



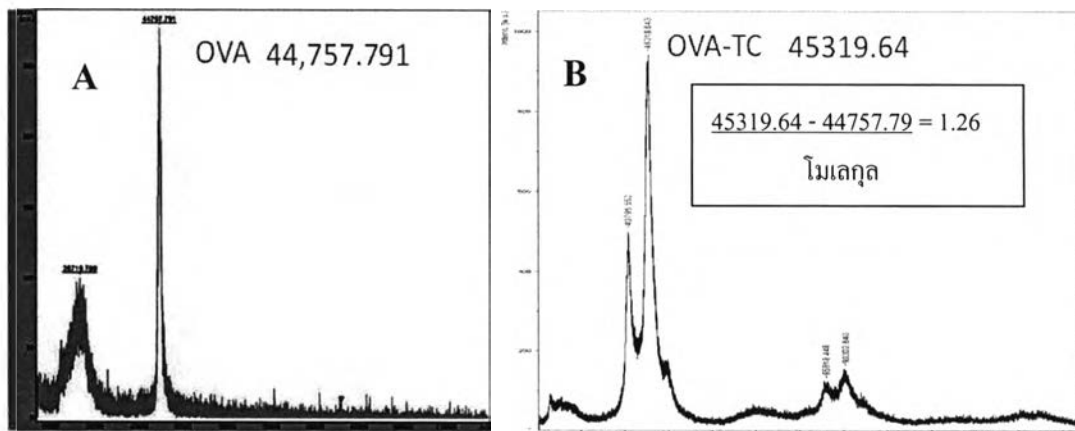
## บทที่ 4

### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 4.1 การเชื่อมต่อระหว่างเทตระไซคลินกับ OVA

ในการทำ ELISA เพื่อตรวจการสร้างแอนติบอดี ทดสอบความไวและความแม่นยำต้องใช้ TC ที่เชื่อมต่อกับ OVA จึงได้ทำการเชื่อมต่อตามวิธีในข้อ 3.4.2 รูปที่ 4.1 แสดงโครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF MS พบว่า OVA มีมวลโมเลกุล 4,4757.79 ดาลตัน และสารเชื่อมต่อที่ได้มีมวลโมเลกุล 45,319.64 ดาลตัน ซึ่งเพิ่มขึ้น 561.85 ดาลตัน เนื่องจาก TC มีมวลโมเลกุล 444.44 ดาลตัน จึงสามารถคำนวณหาอัตราส่วนโมเลกุลการเชื่อมต่อนั้นของ TC บน OVA ได้ เท่ากับ 1.26 โมเลกุล

จากการหาปริมาณโปรตีนของสารจุกัด TC-OVA ที่เตรียมได้ โดยอาศัยกราฟมาตรฐาน OVA (ภาคผนวก ก ตารางที่ ก.1 และรูป ก.1) พบว่ามีความเข้มข้นเท่ากับ 5.08 ppm (ตารางที่ 4.1) ซึ่งนำมาใช้ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 4.1 โครมาโตแกรมของ OVA (A) และ TC-OVA (B) โดยวิธี MALDI-TOF MS

ตารางที่ 4.1 ปริมาณโปรตีนของ TC-OVA ด้วยวิธี BCA

อัตราส่วนการเจือจาง OVA-TC (เท่า)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร	ปริมาณโปรตีนของ TC-OVA (ppm)
10	0.53	5.03
20	0.26	5.12
	เฉลี่ย	5.08

#### 4.2 การผลิตแอนติบอดี

นำเซลล์ไฮบริโดมารหัสโคลน 12-3F เลี้ยงในอาหารเซลล์ RPMI 1640 ที่เติม 10% FCS ทดสอบความสามารถในการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเทระไซคลิกด้วยวิธี indirect ELISA ตามข้อ 3.4.3 พบว่าในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ค่าการดูดกลืนแสงในการทำ ELISA สูงกว่าตัวควบคุมลบ คืออาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีเซลล์อยู่ แสดงให้เห็นว่ามีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ TC อยู่ (ตารางที่ 4.2)

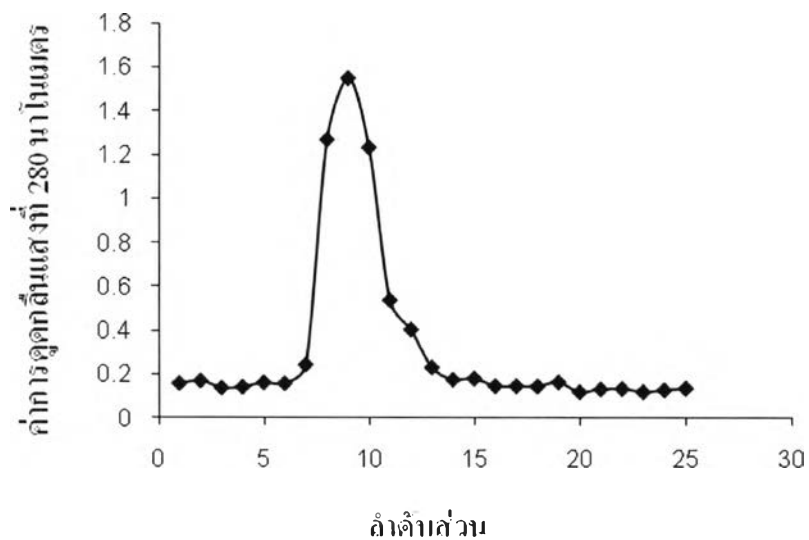
ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 12-3F ด้วยวิธี indirect ELISA

ตัวอย่าง	อัตราส่วนการเจือจาง (เท่า)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร
อาหารเลี้ยงเซลล์	1	1.038
	5	1.018
	40	1.083
	80	0.921
	100	0.915
	200	0.923
	400	0.745
	800	0.407
	1,600	0.096
	3,200	0.145
	6,400	0.078
PBS (ตัวควบคุมลบ)		0.112
RPMI 1640 media (ตัวควบคุมลบ)		0.086
ซีรัมหนูที่ฉีดกระตุ้นด้วยเทพระไซคลิน (ตัวควบคุมบวก)		1.161

#### 4.3 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยใช้โครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์สัมพรรคภาพของโปรตีนจี

เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากโคลน 12-3F มีไอโซไทป์ IgG<sub>2a</sub> ซึ่งมีสัมพรรคภาพสูงกับโปรตีนจี จึงใช้วิธีโครมาโตกราฟีแบบสัมพรรคภาพ (affinity chromatography) ซึ่งมีโปรตีนจีเซฟารอส (protein G sepharose) บรรจุอยู่ในคอลัมน์ โดยแอนติบอดีจะถูกจับอยู่ในคอลัมน์ และจะถูกชะออกมาโดยใช้บัฟเฟอร์ที่ pH 2.7 โดยเก็บที่ละส่วน (fraction) และนำมาตรวจหาปริมาณโปรตีน โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร พบว่า fraction ที่ 8-12 มีค่าการดูดกลืนแสงตั้งแต่ 0.4-1.55 (รูปที่ 4.2) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเป็นส่วนที่โปรตีนหรือแอนติบอดีถูกชะออกมา

จากนั้นนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เก็บได้ใน fraction ที่ 8-12 มารวมกันและหาค่าปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA โดยใช้กราฟมาตรฐานของ BSA (ภาคผนวก ก ตารางที่ ก.2 และรูป ก.2) พบว่าปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเซลล์โคลน 12-3F ก่อนและหลังทำให้บริสุทธิ์มีค่าเท่ากับ 5.30 ppm และ 3.67 ppm ซึ่งจะสังเกตเห็นว่าปริมาณโปรตีนก่อนทำให้บริสุทธิ์สูงกว่าหลังการทำให้บริสุทธิ์ เนื่องจากในอาหารเลี้ยงเซลล์มีการเติมซีรัมและส่วนผสมอื่นเพิ่มเติมเข้าไปเพื่อให้เซลล์เจริญเติบโตได้ดี ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณโปรตีน ส่วนในอาหารเลี้ยงเซลล์เมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วจะได้เฉพาะแอนติบอดี เนื่องจากโปรตีนจีนั้นมีความจำเพาะสูงในการจับแอนติบอดีไว้ในคอลัมน์ ทำให้ปริมาณโปรตีนของแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์มีค่าต่ำกว่าดังตารางที่ 4.3



รูปที่ 4.2 โครมาโตแกรมแสดงลำดับส่วน (fraction) และค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ของโปรตีนที่ชะออกมาจากคอลัมน์โปรตีนจี โดยใช้บัฟเฟอร์ pH 2.7 (◆)

ตารางที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนและหลังการทำ ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี BCA

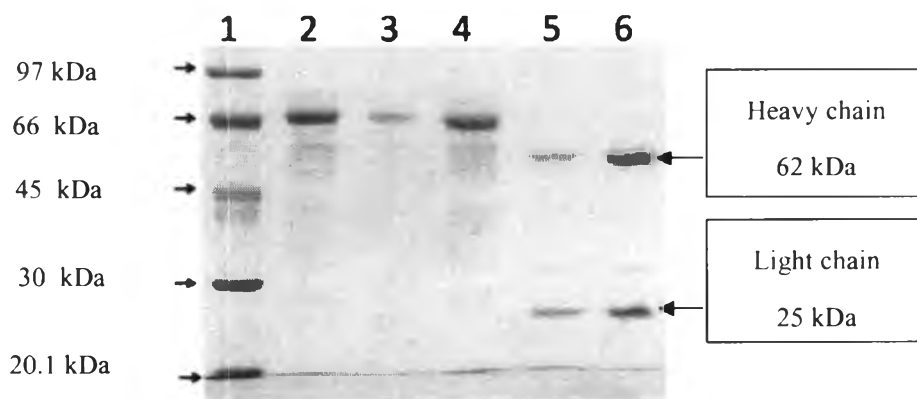
แอนติบอดี	ปริมาณโปรตีน (ppm)
ก่อนทำให้บริสุทธิ์	5.30
หลังทำให้บริสุทธิ์	3.67

