

ครอบคลุมดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องหาวิธีการตรวจสอบที่ง่าย สะดวก ได้ผลเร็วแม่นยำและ ค่าใช้จ่ายต่ำ เพื่อใช้ในการตรวจสอบยาปฏิชีวนะในอาหารสัตว์ก่อนการนำเข้าและส่งออก

เทคนิคการตรวจวิเคราะห์สารตกค้างโดยใช้หลักการภูมิคุ้มกันวิทยา Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA) เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการตรวจหาสารตกค้าง ในสัตว์เลี้ยงเพื่อการบริโภคและผลิตภัณฑ์จากสัตว์เลี้ยง โดยอาศัยหลักการตรวจวัดปริมาณ แอนติเจน โดยการใช้ แอนติบอดี ที่จำเพาะกับแอนติเจน ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายต่ำ รวดเร็ว และ มีความแม่นยำสูง และเนื่องจากทีมผู้วิจัยได้มีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับสาร AMOZ และมีการพัฒนาชุดตรวจสอบสารดังกล่าวได้สำเร็จแล้ว (Pimpitak และคณะ ,2009) ทางทีมวิจัยจึงมีความต้องการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีและชุดตรวจสอบที่จำเพาะต่อสาร AOZ ซึ่งปัจจุบันมีความต้องการเป็นอย่างมากและยังไม่พบชุดตรวจสอบสาร AOZ โดยวิธี ทางภูมิคุ้มกันวิทยาที่ผลิตขึ้นเองในประเทศ ดังนั้น จึงควรมีการพัฒนาความสามารถในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่มีความจำเพาะต่อสาร AOZ ทำให้การตรวจโดยหลักการภูมิคุ้มกันวิทยามีความจำเพาะสูงขึ้นและสามารถควบคุมคุณภาพการผลิตได้ง่ายขึ้นเพื่อพัฒนาต่อในขั้นทำชุดตรวจ (ELISA test kit) ทำให้ต้นทุนในการตรวจสอบนี้ลดลง มีความสะดวกในการใช้งานได้ใกล้เคียงกับชุดตรวจที่ใช้ปฏิกิริยาทางเคมี ทั้งยังสามารถทำให้ปริมาณของสารในระดับต่ำพร้อมทั้งยังสามารถตรวจได้หลายตัวอย่างต่อครั้ง ดังนั้นเทคนิคนี้จึงได้รับความนิยมสูงขึ้นมากจนทำให้การตรวจโดยใช้หลักการภูมิคุ้มกันวิทยาเป็นหนึ่งในวิธีการตรวจหลักในปัจจุบัน

## 1.2 วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย

- เตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ AOZ หรือ NPAOZ
- ศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้

## 1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

- ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
- เปลี่ยนแปลงอนุพันธุ์ของสาร AOZ ให้อยู่ในรูป 3-(3-คาร์บอกซีฟีนิลเมธิลอะมิโน)-2-ออกซาโซลิดีโนน (CPAOZ) และเชื่อมต่อกับโปรตีนพาหะ เพื่อใช้เป็นแอนติเจน
- ผลิตกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อ สาร AOZ และ/หรือ NPAOZ
- เตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดี
- คัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ AOZ และ/หรือ NPAOZ โดยวิธี ELISA

- ศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้

- การทดสอบไอโซไทป์ (isotype) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ โดยใช้ชุดทดสอบไอโซไทป์

(isotyping kit บริษัท Sigma Aldrich ,USA)

- การทดสอบความไวและปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มไนโตรฟูแรน และสารนอกกลุ่มด้วยวิธี Indirect

competitive ELISA

- การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

- วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผลการทดลอง ทำรายงานฉบับสมบูรณ์

