีความบริสุทธิ์สูงจึงทำให้ใช้เวลานานในการวิเคราะห์ตัวอย่าง ไม่เหมาะสำหรับการตรวจคัดกรองตัวอย่างจำนวนมาก อีกทั้งเครื่องมือและอุปกรณ์มีราคาแพง ทำให้มีค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ตัวอย่างเททระไซคลิน สูงถึง 2,500 บาท ต่อหนึ่งตัวอย่าง [6] และต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญที่มีความเชี่ยวชาญสูงในการใช้เครื่องมือ ปัจจุบันเทคนิคที่นิยมใช้วิเคราะห์สารเททระไซคลินในตัวอย่างจำนวนมาก คือ วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา หรือ การตรวจสอบด้วยเทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) [7-9] [1, 10-14] เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง ในการตรวจวิเคราะห์ทางกายภาพ ชีวภาพ และ ตัวอย่างต่างๆ จากสิ่งแวดล้อม รวมถึงสารตกค้างในสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย มีความจำเพาะสูง ไม่ต้องมีขั้นตอนการสกัดตัวอย่างที่ยุ่งยากและใช้เวลานาน จึงสามารถตรวจตัวอย่างได้ปริมาณมากในแต่ละครั้ง อีกทั้งให้ความถูกต้องแม่นยำสูงเทียบเท่ากับวิธีทางเคมี ในขณะเดียวกันเมื่อทำเป็นชุดตรวจสอบ ก็จะมีน้ำหนักเบา ขนาดเล็ก เคลื่อนย้ายสะดวก มีค่าใช้จ่ายที่ต่ำกว่า สะดวก ใช้ง่ายไม่ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญสูงเหมือนวิธีทางเคมี ทำให้มีความสนใจที่จะทำการพัฒนาและผลิตชุดตรวจวินิจฉัยมากขึ้นเรื่อยๆ อย่างไรก็ตามปัจจุบันประเทศไทยต้องสั่งชุดตรวจสอบสาร เททระไซคลิน (ELISA kit) จากต่างประเทศ โดยมีราคาสูงถึง 25,000 บาท ต่อ 1 ชุด (RIDASCREEN® Tetracycline) ดังนั้นจึงควรมีการพัฒนาชุดตรวจสอบเททระไซคลินเพื่อใช้เองภายในประเทศ ซึ่งจะทำให้ต้นทุนในการตรวจวัดการตกค้างของสารเททระไซคลินลดลงและเป็นการลดการนำเข้าสินค้าจากต่างประเทศ

ด้วยเหตุดังกล่าวงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาชุดตรวจสอบต้นแบบต่อสารเททระไซคลิน โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่ได้จากการพัฒนาของสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย [15]โดยใช้เทคนิคเอนไซม์ลิงก์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เตรียมชุดตรวจเททระไซคลิน โดยอาศัยหลักการของเอนไซม์ลิงก์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์แบบต่างๆ

1.2.2 ทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจต้นแบบและเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ด้วย LC-MS- MS

1.3 ขอบเขตและวิธีดำเนินการวิจัย

1.3.1 ค้นคว้าเอกสารและข้อมูลที่เกี่ยวข้อง

1.3.2 ผลิตโมโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเททระไซคลิน

1.3.3 ทำโมโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

1.3.4 เตรียมสารคอนจูเกตระหว่างเททระไซคลิน ฮอร์สราดิชเพอร์ออกซิเดส และเททระไซคลิน-โอวัลบูมิน

1.3.5 เตรียมและทดสอบความไวของชุดตรวจสอบเททระไซคลินแบบต่างๆ

1.3.5.1 แบบ Ag-captured direct competitive ELISA

1.3.5.2 แบบ Ag-captured direct competitive ELISA ที่เคลือบหลุมด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนู

1.3.5.3 แบบ Ab-captured indirect competitive ELISA

1.3.5.4 แบบ Ab-captured direct competitive ELISA

1.3.6 ประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบเททระไซคลินต้นแบบ

1.3.7 เปรียบเทียบการวิเคราะห์เททระไซคลินในตัวอย่างน้ำผึ้งด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบและ LC-MS-MS

1.3.8 วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผล และเขียนวิทยานิพนธ์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ชุดตรวจสอบเอนไซม์ลิงก์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ต้นแบบที่สามารถตรวจวิเคราะห์เททระไซคลินได้อย่างมีประสิทธิภาพ