#### 4.4 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ของแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์

จากการนำแอนติบอดีที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์มาวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE เทียบกับโปรตีนก่อนการทำให้บริสุทธิ์ โดยแสดงผลในตาราง 4.4 และรูปที่ 4.3 จะพบแถบโปรตีนอย่างชัดเจนที่บริเวณ 66 กิโลดาลตัน (kDa) ในตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์และแอนติบอดีก่อนทำให้บริสุทธิ์ แต่ในตัวอย่างแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จะพบแถบโปรตีน 2 แถบ คือที่ 62 และ 25 กิโลดาลตัน ทั้งนี้เนื่องมาจากในตัวอย่างก่อนการทำให้บริสุทธิ์นั้นจะมีโปรตีนจากซีรัมที่เติมลงไปในการเลี้ยงเซลล์ปนอยู่มาก แต่เมื่อนำตัวอย่างไปผ่านการทำให้บริสุทธิ์ โปรตีนเหล่านี้จะถูกกำจัดออกทำให้ไม่พบแถบของโปรตีนดังกล่าวในตัวอย่างที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ อีกทั้งยังมีการทำลายพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างโมเลกุลของแอนติบอดี ทำให้ส่วน heavy-chain และ light-chain แยกออกจากกัน ดังนั้นหลังจากการทำให้บริสุทธิ์แอนติบอดีมีความเข้มข้นขึ้นจึงพบแถบโปรตีนดังกล่าว ซึ่งขนาดของโปรตีนทั้งสองแถบนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ ชมพูนิกข์ กาญจนพังคะ (2008) และ Harlow และ Lane (1988) [15, 42] ที่พบแถบย่อย 2 แถบ คือ H-chain และ L-chain ซึ่งเป็นหน่วยย่อยของสายพอลิเพปไทด์ของแอนติบอดี

ตารางที่ 4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลและระยะทางในการเคลื่อนที่จากการทำ SDS-PAGE

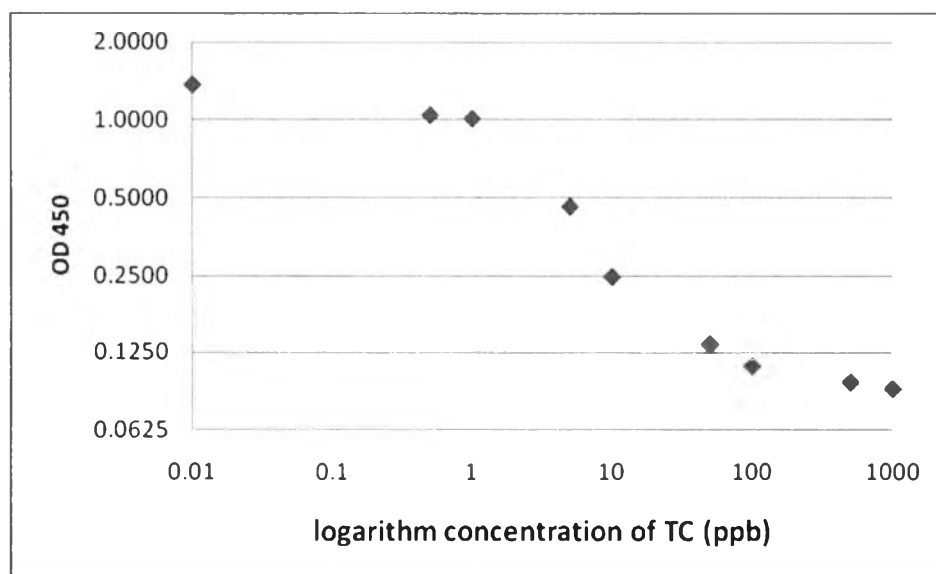
โปรตีนมาตรฐาน	มวลโมเลกุล (kDa)	ระยะทางที่เคลื่อนที่ (cm)	Relative mobility ( $R_f$ )
Phosphorylase	97.4	1.5	0.27
Bovine serum albumin	66.2	2.2	0.40
Ovalbumin	45.2	3.15	0.57
Carbonic anhydrase	31.0	4.3	0.78
Trypsin inhibitor	21.5	5.5	1.00
mAb 12-3F heavy chain	62.41	2.75	0.50
mAb 12-3F light chain	24.76	4.85	0.88



รูปที่ 4.3 ผลการทำ SDS-PAGE ช่องหมายเลข 1 คือ โปรตีนมาตรฐาน (ปริมาณ 2.5 ไมโครกรัม)  
 ช่องหมายเลข 2 คือ FBS (5 ไมโครกรัม)  
 ช่องหมายเลข 3 คือ อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา  
 ช่องหมายเลข 4 คือ แอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10% FBS (5 ไมโครกรัม)  
 ช่องหมายเลข 5 คือ แอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์แล้ว (5 ไมโครกรัม)  
 ช่องหมายเลข 6 คือ แอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์แล้ว (10 ไมโครกรัม)

#### 4.5 การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์ต่อ TC

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์มาทดสอบความสามารถในการจับกับเทระไซคลินในรูปอิสระ ด้วย Indirect competitive ELISA โดยมีตัวควบคุมลบ คือ PBS และตัวควบคุมบวก คือ ความเข้มข้นของเทระไซคลินที่ 1,000 ppb พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จะลดต่ำลงเมื่อความเข้มข้นของเทระไซคลินในรูปอิสระสูงขึ้น ดังแสดงในตารางที่ ก.3 ภาคผนวก ก และกราฟรูปที่ 4.4 แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์นั้นสามารถจับเทระไซคลินในรูปอิสระได้



รูปที่ 4.4 กราฟแสดงผลการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีบริสุทธิ์ต่อเทระไซคลินในรูปแบบอ้อมด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยเคลือบหลุมด้วย TC-OVA 5 ppm และแอนติบอดีความเข้มข้น 2 ppm

#### 4.6 การเตรียมชุดตรวจสอบ

##### 4.6.1 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Ag-captured direct competitive ELISA

###### (Direct cELISA)

##### 4.6.1.1 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแอนติบอดีกับเทระไซคลินที่เชื่อมต่อกับ HRP (TC-HRP)

ทำการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแอนติบอดีที่เคลือบหลุมกับ TC-HRP สำหรับการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ direct ELISA โดยทำการแปรค่าความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ 0.5, 1, 2.5 และ 5 ppm และใช้ความเข้มข้นของ TC-HRP อยู่ในช่วง 0.05-20 ppm โดยมีเกณฑ์ในการกำหนดอัตราส่วนที่เหมาะสม คือ อัตราส่วนที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงในการทำ direct ELISA ประมาณ 1 หรือใกล้เคียง ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.5 พบว่า ได้ความเข้มข้นของแอนติบอดีและแอนติเจนที่ให้ค่าการ



ดูคลื่นแสงที่เหมาะสม 3 อัตราส่วน โดยแอนติบอดีที่ 5, 2.5 และ 1 ppm จะใช้ TC-HRP ที่ 0.25, 0.25 และ 2.5 ppm ตามลำดับ จึงนำความเข้มข้นที่เหมาะสมดังกล่าวไปใช้ในการหาความไวของแอนติบอดีต่อเชื้อโรคในรูปอิสระต่อไป

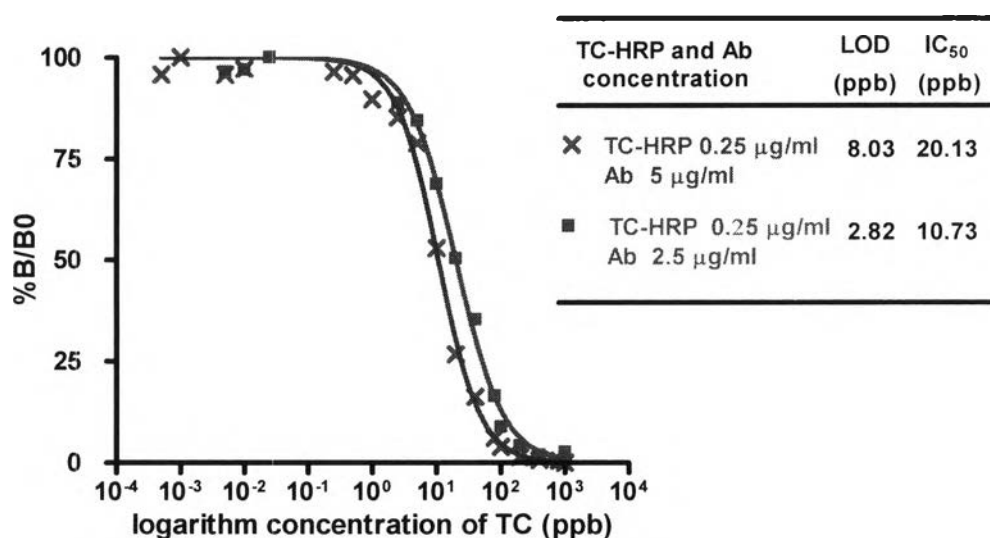
ตารางที่ 4.5 อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแอนติบอดีกับ TC-OVA ด้วยวิธี direct ELISA

ความเข้มข้นของ TC-HRP (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร			
	ความเข้มข้นของ Ab (ppm)			
	5	2.5	1	0.5
0.050	0.461	0.343	0.211	0.102
0.100	0.894	0.701	0.411	0.190
0.250	<b>1.435*</b>	<b>1.123*</b>	0.609	0.227
0.500	1.865	1.526	0.818	0.239
1.000	2.209	1.769	0.956	0.356
2.500	2.395	1.935	<b>1.072*</b>	0.487
5.000	2.460	2.125	1.339	0.626
10.000	2.511	2.218	1.476	0.770
20.000	2.507	2.212	1.595	0.980

หมายเหตุ ค่าที่แสดงโดยตัวเลขที่บ\* คือ ค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ ELISA ที่ใช้แอนติเจนและแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นที่เลือกสำหรับการทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในการจับกับเชื้อโรคในรูปอิสระ

#### 4.6.1.2 การทดสอบหาขีดความสามารถในการตรวจของชุดตรวจสอบต้นแบบ

ทดสอบหาขีดความสามารถในการตรวจของชุดตรวจสอบต้นแบบโดยใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติบอดีที่เคลือบหลุม และ TC-HRP ที่หาได้ จากข้อ 4.6.1.1 มาทดสอบกับเทระไซคลินในรูปอิสระที่ความเข้มข้น 0-1,000 ppb นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟในรูปร้อยละของอัตราส่วนระหว่าง  $B/B_0$  โดยที่ B คือค่าการดูดกลืนแสงในภาวะที่มีเทระไซคลินอิสระที่ความเข้มข้นต่างๆ และ  $B_0$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงในภาวะที่ไม่มีเทระไซคลิน จากนั้นหาค่าความไวของแอนติบอดีด้วยวิธีนี้โดยดูจากค่า  $IC_{50}$  ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของเทระไซคลินอิสระที่ให้ค่า %  $B/B_0$  เท่ากับ 50% พบว่าเมื่อใช้แอนติบอดีที่ความเข้มข้น 5 ppm และความเข้มข้นของ TC-HRP ที่ 0.25 ppm ให้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 20.13 ppb เมื่อใช้แอนติบอดีที่ความเข้มข้น 2.5 ppm และความเข้มข้นของ TC-HRP ที่ 0.25 ppm ให้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 10.73 ppb (ผลดังรูปที่ 4.5) จากการเปรียบเทียบค่า  $IC_{50}$  ที่ได้จากทั้ง 2 ภาวะ พบว่าความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ 2.5 ppm และความเข้มข้นของ TC-HRP ที่ 2.5 ppm ให้ค่า  $IC_{50}$  ต่ำที่สุด แสดงว่าความเข้มข้นดังกล่าวเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้การตรวจด้วยวิธี direct competitive ELISA มีความไวสูงสุด



