

การตรวจสอบสารพิษแอฟลาทอกซิน โดยวิธี ELISA

(Enzyme – Linked Immunosorbent Assay)

ประวิติ ตันบุญเอก อมรา สนิมทอง และกลอยใจ สำเร็จวานิชย์★

Detection of Aflatoxin B₁ by Enzyme – Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Prawat Tanboon – Ek, Amara Sanimtong and Kloyjai Samretwanich★

บทคัดย่อ

นำเทคนิค ELISA (Enzyme – Linked Immunosorbent Assay) มาปรับปรุงใช้ในการตรวจสอบสารพิษแอฟลาทอกซิน ปัจจัยสำคัญในการตรวจสอบคือ แอนติซีรัมที่เฉพาะเจาะจงกับแอฟลาทอกซินชนิดนั้น ๆ จึงทำการผลิตแอนติซีรัมของสารพิษแอฟลาทอกซิน B₁ โดยฉีดสารพิษแอฟลาทอกซิน B₁ ที่ผูกเชื่อมกับโปรตีน brovine serum albumin โดยพันระทางเคมีเข้าไปทางด้านหลังของกระต่าย (intradermal multiple site injection) แอนติซีรัมที่ผลิตได้ครั้งนี้มีความเข้มข้นสูงถึง 1 : 15,000 เมื่อวัดความเข้มข้นโดยวิธี ELISA นับว่าเป็นความสำเร็จครั้งแรกของประเทศไทย ในการผลิตแอนติซีรัมต่อต้านสารพิษแอฟลาทอกซินซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์และตรวจสอบสารพิษโดยวิธีทาง Immunological Assay เช่น วิธี ELISA สารพิษแอฟลาทอกซิน เป็นสารโมเลกุลเล็ก วิธีการที่ใช้ในการตรวจสอบเป็นวิธีการแบบแข่งขัน (competitive ELISA) โดยภาชนะรองรับปฏิกิริยา (polystyrene plate) จะถูกเคลือบด้วยแอนติซีรัมของสารพิษแอฟลาทอกซิน B₁ ก่อน หลังจากล้างด้วยบัฟเฟอร์ PBS – Tween แล้วจึงหยดน้ำคั้นของข้าวโพดหรืออาหารสัตว์ที่สกัดใน methanol หรือสารพิษแอฟลาทอกซินมาตรฐานลงไปและใส่สารพิษแอฟลาทอกซินที่ผูกเชื่อมกับเอนไซม์ซีบ็อก (Aflatoxin B₁ – enzyme

Abstract

A specific microtest plate enzyme – linked immunosorbent assay has been developed for the rapid quantitation of Aflatoxin B₁ as low as 0.1 ug per assay. Multiple site injection of rabbit with the commercially available haptens, Aflatoxin B₁ – oxime – brovine serum albumin conjugate, was used for the production of antiserum. ELISA titration of Aflatoxin B₁ antibody was obtained from four rabbits as high as 1 : 15,000. It was the first production of antiserum against Aflatoxin B₁ in Thailand which will further be used for the Aflatoxin detection by ELISA in agricultural commodities.

Direct competitive ELISA was used for detection of Aflatoxin B₁. Aflatoxin B₁ was extracted in methanol from naturally contaminated corn and feeds. Wells of a polystyrenemicroplate were coated with diluted antibody. The plates were washed in PBS – Tween. Thereafter aflatoxin B₁ standards or sample extracts were added to each well, followed by equal amount of Aflatoxin B₁ – peroxidase conjugate, then plates were incubated. The plates were again washed, and the amount of conjugate

★ กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม. 10900

★ Plant Pathology and Microbiology Division, Department of Agriculture, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand.

peroxidase conjugate ตามลงไปปริมาณที่เท่า ๆ กัน ปฏิกิริยาการเกาะจับระหว่างแอนติบอดีและสารพิษแอฟลาทอกซิน เอนไซม์รีบ็อก อ่านได้หลังจากเติม substrate ที่ทำปฏิกิริยา เฉพาะเจาะจงกับเอนไซม์รีบ็อกลงไปจะเกิดการเปลี่ยนสีเป็น สีน้ำตาลส้ม หลังจากหยุดปฏิกิริยาคด้วย H_2SO_4 แล้วจึงอ่านค่า ความเข้มข้นของสีในช่วงคลื่น 490 นาโนมิเตอร์ ตัวอย่างใด ที่มีค่าความเข้มข้นของสีต่ำแสดงว่ามีสารพิษแอฟลาทอกซิน วิธี ELISA นี้ สามารถตรวจสอบสารพิษแอฟลาทอกซินได้ ในปริมาณที่ต่ำถึง 0.1 ug/ml. เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็วและ ปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงาน นอกจากนี้ ต้นทุนต่อตัวอย่างในการ ตรวจสอบต่ำมาก