#### 1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของแผนงานวิจัย

สารกลุ่มไนโตรฟูแรนเป็นยาปฏิชีวนะที่ได้จากการสังเคราะห์ นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางโดยใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตและเป็นยาต้านจุลชีพ ออกฤทธิ์ได้ดีต่อเชื้อแบคทีเรียชนิดไม่ใช้ออกซิเจนทั้งแกรมบวกและแกรมลบ และออกฤทธิ์ต่อเชื้ออมีบา โปรโตซัว รวมทั้งเชื้อราบางชนิด ซึ่งนิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์เพื่อใช้ในการป้องกันรักษาโรคติดเชื้อภายในลำไส้ กระเพาะอาหารและโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะของสัตว์โดยเกิดจาก แบคทีเรีย เช่น *Salmonella* spp. (โรค Salmonellosis) *Escherichia coli* (โรค Colibacillosis) โรคที่เกิดจาก *Coccidia* (โรค Coccidiosis) ข้อเท้าอักเสบจากการติดเชื้อ (infectious synovitis) โรคหงอนดำ (Blackhead) หรือ Histomoniasis ที่พบในสัตว์ ได้แก่ สุกร แพะ แกะ โค กระบือ เป็ด ไก่ และ กุ้ง เป็นต้น โดยยาต้านกลุ่มไนโตรฟูแรนทั้ง 4 ชนิดนี้จัดเป็นสารประกอบไนโตร (nitro compounds) มีสมบัติที่ไม่เสถียรไวต่อแสง และจะถูกออกซิไดส์ได้ง่ายเมื่อสัมผัสกับอากาศเป็นเวลานาน เมื่อยาต้านทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ไนโตรฟูราโซน (Nitrofurazone ,NFZ) ไนโตรฟูแรนโทอิน (Nitrofurantoin ,NFT) ฟูราโซลิโดน (Furazolidone ,FZD) และ ฟูรัลทาโดน (Furaltadone, FTD) เข้าสู่ร่างกาย สิ่งมีชีวิตจะมีวิธีการกำจัดสารเคมีเหล่านั้นโดยกระบวนการ เมแทบอลิซึม ซึ่งยาส่วนใหญ่จะถูกเปลี่ยนไปอยู่ในรูปสารที่ละลายได้และถูกกำจัดออกไปจากร่างกาย แต่ในบางกรณีสารเมแทบอลิต์ อาจไปจับกับโปรตีนในร่างกายสัตว์ เป็นผลให้ขบวนการขับออกไปเป็นไปได้ช้า และมีผลกระทบต่อความปลอดภัยของอาหาร เพราะสามารถคงอยู่ในร่างกายสัตว์ได้เป็นระยะเวลาอันยาวนานหลังจากการหยุดให้ยาไปแล้ว กระบวนการเมแทบอลิซึมทำให้เกิดสารเมแทบอลิต์ที่สำคัญ ได้แก่ 3-อะมิโน-5-มอร์โฟลิโนเมทิล-2-ออกซาโซลิดีโนน (3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone , AMOZ) 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดีโนน (3-amino-2-oxazolidinone , AOZ) เซมิคาร์บาไซด์ (Semicarbazide ,SEM) และ 1-อะมิโนไฮแดนโทอิน (1-aminohydantoin ,AHD) (Leitner และ คณะ ,2001) เมื่อมนุษย์บริโภคผลิตภัณฑ์ที่มียาสัตว์ตกค้างในรูปของ bound residues เหล่านี้จะถูกกรดในกระเพาะอาหารย่อยและปลดปล่อยสารตกค้างออกมาจากโปรตีนที่เกาะอยู่ซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค

(Keefle และ Home ,1999) จากผลการศึกษาในสัตว์ทดลอง พบว่า สารกลุ่มนี้มีแนวโน้มเป็นสารก่อมะเร็งและทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสัตว์ถ้าได้รับการบริโภคเป็นระยะเวลานาน โดยพบว่า ฟิวราโซลิโดน มีผลยับยั้งหน้าที่เอนไซม์บางประเภท โดยข้อมูลจาก Irish Agriculture and Food Development Authority ตามโครงการศึกษา Project Armis No. 4036 ของสหภาพยุโรปในปี 1999 พบว่าเมื่อมนุษย์บริโภคผลิตภัณฑ์ที่มีสารเมแทบอไลต์จับกับโปรตีนในเนื้อเยื่อสุกรเข้าไปกรดในกระเพาะจะย่อย AOX side-chain ออกมาและเปลี่ยนรูปไปเป็น  $\beta$ -hydroxyethylhydrazine ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์และก่อมะเร็ง โดยสารดังกล่าวมีการห้ามนำมาใช้ในสัตว์เพื่อการบริโภคและห้ามมีตกค้างไม่ว่าในปริมาณเท่าใดแม้ว่าจะอยู่ในรูปยาตั้งต้น หรือเมแทบอไลต์ ซึ่งส่งผลทำให้หลายๆ ประเทศ จำกัดการใช้ โดยเฉพาะการใช้ผสมในอาหารสัตว์ที่ใช้สำหรับบริโภค สารกลุ่มนี้จึงถูกห้ามใช้กับสัตว์ที่เลี้ยงเพื่อการบริโภค ในหลายประเทศ เช่น อเมริกา แคนาดา ออสเตรเลีย ญี่ปุ่น สิงคโปร์ บังคลาเทศ และกลุ่มสหภาพยุโรป (Bryan ,1978) ส่งผลทำให้ประเทศต่างๆ ได้ออกกฎหมายควบคุมระดับสูงสุดที่ยอมรับได้ของสารตกค้างกลุ่มนี้ในผลิตภัณฑ์อาหารจากสัตว์ โดยปกติจะกำหนดเป็นขีดจำกัดสารตกค้างสูงสุด ซึ่งเรียกว่าค่า MRL (Maximum Residue Limit) โดยสารในกลุ่มไนโตรฟูแรน มีการกำหนดค่า MRL อยู่ในระดับที่เรียกว่า zero tolerance level คือต้องไม่มีการตกค้างของสารกลุ่มนี้ในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ (European Commission ,2001) ทำให้หลายประเทศได้พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์และได้กำหนดค่าขีดจำกัดต่ำสุดของเครื่องมือในการวิเคราะห์สารไนโตรฟูแรน โดยห้องปฏิบัติการทั่วไปสามารถใช้วิธี ELISA ในการตรวจวิเคราะห์ ได้ตามความเหมาะสม และอาจยืนยันผลการตรวจวัดสารดังกล่าวด้วยเทคนิคอื่น เช่น High Performance Liquid Chromatography (HPLC) หรือ Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-Mass Spectrometry (LC-MS-MS) สำหรับประเทศไทยกระทรวงสาธารณสุขได้กำหนดให้เพิกถอนทะเบียนตำรับยาที่ใช้สำหรับสัตว์ที่มีตัวยากลุ่มไนโตรฟูแรน ได้แก่ ไนโตรฟูราโซน และฟิวราโซลิโดน นอกจากนี้ยังห้ามนำเข้ายา เกสซ์เคมีภัณฑ์ และเกลือของเกสซ์เคมีภัณฑ์เหล่านี้ และมีข้อกำหนดด้านความปลอดภัยสินค้าเกษตรและอาหารของสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ โดยกำหนดให้สารสารเมแทบอไลต์ (metabolite) ทั้ง 4 ตัวของยาในกลุ่มไนโตรฟูแรนต้องไม่พบในสินค้าเกษตรและอาหารโดยกำหนดให้มีค่า MRPL อยู่ในระดับ 0.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับ AOX และ AMOX และระดับ 1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับ SEM และ AHD (ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ,2551) แต่อย่างไรก็ตามยังมีการลักลอบนำสารเหล่านี้เข้าภายในประเทศได้ในรูปของอาหารสัตว์ ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยต่อผู้บริโภคจึงต้องทำการตรวจสอบก่อนการนำเข้าและส่งออกสินค้าเพื่อตรวจวิเคราะห์หาสารกลุ่มนี้ที่ปนเปื้อน แต่การวัดปริมาณยาตกค้างดังกล่าวสามารถทำได้ในขีดจำกัด เนื่องจากต้องใช้เครื่องมือวิเคราะห์ขั้นสูงที่มีราคาแพงมาก ดังนั้น ปัจจุบันมีการประยุกต์นำความรู้ทางด้านวิทยาภูมิคุ้มกัน (Immunology) ไปใช้ในการตรวจติดตามหาสารตกค้างในผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่งให้ผลการตรวจติดตามที่มีความไวสูงและแม่นยำ โดยใช้หลักการของ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างกว้างขวางสำหรับตรวจวัดสารตกค้างโดยอาศัยหลักการการตรวจวัดแอนติเจน โดยการใช้แอนติบอดี ที่ให้ผลทางชีวภาพเฉพาะกับยาและเอนไซม์ที่เชื่อมต่อกับแอนติบอดีหรือแอนติเจน วิธี ELISA นี้เป็นวิธีการที่ประหยัดและรวดเร็วทั้งนี้ทางสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์