รูปที่ 4.5 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีกับเทระไซคลินในรูปอิสระด้วยวิธี Ag- captured direct competitive ELISA โดยแปรอัตราส่วนระหว่างแอนติบอดีที่เคลือบหลุมกับ TC-HRP ที่ความเข้มข้น 5 และ 0.25 ppm และความเข้มข้นที่ 2.5 และ 0.25 ppm ตามลำดับ

#### 4.6.2 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Ag-captured direct competitive ELISA

(direct cELISA) ที่เคลือบ หลุม ด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนูไมซ์ (GAM)

##### 4.6.2.1 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแอนติบอดีกับ TC-HRP

ทั้งนี้เนื่องจากมีรายงานว่าการใช้แอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนูไมซ์ เคลือบหลุมก่อนเพื่อให้ส่วน Fc ของแอนติบอดีจับกับส่วนของ Fab ของแอนติบอดีของแพะ ส่งผลให้ส่วน Fab ของแอนติบอดีไปจับกับแอนติเจนได้มากขึ้น ทำให้ชุดตรวจสอบที่ได้มีความไวสูงมากขึ้น [43] ดังนั้นจึงทำการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแอนติบอดีกับ TC-HRP โดยวิธี direct cELISA โดยเคลือบหลุมของจาน ELISA ชนิด 96 หลุมด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนูไมซ์ที่ 5 ppm แล้วจึงทำการแปรความเข้มข้นของแอนติบอดีต่อเทระไซคลินที่ 1, 2.5, 5 และ 10 ppm และ TC- HRP ที่ 0.25- 40 ppm พบว่าได้ความเข้มข้นของแอนติบอดีและแอนติเจนที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสม 4 อัตราส่วน ดังแสดงในตารางที่ 4.6 คือ TC- HRP ความเข้มข้นที่ 5 ppm กับแอนติบอดี 1, 25, 5 และ 10 ppm ตามลำดับ แล้วนำความเข้มข้นที่เหมาะสมดังกล่าวไปใช้ในการหาความไวต่อเทระไซคลินในรูปอิสระต่อไป

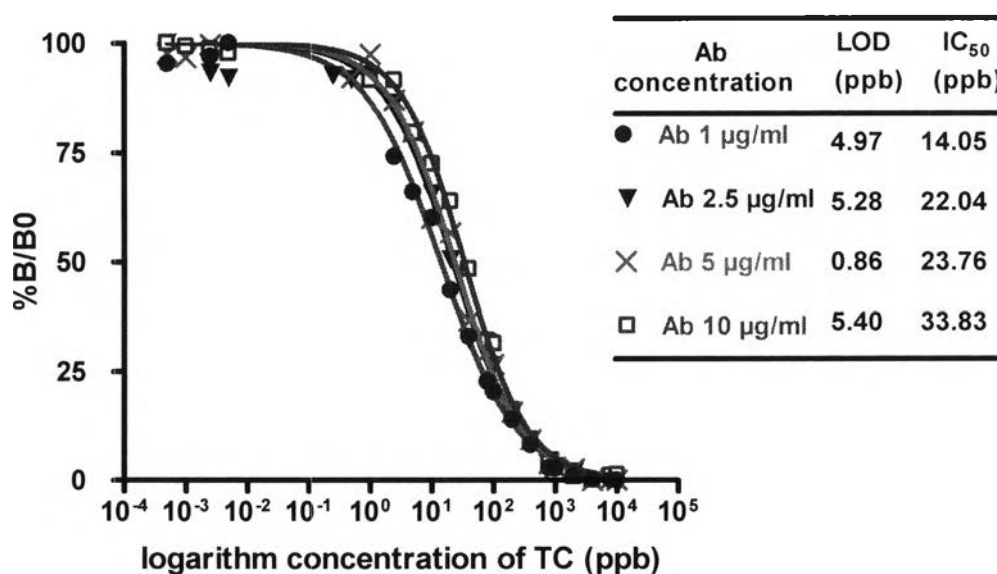
ตารางที่ 4.6 ผลการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแอนติบอดีกับ TC-HRP ด้วยวิธี direct ELISA เพื่อใช้ในการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ direct competitive ELISA ที่เคลือบหลุมด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนูไมซ์

ความเข้มข้นของ TC-HRP (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร			
	ความเข้มข้นของ Ab (ppm)			
	1	2.5	5	10
0.25	0.098	0.119	0.116	0.123
0.5	0.177	0.235	0.211	0.210
1	0.327	0.429	0.394	0.409
2.5	0.818	1.021	0.956	0.989
5	<b>1.356*</b>	<b>1.572*</b>	<b>1.578*</b>	<b>1.652*</b>
10	1.676	1.908	2.028	1.916
20	1.987	2.193	2.199	2.169
40	2.000	2.211	2.260	2.290

หมายเหตุ ค่าที่แสดงโดยตัวเลขที่บ\* คือ ค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ ELISA ที่ใช้แอนติเจนและแอนติบอดีที่เป็นความเข้มข้นที่เลือกสำหรับการทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในการจับกับเทระไซคลิกในรูปอิสระ

#### 4.6.2.2 การทดสอบหาขีดความสามารถในการตรวจของชุดตรวจสอบต้นแบบ

ทดสอบหาขีดความสามารถในการตรวจของชุดตรวจสอบต้นแบบด้วยวิธี direct competitive ELISA โดยอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแอนติบอดีกับ TC-HRP 4 อัตราส่วน จากข้อ 4.6.2.1 มาทดสอบกับเทพระไซคลินในรูปอิสระที่ความเข้มข้น 0-1,000 ppb จากการคำนวณหาค่า  $IC_{50}$  ของแต่ละอัตราส่วน พบว่าทั้ง 4 อัตราส่วนจะใช้ TC-HRP ที่ความเข้มข้น 5 ppm โดยภาวะที่ใช้แอนติบอดี 0.5, 1, 2.5 และ 5 ppm ให้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 14.05, 22.04, 23.76 และ 33.83 ppb ตามลำดับ (รูป 4.6) และพบว่าความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ 1 ppm และความเข้มข้นของ TC-HRP ที่ 5 ppm ให้ค่า  $IC_{50}$  ต่ำที่สุด แสดงว่าความเข้มข้นดังกล่าวเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้การตรวจด้วยวิธี direct competitive ELISA มีความไวสูงสุด



รูปที่ 4.6 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีกับเทพระไซคลินในรูปอิสระโดยแปรอัตราส่วนระหว่างแอนติบอดีกับ TC-HRP ด้วยวิธี Ag- captured direct competitive ELISA ที่เคลือบหลุมด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนูไมซ์ (GAM) 5 ppm ใช้ TC- HRP 5 ppm และแอนติบอดีความเข้มข้น 1, 2.5, 5 และ 10 ppm ตามลำดับ

#### 4.6.3 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Ab-captured indirect competitive ELISA (indirect cELISA)

##### 4.6.3.1 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแอนติบอดีกับเทระไซคลินที่เชื่อมต่อกับ OVA (TC-OVA)

หาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแอนติบอดีกับ TC-OVA ด้วย indirect cELISA โดยเคลือบหลุมของจาน ELISA ชนิด 96 หลุมด้วย TC-OVA ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 1.25, 2.5 และ 5 ppm แล้วจึงทำการแปรความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ 0.01-2 ppm แล้วเลือกอัตราส่วนที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียง 1 โดยพบความเข้มข้นของแอนติบอดีและแอนติเจนที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสม 3 อัตราส่วน คือ ภาวะที่ความเข้มข้นของ TC-OVA ที่ 1, 1.25 และ 2.5 ppm กับความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ 0.05, 0.025 และ 0.025 ppm ตามลำดับ (ดังในตารางที่ 4.7) แล้วนำความเข้มข้นที่เหมาะสมดังกล่าวไปหาความไวต่อเทระไซคลินในรูปอิสระต่อไป

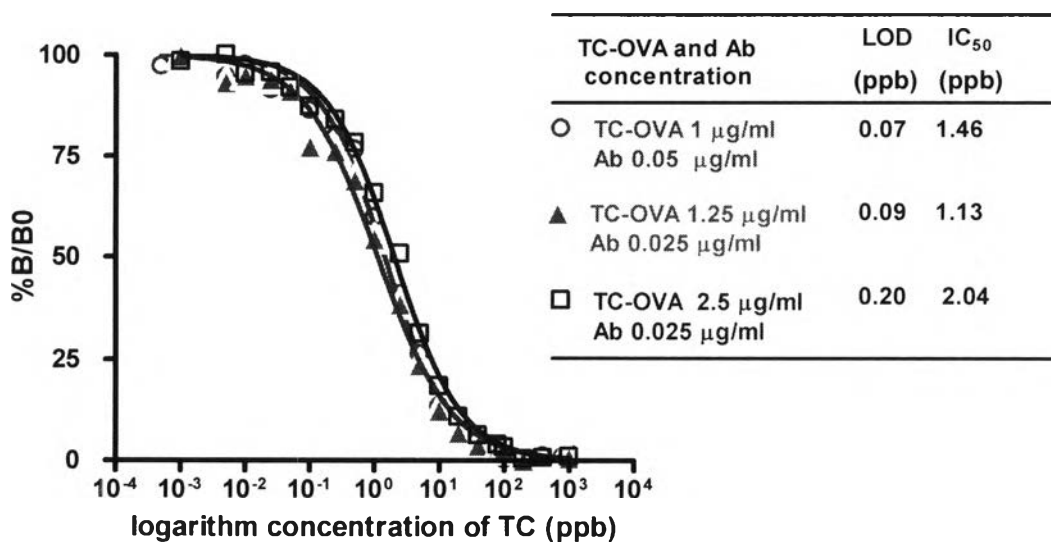
ตารางที่ 4.7 ผลการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแอนติบอดีกับ TC-OVA ด้วยวิธี indirect ELISA  
เพื่อใช้ในการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ indirect competitive ELISA

ความเข้มข้นของแอนติบอดี (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร				
	ความเข้มข้นของ TC-OVA (ppm)				
	0.5	1.00	1.25	2.50	5.0
0.010	0.501	0.605	0.685	0.209	0.661
0.025	0.848	1.113	<b>1.178*</b>	<b>1.209*</b>	1.166
0.050	1.166	<b>1.465*</b>	1.585	1.566	1.504
0.100	1.575	1.841	1.918	2.002	1.977
0.250	2.083	2.255	2.273	2.356	2.37
0.500	2.227	2.360	2.408	2.422	2.491
1.000	2.333	2.342	2.449	2.444	2.431
2.000	2.379	2.400	2.248	2.217	2.339

**หมายเหตุ** ค่าที่แสดงโดยตัวเลขที่บ\* คือ ค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ ELISA ที่ใช้แอนติเจนและแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นที่เลือกสำหรับการทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในการจับกับเทตระไซคลินในรูปอิสระ

#### 4.6.3.2 การทดสอบหาขีดความสามารถในการตรวจของชุดตรวจสอบต้นแบบ

ทดสอบหาขีดความสามารถของชุดตรวจสอบชนิด Indirect competitive ELISA โดยอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแอนติบอดีกับ TC-OVA 3 อัตราส่วน จากข้อ 4.6.3.1 มาทดสอบกับเทระไซคลินในรูปอิสระที่ความเข้มข้น 0-1,000 ppb ได้ผลแสดงในรูปที่ 4.7 พบว่าเมื่อใช้ TC-OVA 1 ppm กับแอนติบอดี 0.05 ppm ให้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 1.46 ppb เมื่อใช้ TC-OVA 1.25 ppm กับแอนติบอดี 0.025 ppm ให้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 1.13 ppb และเมื่อใช้ TC-OVA 2.5 ppm กับแอนติบอดี 0.025 ppm ให้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 2.04 ppb ดังนั้นอัตราส่วนที่ให้ความไวสูงสุด คือ ความเข้มข้นของ TC-OVA และแอนติบอดี ที่ 1.25 ppm และ 0.025 ppm ตามลำดับ



รูปที่ 4.7 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีกับเทระไซคลินในรูปอิสระโดยแปรอัตราส่วนระหว่างแอนติบอดีกับ TC-OVA ด้วยวิธี Ab-captured indirect competitive ELISA โดยเคลือบหลุมด้วย TC-OVA 1, 1.25 และ 2.5 ppm และแอนติบอดีความเข้มข้น 0.05, 0.025 และ 0.025 ppm ตามลำดับ



#### 4.6.4 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Ab-captured direct competitive ELISA

##### 4.6.4.1 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่าง TC-OVA กับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน (Ab-biotin)

ทำการหาอัตราส่วนในการจับที่เหมาะสมระหว่าง TC-OVA ที่เคลือบหลุมกับ Ab-biotin ที่เหมาะสมในการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ direct competitive ELISA โดยทำการแปรค่าความเข้มข้นของ TC-OVA ในช่วง 0.1-5 ppm และ Ab-biotin ในช่วง 0.025-5 ppm และเมื่อนำแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินที่ความเข้มข้นต่างๆ มาทดสอบโดยไม่มีการเคลือบหลุมด้วย TC-OVA พบว่าให้ผลเป็นลบซึ่งเป็นการยืนยันว่าแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินจะจับกับ TC-OVA เท่านั้น ได้ความเข้มข้นของแอนติบอดีและแอนติเจนที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสม 3 อัตราส่วนคือ TC-OVA 0.125, 0.25 และ 0.5 ppm กับ Ab-biotin ที่ 0.05, 0.1 และ 2.5 ppm ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.8 นำความเข้มข้นที่เหมาะสมดังกล่าวไปใช้ในการหาความไวต่อเชื้อโรคในรูปอิสระต่อไป

ตารางที่ 4.8 ผลการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของ TC-OVA กับ Ab-biotin ด้วยวิธี direct ELISA เพื่อใช้ในการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ direct competitive ELISA

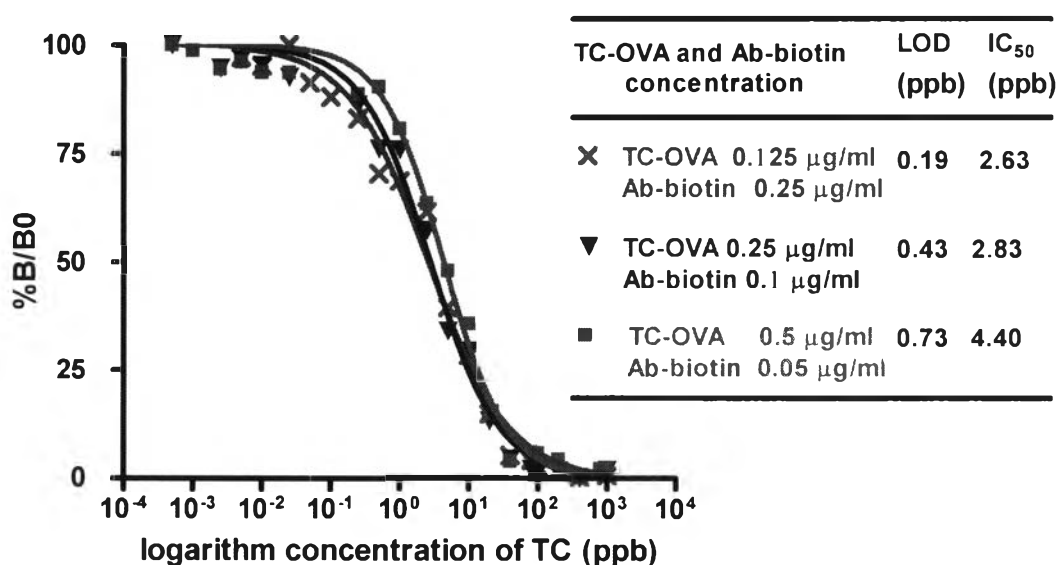
ความเข้มข้นของ TC-OVA (ppm)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร				
	ความเข้มข้นของ Ab-biotin (ppm)				
	0.025	0.05	0.1	0.25	0.5
0.100	0.205	0.345	0.689	1.022	1.323
0.125	0.266	0.431	0.746	<b>1.115*</b>	1.615
0.250	0.345	0.678	<b>1.395*</b>	1.959	2.444
0.500	0.665	<b>1.303*</b>	2.303	2.609	2.783
1.000	0.772	1.611	2.639	2.772	1.646
1.250	0.850	1.724	2.625	2.863	2.861
2.500	0.957	1.911	2.718	2.988	2.946
5.000	0.932	1.857	2.763	2.669	2.838

หมายเหตุ ค่าที่แสดงโดยตัวเลขทึบ\* คือ ค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ ELISA ที่ใช้แอนติเจนและแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นที่เลือกสำหรับการทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในการจับกับเทระไซคลินในรูปอิสระ

#### 4.6.4.2 การทดสอบหาขีดความสามารถในการตรวจของชุดตรวจสอบต้นแบบ

ทดสอบหาความสามารถระหว่างแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินกับเทระไซคลินในรูปอิสระด้วยวิธี direct competitive ELISA จากอัตราส่วนที่เหมาะสม 3 อัตราส่วนในข้อ 4.6.4.1 มาทดสอบกับเทระไซคลินในรูปอิสระที่ความเข้มข้น 0-1,000 ppb พบว่าในภาวะที่ใช้ TC-OVA ความเข้มข้น 0.125 ppm และแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินที่ 0.25 ppm ให้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 2.63 ppb ส่วนในภาวะที่ใช้ TC-OVA ความเข้มข้น 0.25 ppm และแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน

0.1 ppm ให้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 2.83 ppb ส่วนในภาวะที่ใช้ TC-OVA ความเข้มข้น 0.5 ppm และแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินที่ 0.5 ppm ให้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 4.40 ppb ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าอัตราส่วนที่ให้ความไวมากที่สุดคือ TC-OVA ความเข้มข้น 0.125 ppm และแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินที่ 0.25 ppm นอกจากนี้ยังพบว่าในภาวะที่ใช้ TC-OVA และแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินที่มีความเข้มข้นต่ำก็สามารถตรวจสอบโดยให้ค่าความไวสูง เนื่องจากการใช้ไบโอตินจะช่วยขยายสัญญาณทำให้ชุดตรวจสอบวิธี direct competitive ELISA นี้ มีความไวสูง ดังแสดงในรูป 4.8



รูปที่ 4.8 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีกับเทระไซคลินในรูปอิสระโดยแปรอัตราส่วนระหว่าง TC-OVA กับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินด้วยวิธี Ab-aptured direct competitive ELISA โดยเคลือบหลุมด้วย TC-OVA 0.125, 0.5 และ 0.25 ppm และแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินมีความเข้มข้น 0.25, 0.1 และ 0.05 ppm ตามลำดับ

#### 4.6.5 การวิเคราะห์เปรียบเทียบชุดตรวจสอบ ELISA แบบต่างๆ

เมื่อวิเคราะห์ชุดตรวจสอบทั้ง 4 แบบที่พัฒนาขึ้น โดยเทคนิค competitive ELISA และเปรียบเทียบความไวของชุดตรวจสอบจากค่า  $IC_{50}$  และ LOD ได้ผลสรุปดังแสดงในตาราง 4.9 โดยพบว่าชุดตรวจสอบแบบ Ab-captured indirect competitive ELISA มีความไวสูงสุด รองลงมาคือ Ab-captured direct competitive ELISA, Ag-captured direct competitive ELISA และ Ag-captured direct competitive ELISA ที่เคลือบหลุมด้วย GAM โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 1.13, 2.63, 10.73 และ 14.05 ppb ตามลำดับ จึงเลือกพิจารณาชุดตรวจสอบ 2 แบบแรกที่ทำให้ความไวสูงสุดคือ Ab-captured indirect competitive ELISA และ Ab-captured direct competitive ELISA จะเห็นได้ว่าชุดตรวจสอบแบบ indirect competitive ELISA มีขั้นตอนและเวลาในการทดสอบนานกว่า และต้องใช้ HRP-conjugated goat anti-mouse IgG เป็นแอนติบอดีทุติยภูมิ ทำให้มีต้นทุนในการผลิตสูงกว่า direct competitive ELISA ส่วนชุดตรวจสอบแบบ Ag-captured direct competitive ELISA ที่เคลือบหลุมด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนูไม่ซ์ มีความไวน้อยกว่าชุดตรวจสอบแบบอื่นๆ โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 14.05 ppb อาจเนื่องมาจากการที่แอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนูที่ใช้เคลือบหลุมนั้น ใช้ส่วนของ Fab ในการยึดติดกับพื้นผิว ทำให้เหลือส่วนของ Fab น้อย ทำให้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อเทตระไซคลินซึ่งจะจับ Fab สามารถจับได้ในปริมาณที่ลดลง ทำให้ความสามารถในการแข่งขันการจับของเทตระไซคลินในรูปอิสระลดลง จึงส่งผลให้ ELISA ชนิดนี้มีความไวลดลง