มหาวิทยาลัย จึงได้สนใจทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ AOX เพื่อใช้พัฒนาต่อไปเป็นชุดทดสอบหาสารตกค้างในผลิตภัณฑ์อาหารทั้งนำเข้าและส่งออกต่อไปได้

### 1.5 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

เนื่องจากได้มีมาตรการควบคุมและติดตามการใช้สารกลุ่มไนโตรฟูแรนนี้ ดังนั้น เพื่อสร้างความเชื่อมั่นในอาหารสัตว์ และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ เพื่อความปลอดภัยต่อผู้บริโภคจึงต้องทำการตรวจสอบก่อนการนำเข้าและส่งออกสินค้า โดยพบว่า สารกลุ่มไนโตรฟูแรน ในรูปยาตั้งต้นได้แก่ ฟุรัลทาโธนิ ฟุราโซลิโดนิ ไนโตรฟูแรนโทนิ และ ไนโตรฟูราโซนิ จะถูกย่อยสลายอย่างรวดเร็วในสัตว์ภายใน 2-3 ชั่วโมง เปลี่ยนไปอยู่ในรูปสาร เมแทบอลิต์ คือ AMOZ ,AOZ ,SEM และ AHD ตามลำดับ ปกติสารเมแทบอลิต์ ของไนโตรฟูแรน จะอยู่ในรูปสารเมแทบอลิต์ที่จับกับโปรตีนโดยการทำให้สารเมแทบอลิต์ อยู่ในรูปอิสระโดยอาศัยการย่อยสลายพันธะด้วยกรด เช่น กรดไฮโดรคลอริก (HCl) แต่สาร เมแทบอลิต์ ที่ได้จะมีขนาดโมเลกุลเล็กมากยากต่อการตรวจวิเคราะห์ ดังนั้น จึงต้องทำให้สาร เมแทบอลิต์ เหล่านี้อยู่ในรูปอนุพันธ์ เรียกระบวนการนี้ว่า derivatization ซึ่งสารที่นิยมใช้ให้เกิดอนุพันธ์ คือ 2-Nitrobenzaldehyde (NBA) โดยการตรวจวิเคราะห์สารเมแทบอลิต์ ของไนโตรฟูแรน ปัจจุบัน นิยมใช้เทคนิค Liquid chromatography (LC) และ Mass spectrometry (MS) โดยใช้เครื่อง LC-MS/MS เพื่อยืนยันชนิดของสารและปริมาณ เนื่องจากมีความจำเพาะสูง สามารถตรวจสอบสารที่มีปริมาณเล็กน้อย ได้อย่างแม่นยำ ซึ่งจะใช้ตัวอย่างเพียงปริมาณเล็กน้อยสำหรับการตรวจสอบเบื้องต้นด้วยวิธี colour test ส่วนการตรวจยืนยันผลใช้วิธี Thin layer chromatography (TLC) และวิธี High performance liquid chromatography (HPLC) (Cieri และ คณะ 1978 ,McCracken และ คณะ 1997) ข้อได้เปรียบของเทคนิค HPLC เมื่อเทียบกับเทคนิค TLC คือ จะใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์สารปริมาณน้อยๆได้ดี และให้ค่าความแม่นยำและเที่ยงตรงได้ดีกว่า จึงทำให้เทคนิคนี้เป็นทางเลือกหนึ่งในการวิเคราะห์สารตกค้างที่ได้รับความนิยม แต่เนื่องจากเทคนิคต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงและวิธีการวิเคราะห์ที่ยุ่งยากกว่า ส่วนวิธี Mass Spectrometry (MS), Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS) นี้เหมาะสำหรับการวิเคราะห์สารเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณเนื่องจากสามารถตรวจสอบเพื่อยืนยันระบุชื่อสารในระดับน้อยมากๆได้แม่นยำสูง และยังใช้สารตัวอย่างเพียงปริมาณเล็กน้อย ดังนั้นวิธีการนี้จึงเหมาะกับการวิเคราะห์สารตกค้างในกลุ่มไนโตรฟูแรน ที่ปนเปื้อนในอาหารสัตว์และเนื้อสัตว์ได้เป็นอย่างดี แต่เนื่องจากเทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงมาก และยังต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญการโดยเฉพาะ ดังนั้นเทคนิคจึงไม่เหมาะสมในการนำมาใช้ในการตรวจวัดสารตกค้างในภาคสนามหรือใช้ในงานประจำ (McCracken และคณะ ,1995) ปัจจุบันจึงมีการประยุกต์นำความรู้ทางด้านวิทยาภูมิคุ้มกัน (Immunology) ไปใช้ในการตรวจติดตามหาสารตกค้างในผลิตภัณฑ์อาหารทั้งนำเข้าและส่งออก ซึ่งให้ผลการตรวจติดตามที่มีความไวสูงและแม่นยำ เป็นวิธีการที่ประหยัดและรวดเร็ว ดังได้มีการผลิตและศึกษาลักษณะพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่ออนุพันธ์ของ AOX ด้วยวิธี ELISA โดยเปลี่ยน AOX เป็น CPAOX แล้วนำไปเชื่อมกับโปรตีนพาหะ HAS เพื่อใช้ในการฉีดกระตุ้นกระต่ายที่ความเข้มข้น และช่วงเวลาในการกระตุ้นต่างๆ พร้อมทั้งทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีโดยวิธี competitive ELISA พบว่าการลด