จากการวิเคราะห์เปรียบเทียบชุดตรวจสอบ ELISA แบบต่างๆ ทั้ง 4 แบบข้างต้น จะเห็นได้ว่าชุดตรวจสอบทุกแบบมีค่า LOD และ  $IC_{50}$  ที่ต่ำ สามารถนำมาใช้ตรวจสอบเทตระไซคลินที่ความเข้มข้นต่ำกว่าค่า MRL (25 ppb) ได้ แต่มี 2 วิธี คือ Ab-captured indirect cELISA และ Ab-captured direct cELISA ที่สามารถนำมาตรวจตัวอย่างในน้ำผึ้งได้ เนื่องจากในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างต้องมีการเจือจางอีก 10 เท่า ค่า LOD ของทั้งสองวิธีนี้ก็สามารถตรวจได้ครอบคลุมช่วง MRL แต่ในการทดลองครั้งนี้จะเลือกใช้ Ab-captured direct cELISA สำหรับเตรียมเป็นชุดตรวจสอบต้นแบบ เพื่อทำการหาประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต่อไป เนื่องจากใช้เวลาที่น้อยกว่าวิธี Ab-captured indirect cELISA และเหมาะสมในการนำไปใช้ในเชิงพาณิชย์

ตารางที่ 4.9 สรุปผลการเปรียบเทียบชุดตรวจสอบ ELISA แบบต่างๆ

รูปแบบของชุดตรวจสอบ	อัตราส่วนระหว่างแอนติเจน และแอนติบอดี (ppm)	เวลาในการ ทดสอบ (ชั่วโมง)	IC <sub>50</sub> (ppb)	LOD (ppb)
Ag-captured direct competitive ELISA	Ab 1 ppm TC-HRP 2.5 ppm	2.15	10.73	2.88
Ag-captured direct competitive ELISA	Ab 1 ppm TC-HRP 5 ppm			
TC coated with goat anti mouse Ig	goat anti mouse 5 ppm	2.15	14.05	4.97
Ab-captured indirect competitive ELISA	TC-OVA 1.25 ppm Ab 0.025 ppm	3.15	1.13	0.09
Ab-captured direct competitive ELISA	TC-OVA 0.125 ppm Ab-biotin 0.25 ppm	2.15	2.63	0.19

#### 4.7 การเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบด้วยวิธี Ab-captured direct competitive ELISA

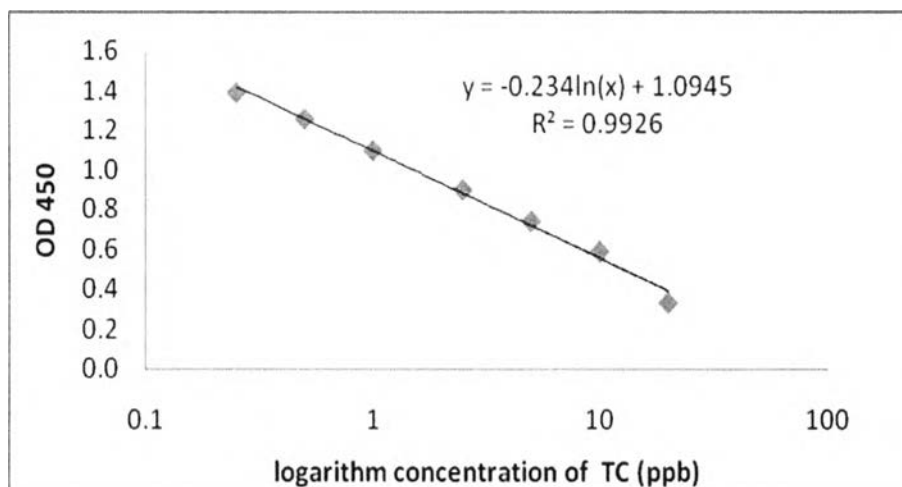
##### 4.7.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน

หลังจากการคัดเลือกชุดตรวจสอบที่มีความไวสูงสุดดังที่กล่าวข้างต้น จึงทำการเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบด้วยวิธี direct competitive ELISA ตามขั้นตอนในข้อ 3.4.9 โดยใช้ความเข้มข้นของ TC-OVA เคลือบหลุมเท่ากับ 0.125 ppm และแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินเข้มข้น 0.25 ppm

และแปรความเข้มข้นของเทระไซคลินในรูปอิสระเป็นตัวแข่งขันในช่วง 0-1,000 ppb และนำข้อมูลดังกล่าวมาสร้างกราฟโดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 4.03 โดยให้แกน X เป็นลอการิทึมของความเข้มข้นของเทระไซคลินที่มีหน่วยเป็น ppb และแกน Y เป็นค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากนั้นทำการเลือกช่วงกราฟที่มีลักษณะเป็นเส้นตรง มาสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน ซึ่งได้ความเข้มข้นในช่วง 0- 20 ppb แสดงข้อมูลดังตารางที่ 4.10 และรูปที่ 4.9

ตารางที่ 4.10 ผลของค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ที่ได้จากการทำ diirect competitive ELISA สำหรับสร้างกราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบเทระไซคลินต้นแบบ

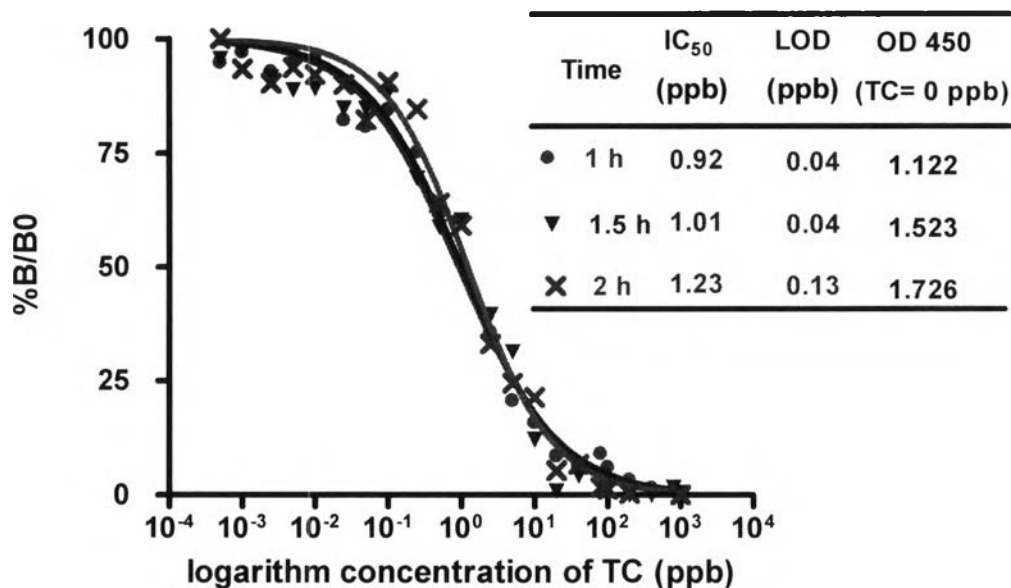
ความเข้มข้นเทระไซคลิน (ppb)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร	SD
0	1.387	0.096
0.25	1.392	0.059
0.5	1.259	0.078
1	1.099	0.047
2.5	0.900	0.057
5	0.742	0.003
10	0.589	0.016
20	0.335	0.034



รูปที่ 4.9 กราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบต้นแบบ direct competitive ELISA

#### 4.7.2 การศึกษาปัจจัยของเวลาที่ใช้ในการบ่มเพาะไซคลินที่เชื่อมต่อ OVA กับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อไปโอดิน และเพาะไซคลินในรูปอิสระ

ในการพัฒนาชุดตรวจสอบสิ่งที่เป็นปัจจัยที่สำคัญอีกอย่าง คือ เวลาในขั้นตอนต่างๆ ของชุดตรวจสอบ ดังนั้นในการพัฒนาชุดตรวจสอบต้นแบบจึงต้องคำนึงถึงเวลาที่สะดวกและง่ายต่อการใช้งานมากที่สุด โดยทำการเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบด้วยวิธี direct competitive ELISA ตามขั้นตอนในข้อ 3.4.8.4 โดยแปรเวลาในการบ่ม 3 ภาวะ คือ 1, 1.5 และ 2 ชั่วโมง เพื่อเปรียบเทียบความไว (sensitivity) พบว่าค่า  $IC_{50}$  ในการบ่มที่ 1, 1.5 และ 2 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 0.92, 1.01 และ 1.23 ppb ตามลำดับ (รูปที่ 4.10) โดยบ่มที่เวลา 1 ชั่วโมง ให้ค่า  $IC_{50}$  และ LOD ต่ำที่สุด แต่จะพบว่าค่าการดูดกลืนแสงของการบ่มที่ 1 ชั่วโมง มีค่าต่ำกว่าการบ่มที่เวลา 2 ชั่วโมงมาก (รูปที่ 4.10 และตารางที่ ก.4) ซึ่งบ่งบอกได้ว่าเวลาดังกล่าวยังเกิดการทำให้ปฏิกิริยาที่ไม่สมบูรณ์ ดังนั้นจึงเลือกใช้เวลา 1.5 ชั่วโมง เป็นเวลาในการทำปฏิกิริยา และพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบต้นแบบ direct competitive ELISA ต่อไป

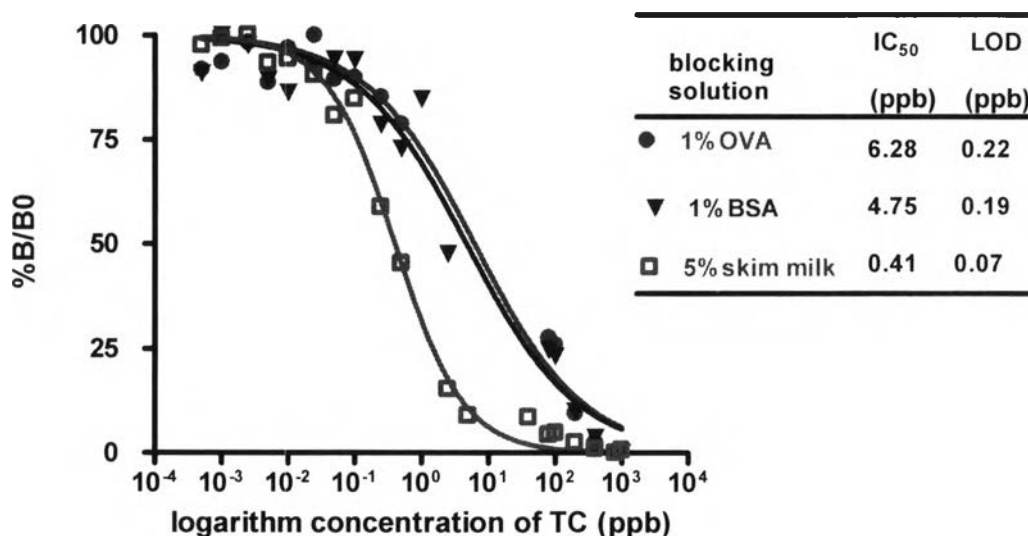


รูปที่ 4.10 กราฟแสดงผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อเทระไซคลินในรูปอิสระ ที่บ่มด้วยเวลาที่ 1, 1.5 และ 2 ชั่วโมง ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 4.03 โดยเคลือบหลุมด้วย TC-OVA 0.125 ppm และแอนติบอดีความเข้มข้น 0.25 ppm ด้วยวิธี direct competitive ELISA

#### 4.7.3 การศึกษาปัจจัยของชนิดของ blocking solution ในการ block ปฏิกริยา

เนื่องจากมีรายงานว่าชนิดของ blocking solution มีผลกระทบต่อ ELISA ในขั้นตอนการทดสอบตัวอย่าง [37] จึงได้ทำการศึกษาผลกระทบของ blocking solution โดยทำการเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบด้วยวิธี direct competitive ELISA ตามขั้นตอนในข้อ 3.4.8.4 โดยแปรชนิดของ blocking solution เป็น 3 ชนิด คือ 5% สารละลายนมพร่องมันเนย, 1% BSA และ 1% OVA และเปรียบเทียบความไวของชุดทดสอบ พบว่าได้ค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 0.41, 4.75 และ 6.28 ppb ตามลำดับ (รูปที่ 4.11) ดังนั้น 5% นมพร่องมันเนย จึงเป็น blocking solution ที่เหมาะสมที่สุด ที่นำมาใช้กับชุดตรวจสอบเทระไซคลินต้นแบบวิธี direct competitive ELISA เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างต่อไป





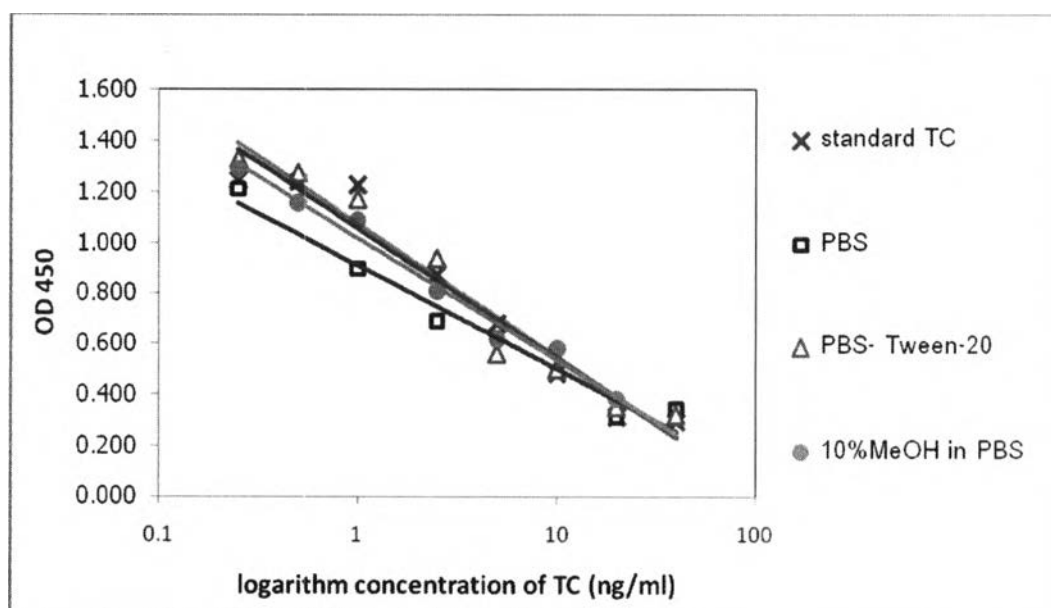
รูปที่ 4.11 กราฟแสดงผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีต่อเทระไซคลินในรูปอิสระ ที่ใช้ blocking solution ต่างๆ กันคือ 1% OVA, 1% BSA และ 5% skim milk ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 4.03 โดยเคลือบหลุมด้วย TC-OVA 0.125 ppm และแอนติบอดีความเข้มข้น 0.25 ppm ด้วยวิธี direct competitive ELISA

#### 4.7.4 การศึกษาผลกระทบของตัวทำละลายต่อการวิเคราะห์ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ

เนื่องจาก TC นั้นสามารถเกิดปฏิกิริยากับไอออนของโลหะหมู่ 2 ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน ซึ่งในน้ำฝิ่งก็มีโลหะเหล่านี้อยู่เช่นกัน เมื่อ TC จับกับไอออนของโลหะ จะส่งผลกระทบต่อระบบ ELISA เป็นสาเหตุให้เกิด matrix effect ในการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน ทำให้แอนติบอดีไม่สามารถตรวจจับ TC ในรูปอิสระได้ ดังนั้นเพื่อป้องกันการรบกวนของระบบดังกล่าว จึงได้นำสาร EDTA มาใช้เพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาเชิงซ้อนระหว่าง TC กับ ไอออนของโลหะ โดยสาร EDTA จะไปจับกับไอออนของโลหะแทน TC ทำให้ระบบไม่ถูกรบกวน [37] ดังนั้นการทดลองนี้ จึงศึกษาผลกระทบของชนิดตัวทำละลายโดยเทคนิค direct cELISA โดยใช้ขั้นตอนตามข้อ 3.4.8.4 โดยในเบื้องต้นใช้ PBS ที่มี 3.35% EDTA (90 mM) พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ไม่มี TC มีค่าต่ำกว่า 1 โดยอยู่ในช่วงระหว่าง 0.4-0.5 จึงแปร % ความเข้มข้นของ EDTA ที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ

3.35% พบว่าก็ยังให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ต่ำเหมือนเดิม (ตารางที่ ก.6 ภาคผนวก ก ) ดังนั้นสารละลาย EDTA จึงไม่เหมาะกับระบบ ELISA

นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ เมทานอล, PBS และ PBST มาใช้สกัดน้ำผึ้ง[13, 29, 30, 44] ดังนั้นจึงใช้ตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด มาทำตามข้อ 3.4.8.4 พบว่าให้ค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียงกัน จึงเลือกตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด คือ PBS, PBST และ PBS ที่เติม 10% เมทานอล มาใช้ละลายน้ำผึ้งที่ อัตราส่วน 10 มิลลิลิตรต่อน้ำผึ้ง 1 กรัม โดยเตรียมความเข้มข้นของ TC สูงต่ำเป็น 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 และ 200 ppb เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานใน PBS พบว่า PBST เป็นตัวทำละลาย ที่เหมาะสมในการละลายตัวอย่างน้ำผึ้ง ได้ดีที่สุด เนื่องจากแสดงกราฟที่ใกล้เคียงกับกราฟมาตรฐานมากที่สุด แสดงให้เห็นว่า PBST สามารถลด matrix effect จากตัวอย่างได้และไม่รบกวนระบบของ direct competitive ELISA ทำให้สามารถตรวจสอบสาร TC ในน้ำผึ้งได้ จึงเลือกสารละลายนี้ มาใช้ละลายตัวอย่าง และใช้เพื่อ ประเมินประสิทธิภาพของชุดทดสอบค้นแบบต่อไป (รูปที่ 4.12 และ ตารางที่ ก.7)



รูปที่ 4.12 กราฟตัวอย่างในสารละลาย PBS, PBST และ PBS ที่เติม 10% เมทานอล เปรียบเทียบกับ กราฟมาตรฐาน TC ใน PBS

#### 4.7.5 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของชุดตรวจสอบเทระไซคลินต้นแบบ

จากการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของชุดตรวจสอบเทระไซคลินตามวิธี 3.4.11.2 พบว่าเกิดปฏิกิริยาข้ามต่อสารในกลุ่มเทระไซคลินทุกสาร โดยแสดงค่าเปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม (percent of cross reactivity) ที่ 100, 86, 27, 23 และ 19% ตามลำดับ และทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่มเทระไซคลิน ได้แก่ เพนิซิลลินจี (penicillin G), ฟุราโซลิโดล (FZD), นอร์ฟลอกซาซิน (Norfloxacin) คลอแรมฟินิคอล (CAP) และ เคลนบูเทรอล (clenbuterol) พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้ามต่ำกว่า 0.01% (ตารางที่ 4.11) เนื่องจากสารในกลุ่ม TC มีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกันกับ TC มาก โดยสารในกลุ่มที่มีโครงสร้างคล้ายเทระไซคลิน ได้แก่ เทระไซคลิน ไฮโดรคลอไรด์ (TC-HCl), โรลิตเทระไซคลิน (RTC), คีอกซีเทระไซคลิน (DC), คลอเทระไซคลิน ไฮโดรคลอไรด์ (CTC-HCl) และออกซีเทระไซคลินไฮโดรคลอไรด์ (OTC-HCl) ทำให้แอนติบอดีสามารถจดจำและจับโครงสร้างที่เหมือน TC ได้ แสดงให้เห็นว่าชุดตรวจสอบต้นแบบที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะต่อสารกลุ่มเทระไซคลินสูงและไม่ทำปฏิกิริยากับสารนอกกลุ่มเทระไซคลิน

ตารางที่ 4.11 ผลการทำปฏิกิริยาข้าม (cross-reactivity, CR) ของชุดตรวจสอบต้นแบบต่อสารในกลุ่มและนอกกลุ่มเทระไซคลิน

สารทดสอบ		CR (%)
สารในกลุ่ม เทระไซคลิน	เทระไซคลิน ไฮโดรคลอไรด์ (TC-HCl)	100
	โรลิตเทระไซคลิน (RTC)	86
	คีอกซีเทระไซคลิน (DC)	27
	คลอเทระไซคลิน ไฮโดรคลอไรด์ (CTC-HCl)	23
	ออกซีเทระไซคลิน ไฮโดรคลอไรด์ (OTC-HCl)	19
สารนอกกลุ่ม เทระไซคลิน	เพนิซิลลินจี (penicillin G)	<0.01
	ฟุราโซลิโดล (FZD)	<0.01
	นอร์ฟลอกซาซิน (norfloxacin)	<0.01
	คลอแรมฟินิคอล (CAP)	<0.01
	เคลนบูเทรอล (clenbuterol)	<0.01