ปริมาณแอนติเจนในการฉีดกระตุ้นและเพิ่มระยะเวลาในการกระตุ้นจะส่งผลให้แอนติบอดีที่ได้มีความไวต่อสาร NPAOZ เพิ่มขึ้น และสามารถนำพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาใช้ตรวจหาสาร AOZ ในรูปอนุพันธ์ได้ (Cooper และคณะ, 2004) หลังจากนั้นได้มีรายงานการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร AOZ ที่เกิดจากการฉีดกระตุ้นสาร CPAOZ และ AOZ ที่ติดกับโปรตีนพาหะด้วยวิธีต่างๆ ผลที่ได้พบว่าไม่สามารถผลิตโมโนโคลนต่อ AOZ ได้ มีเพียงแต่ CPAOZ เท่านั้นที่สามารถผลิตโมโนโคลนต่อ NPAOZ ได้โดยสามารถตรวจหาสาร AOZ ที่ต้องเปลี่ยนไปอยู่ในรูป NPAOZ ได้ค่า  $IC_{50}$  (50 percent binding inhibition) อยู่ในช่วง 0.4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่างเนื้อกึ่ง ไข่ วัว และ สุกร ซึ่งได้ทำการเปรียบเทียบวิธีทดสอบแบบ ELISA กับ LC-MS/MS ในเนื้อกึ่งและไข่ อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0 - 32.1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ 0 - 10.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ (Diblikova และ คณะ, 2005)

#### 1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อสาร NPAOZ และ/หรือ AOZ เพื่อนำไปใช้ในการเตรียมชุดตรวจสอบ ตรวจหาปริมาณสารตกค้างในอาหาร