#### 4.7.6 การประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต้นแบบ

##### 4.7.6.1 การหาค่าความไว (sensitivity) ของชุดตรวจสอบต้นแบบ

จากการทดสอบหาค่าความไวของชุดตรวจสอบต้นแบบ โดยวิธี direct competitive ELISA ตามขั้นตอน 3.4.11.1 สามารถวัดปริมาณของเทระไซคลินต่ำที่สุด (LOD) เท่ากับ 0.188 ppb ปริมาณของเทระไซคลินต่ำที่สุดที่ตรวจได้อย่างถูกต้อง (LOQ) เท่ากับ 0.627 ppb ดังตารางที่ 4.12 ซึ่งค่าที่ได้ต่ำกว่าค่า MRL ที่กำหนดในน้ำผึ้ง

ตารางที่ 4.12 ผลการหาค่าความไว (sensitivity) ของชุดตรวจสอบต้นแบบ

ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ที่ไม่มีเทระไซคลินในรูปอิสระ ( $B_0$ ) (n=9)			Mean	SD	LOD (ppb)	LOQ (ppb)
1.318	1.300	1.333				
1.333	1.331	1.303	1.342	0.028	0.188	0.627
1.358	1.340	1.359				

##### 4.7.6.2 ค่าความแม่นยำ (precision) ของชุดตรวจสอบต้นแบบ

การหาค่าความแม่นยำของชุดตรวจสอบต้นแบบ โดยวิธี direct competitive ELISA สามารถวิเคราะห์ได้จากการทำ intra-variation assay และ inter-variation assay แล้วนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% coefficient variation, % CV) พบว่า intra-variation assay จากการทำซ้ำของจำนวนสารมาตรฐาน TC 9 ซ้ำ ได้ค่าอยู่ในช่วง 1.94-8.35 ส่วน inter-variation assay จากการทำซ้ำของจำนวนครั้งการทดลอง 4 ครั้ง ได้ค่าอยู่ในช่วง 11.69-18.71 ดังแสดงในตารางที่ 4.13 ซึ่งค่าที่ได้ทั้งหมดต่ำกว่า 20% จึงอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ [45]

ตารางที่ 4.13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของชุดตรวจสอบต้นแบบ

ความเข้มข้นของเทระไซคลิกลิน (ppb)	intra-variation assay (n=9)			inter-variation assay (N=4)		
	Mean	SD	% CV	Mean	SD	% CV
0	1.356	0.060	4.42	1.244	0.219	17.61
0.25	1.33	0.096	7.22	1.151	0.215	18.71
0.50	1.343	0.106	7.89	1.114	0.181	16.22
1.00	1.151	0.047	4.08	1.027	0.171	16.65
2.50	0.806	0.025	3.10	0.856	0.132	15.39
5.00	0.672	0.040	5.95	0.700	0.082	11.69
10.00	0.619	0.012	1.94	0.605	0.075	12.39
20.00	0.443	0.037	8.35	0.443	0.063	14.28

หมายเหตุ n คือ จำนวนซ้ำของตัวอย่าง

N คือ จำนวนครั้งของการทดลอง โดยในแต่ละครั้งของการทดลองจะทำ 4 ซ้ำ

#### 4.8 การวิเคราะห์เทระไซคลิกลินในตัวอย่างน้ำผึ้งด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ

จากการนำชุดตรวจสอบต้นแบบมาวิเคราะห์กับตัวอย่างน้ำผึ้ง ที่มีการเติมเทระไซคลิกลินให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 และ 200 ppb แล้วทำการวิเคราะห์ตามขั้นตอนในข้อ 3.4.12 แล้วนำผลการทดลองที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 4.13) โดยความถูกต้อง (accuracy) ของชุดตรวจสอบ สามารถวิเคราะห์ได้จากค่า % recovery และปริมาณสารที่ตรวจพบ จากการทดลองพบค่า % recovery อยู่ในช่วง 81.41-114.96 (ตารางที่ 4.14) ส่วนการวิเคราะห์หาความแม่นยำ (precision) ของชุดตรวจสอบสามารถวิเคราะห์ได้จาก % CV ของ intra-variation assay และ inter-variation assay พบว่า % CV ของ intra-variation assay และ % CV ของ inter-variation assay แสดงดังตารางที่ 4.15

จากข้อมูลค่า % recovery ดังกล่าวทำให้พบว่าความเข้มข้นของเทระไซคลิกลินที่วิเคราะห์ได้ให้ค่าใกล้เคียงกับความเข้มข้นที่เติมลงไปในตัวอย่างไม่ และจากข้อมูลทั้งหมดสามารถสรุปผลความถูกต้อง

และความแม่นยำ ดังแสดงในตารางที่ 4.16 แสดงให้เห็นว่า matrix ของน้ำผึ้งไม่มีผลต่อการวิเคราะห์ชุดตรวจสอบต้นแบบ เนื่องจากมีความถูกต้องสูง ซึ่งเป็นช่วงที่อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดไว้ (80-120%) อีกทั้งมีความแม่นยำเนื่องจากมี % CV ไม่เกิน 20% ดังนั้นชุดตรวจสอบต้นแบบมีความสามารถวัดเทระไซคลินในตัวอย่างน้ำผึ้งได้อย่างถูกต้อง

ตารางที่ 4.14 ความถูกต้อง (accuracy) ของการวัดปริมาณเทระไซคลินในตัวอย่างน้ำผึ้ง โดยวิธี direct competitive ELISA

ปริมาณของ TC (ppb)	ปริมาณที่วัดได้ (ppb) (n=9)	recovery (% , n=9)	CV (% , n=9)
2.5	2.78±0.01	111.18	3.94
5	5.75±0.02	114.96	2.94
10	10.56±0.04	105.60	3.54
25	24.09±0.10	96.34	4.04
50	48.82±0.26	97.63	5.33
100	94.76±0.62	94.76	6.56
200	162.82±1.42	81.41	8.72

ตารางที่ 4.15 ความแม่นยำ (precision) ของการวัดปริมาณเทอระไซคลินในตัวอย่างน้ำฝิ่งโดยวิธี direct competitive ELISA

ความเข้มข้นของ เทอระไซคลิน  (ppb)	intra-batch (n=9)		inter-batch (N=8)		ความเข้มข้นของ เทอระไซคลิน  (ppb)	intra-batch (n=9)		inter-batch (N=8)	
	recover (%)	% CV	recovery (%)	%CV		recovery (%)	% CV	recovery (%)	% CV
2.5	90.15 ± 0.89	0.99	97.84 ± 16.22	16.58	10	125.27 ± 9.03	7.21	99.39 ± 13.22	13.3
	114.33 ± 0.84	0.73				93.51 ± 6.92	7.4		
	84.17 ± 5.64	6.7				90.35 ± 4.32	4.78		
	84.05 ± 3.57	4.25				106.84 ± 0.65	0.61		
	77.87 ± 0.28	0.36				83.47 ± 7.73	9.26		
	99.57 ± 4.55	4.57				89.93 ± 3.96	4.4		
	121.36 ± 7.19	5.92				100.12 ± 3.34	3.34		
	111.18 ± 4.38	3.94				105.60 ± 3.74	3.54		
5	107.44 ± 5.18	4.82	99.36 ± 12.87	12.95	25	107.70 ± 8.89	8.17	98.72 ± 12.58	12.75
	105.89 ± 8.88	8.39				97.88 ± 12.65	12.87		
	87.19 ± 4.51	5.17				116.09 ± 3.8	3.27		
	102.76 ± 6.46	6.29				111.12 ± 2.86	2.52		
	78.11 ± 5.93	7.59				82.20 ± 7.34	8.93		
	89.35 ± 5.37	6.01				81.72 ± 6.23	7.62		
	109.15 ± 4.29	3.93				96.74 ± 4.6	4.76		
	114.96 ± 3.38	2.94				96.34 ± 3.85	4		

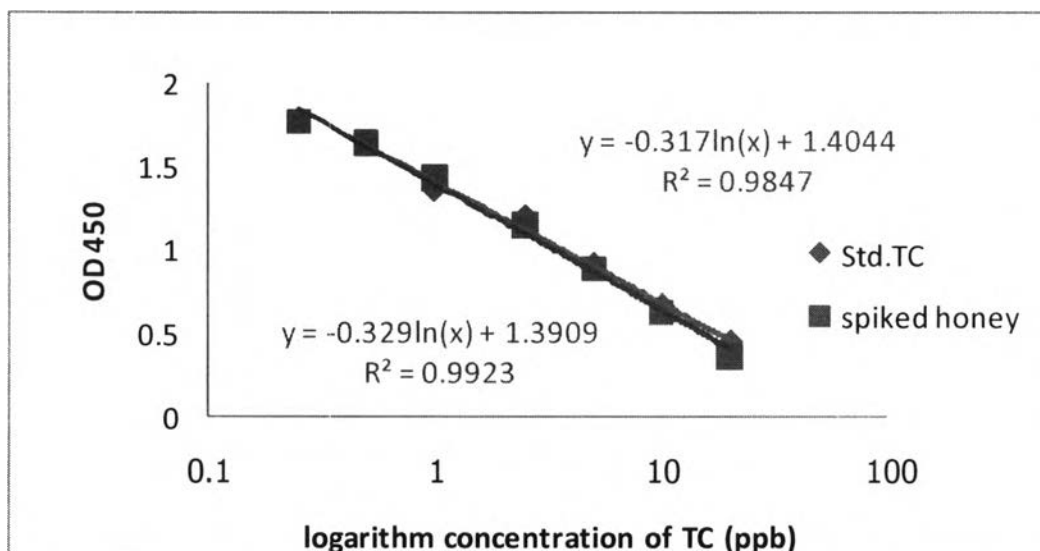
หมายเหตุ n คือ จำนวนซ้ำของตัวอย่าง N คือ จำนวนครั้งของการทดลอง โดยในแต่ละครั้งของการทดลองจะทำ 8 ซ้ำ

ตารางที่ 4.15 (ต่อ) ความแม่นยำ (precision) ของการวัดปริมาณเทตระไซคลินในตัวอย่างน้ำผึ้งโดยวิธี direct competitive ELISA

ความเข้มข้นของ เทตระไซคลิน (ppb)	intra-batch (n=9)		inter-batch (N=8)		ความเข้มข้นของ เทตระไซคลิน (ppb)	intra-batch (n=9)		inter-batch (N=8)	
	recover (%)	% CV	recovery (%)	% CV		recover (%)	% CV	recovery (%)	% CV
50	97.07 ± 5.23	5.39	91.64 ± 16.47	17.94	200	94.29 ± 2.55	2.7	92.643 ± 30.13	32.6
	77.48 ± 17.07	22.03				88.78 ± 17.28	19.46		
	124.26 ± 2.66	2.14				107.98 ± 2.48	2.3		
	92.46 ± 2.63	2.84				158.00 ± 2.59	1.64		
	75.54 ± 3.5	4.63				72.98 ± 16.62	22.77		
	74.28 ± 5.54	7.46				75.11 ± 5.24	6.98		
	94.36 ± 6.67	7.07				60.87 ± 3.96	6.51		
	97.63 ± 5.2	5.33				81.41 ± 7.10	8.72		
100	99.41 ± 5.56	5.59	91.74 ± 13.25	14.44					
	96.57 ± 4.74	4.91							
	100.54 ± 1.4	1.39							
	111.48 ± 1.98	1.78							
	74.41 ± 3.49	4.69							
	75.75 ± 5.17	6.83							
	81.02 ± 4.92	6.07							
	94.76 ± 6.21	6.55							

หมายเหตุ n คือ จำนวนซ้ำของตัวอย่าง N คือ จำนวนครั้งของการทดลอง โดยในแต่ละครั้งของการทดลองจะทำ 8 ซ้ำ





รูปที่ 4.13 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการวิเคราะห์เทระไซคลินที่เติมลงในตัวอย่างน้ำผึ้งกับกราฟมาตรฐาน จากชุดตรวจสอบคั่นแบบ

ตารางที่ 4.16 สรุปความถูกต้องและความแม่นยำของการวิเคราะห์เทระไซคลินในตัวอย่าง

ตัวอย่าง	recovery (%)	intra-batch (n=9)		inter-batch (N=8)	
		% CV		% CV	
น้ำผึ้ง	91.64-99.39	1.94-8.35		12.75-17.94	

**หมายเหตุ** n คือ จำนวนซ้ำของตัวอย่าง

N คือ จำนวนครั้งของการทดลอง โดยในแต่ละครั้งของการทดลองจะทำ 8 ซ้ำ

recovery คือ % recovery ที่ได้จากค่า inter-batch จากตารางที่ 4.15

intra-batch คือ % CV ที่ได้จากค่า intra-batch จากตารางที่ 4.15

inter-batch คือ % CV ที่ได้จากค่า inter-batch จากตารางที่ 4.15

#### 4.9 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยการใช้ชุดตรวจสอบ ELISA และเทคนิค

##### LC-MS-MS

วิเคราะห์โดยใช้ตัวอย่างเดียวกันแล้วแบ่งวิเคราะห์ 2 วิธี คือ เทคนิค ELISA และ เทคนิค LC-MS-MS โดยทำการเตรียมตัวอย่างตามขั้นตอนในข้อ 3.4.12 โดยเติมเทตระไซคลินในตัวอย่างให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 25 และ 100 ppb โดยส่งตรวจตัวอย่างที่ บริษัทห้องปฏิบัติการกลาง ประเทศไทย จำกัด (Central lab) และบริษัทแอนาไลติกอล ลาบอราทอรีส์ เซอร์วิส จำกัด (ALS)

จากการวิเคราะห์ปริมาณของเทตระไซคลินในน้ำผึ้งด้วย direct competitive ELISA พบว่ามี % recovery เท่ากับ 98-112.9% สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ต่ำที่สุดที่ 2.5 ppb ซึ่งต่ำกว่าค่า MRL (25 ppb) ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณของเทตระไซคลินด้วย LC-MS-MS จาก บริษัท Central lab และจากบริษัท ALS พบว่ามี % recovery เท่ากับ 93.66-107.9% และ 68.72-77.72% ตามลำดับมีความสามารถในการตรวจ TC ได้ต่ำที่สุดที่ 10 ppb ผลดังตารางที่ 4.17

แต่อย่างไรก็ตามจะสังเกตเห็นว่าค่า % recovery ของเทคนิค LC-MS-MS ทั้งสองบริษัทนี้ ให้ค่าที่แตกต่างกันมาก โดยบริษัท ALS ให้ค่า % recovery ที่ต่ำกว่า 80% ซึ่งต่ำกว่าค่ามาตรฐานที่ยอมรับกันในช่วง 80-120 % จากผลดังกล่าวทำให้สังเกตเห็นว่าเทคนิคทางเคมีนั้นก็อาจมีความคลาดเคลื่อนได้เช่นกัน ซึ่งอาจเนื่องมาจากวิธีการที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างต่างกัน โดยที่บริษัท Central lab ใช้วิธีการของ Vinas และคณะ [4] โดยใช้บัฟเฟอร์ที่มี  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  เป็นส่วนประกอบ ส่วนบริษัท ALS ใช้การสกัดตามวิธีของ Khong, Hammel และ Guy [46] โดยใช้บัฟเฟอร์ที่มี oxalic acid เป็นส่วนประกอบ ซึ่งอาจจะทำให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ได้ต่ำกว่าความเป็นจริง

ดังนั้นจึงเลือกผลการวิเคราะห์จากบริษัท Central lab มาใช้เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์โดยเทคนิค ELISA ต่อไป ซึ่งพบว่าชุดตรวจสอบต้นแบบ direct competitive ELISA ที่ได้ สามารถตรวจวัดเทตระไซคลินของน้ำผึ้งได้ใกล้เคียงกับเทคนิค LC-MS-MS จาก Central lab โดยมี % recovery ในช่วง 80-120% ทำให้สามารถตรวจวัดปริมาณ TC ได้ใกล้เคียงความเข้มข้นที่แท้จริง และจากผลการทดลองดังกล่าวยังพบอีกว่า LC-MS-MS มีความสามารถในการตรวจ TC ได้ต่ำที่สุดที่ 10 ppb แต่เทคนิค Ab-captured direct competitive ELISA สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ต่ำที่สุดที่ 2.5 ppb ซึ่งมีความไวกว่าเทคนิค LC-MS-MS เนื่องจากเทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยาอาศัยความจำเพาะแบบ affinity (แอนติเจนกับแอนติบอดี: Ag-Ab) ทำให้มีความจำเพาะสูง ส่วนเทคนิคทางเคมีนั้นมี sensitivity สูงแต่ต้องอาศัยปัจจัยหลายอย่างที่เหมาะสมในการตรวจสอบ เช่น ชนิดคอลัมน์ ชนิด mobile phase, ชนิดของ detector และวิธีการสกัดที่เหมาะสม

ดังนั้นชุดตรวจสอบต้นแบบที่ได้จากการวิจัยนี้ สามารถนำไปใช้วิเคราะห์หาปริมาณเทระไซคลิกอินในตัวอย่างได้ เนื่องจากมีความถูกต้อง แม่นยำและมีความจำเพาะต่อสารกลุ่มเทระไซคลิกอินสูง มีขั้นตอนการวิเคราะห์ง่ายสะดวก ไม่ต้องสกัดตัวอย่าง และสามารถตรวจได้หลายตัวอย่าง ทำให้ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย

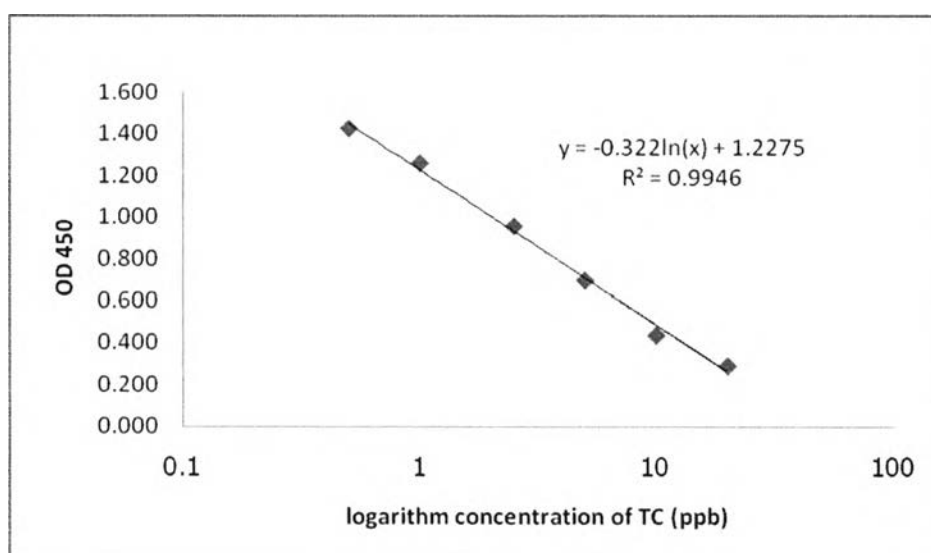
ตารางที่ 4.17 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำผึ้งด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบและเทคนิค LC-MS-MS

ปริมาณของ TC (ppb)	ชุดตรวจสอบต้นแบบ (n=9)		เทคนิค LC-MS-MS (n=2) บริษัท Central lab ประเทศไทย		เทคนิค LC-MS-MS (n=2) บริษัท ALS	
	Measured conc. ± SD		Measured conc. ± SD		Measured conc. ± SD	
	(ppb)	% recovery	(ppb)	% recovery	(ppb)	% recovery
25	24.5 ± 0.04	98	26.98 ± 0.76	107.9	19.43 ± 0.64	77.72
100	112.9 ± 0.04	112.9	93.66 ± 1.19	93.66	68.72 ± 1.62	68.72

หมายเหตุ n คือ จำนวนซ้ำของตัวอย่าง

#### 4.10 ผลการวิเคราะห์ TC จากน้ำฝิ่งที่มีจำหน่ายของไทย โดยเทคนิค Ab-captured direct ELISA

จากการนำน้ำฝิ่งที่วางจำหน่ายในไทย 9 ตัวอย่าง มาทำการทดสอบด้วยชุดตรวจสอบ TC ดันแบบโดยเปรียบเทียบกับ กราฟมาตรฐาน TC (รูปที่ 4.14) พบว่ามีน้ำฝิ่ง 2 ยี่ห้อที่ตรวจพบสาร TC เกินกว่าค่า MRL ที่กำหนด คือ น้ำฝิ่งยี่ห้อ H5 และ H8 ตรวจพบ TC ในปริมาณ 49.50 และ 28.78 ppb ตามลำดับ ส่วนยี่ห้ออื่นๆ ที่เหลือตรวจพบ TC อยู่ที่ 6.7- 16.90 ppb ซึ่งต่ำกว่าค่า MRL ทั้งสิ้น แสดงผล ดังตาราง 4.18



รูปที่ 4.14 แสดงกราฟมาตรฐานของ TC ใช้ตรวจตัวอย่างน้ำฝิ่ง

ตารางที่ 4.18 แสดงผลการวิเคราะห์ TC จากน้ำฝิ่งที่มีจำหน่ายของไทย

น้ำฝิ่ง	OD 450	ปริมาณ TC ที่พบ (ppb)
H1	1.197	11.00
H2	1.067	16.48
H3	1.245	10.56
H4	1.355	6.70
H5	0.710	49.50
H6	1.059	16.90
H7	1.234	9.80
H8	0.887	28.78
H9	1.251	9.30

หมายเหตุ H คือสัญลักษณ์ใช้แทนน้ำฝิ่งแต่ละยี่ห้อ