คำหลัก : สารพิษแอฟลาทอกซิน ELISA

สารพิษแอฟลาทอกซิน (aflatoxin) เป็นกลุ่มของสารพิษ พวก secondary metabolites ที่ผลิตโดยเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *A. parasiticus* สารพิษแอฟลาทอกซินที่ถูกผลิต ออกมามีหลายชนิด เช่น B_1 B_2 G_1 และ G_2 เป็นต้น แต่ที่ พบอยู่เสมอในผลิตภัณฑ์และมีความรุนแรงที่สุด คือ สารพิษ แอฟลาทอกซิน ชนิด B_1 ซึ่งทำให้เกิดอันตรายทั้งในมนุษย์และ สัตว์เลี้ยง ดังนั้น ปัญหาเกี่ยวกับสารพิษที่เกิดจากเชื้อรา ชนิดนี้จึงกลายเป็นปัญหาที่สำคัญมากที่จะต้องมีการควบคุม และป้องกันอย่างมีประสิทธิภาพ เพราะเชื้อราชนิดนี้ปะปนและ แพร่กระจายอยู่ทั่วไป และสามารถที่จะผลิตสารพิษขึ้นได้ ในทุกสถานการณ์ (Chu, 1983)

วิธีการป้องกันการรับสารพิษเข้าสู่ร่างกาย คือ การ หลีกเลี่ยงมิให้ผู้บริโภคได้รับสารปนเปื้อนทั้งในอาหารคนและ อาหารสัตว์ ดังนั้น ในการลดความเสี่ยงของมนุษย์และสัตว์ สำหรับการที่จะบริโภคสารพิษจากเชื้อราเข้าไป จึงควรมี วิธีการวิเคราะห์และตรวจสอบสารพิษที่มีประสิทธิภาพให้ผล รวดเร็ว แม่นยำและปลอดภัย ทั้งในอาหารคนและอาหารสัตว์ ความพยายามในการค้นคว้าหาวิธีหรือปรับปรุงวิธีการวิเคราะห์ จึงเป็นสิ่งที่สำคัญมาก โดยทั่วไปเทคนิคการตรวจสอบสารพิษ แอฟลาทอกซินจะเป็นวิธีการวิเคราะห์ทางเคมี (chemical

bound to the antibody was determined after addition of the substrate solution consisting of O – phenylene diamine and hydrogen peroxide. The change in absorbance was monitored at a wavelength of 490 nanometer. ELISA method is more rapid, less expensive, and safer than the physio – chemical method of aflatoxin analysis.

Key words : aflatoxin, ELISA

method) เช่น วิธี HPLC (High Performance Liquid Chromatography) และวิธี TLC (Thin Layer Chromatography) และวิธี GC (Gas Chromatography) (Chu, 1983) แต่วิธีการตรวจสอบดังกล่าว ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง และสารเคมีจำนวนมาก จึงทำให้ราคาต้นทุนในการวิเคราะห์ ต่อตัวอย่างสูงและใช้เวลานาน (Pestka *et al.*, 1980)

นักวิจัยในหลายประเทศได้พยายามพัฒนาวิธีการตรวจสอบ สารพิษแอฟลาทอกซินโดยอาศัยวิธีการที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา เฉพาะเจาะจงระหว่างสารพิษแอฟลาทอกซินและแอนติบอดี (antibody) ที่เฉพาะเจาะจงกับสารพิษชนิดนั้น (Immunological method) เช่น วิธี Radio Immune Assay (RIA) และ วิธี Enzyme – Linked Immunosorbent Assay (ELISA) เป็นต้น แต่วิธี RIA ต้องใช้สารกัมมันตภาพรังสี ซึ่งอาจมีอันตรายได้ (Pestka *et al.*, 1980) ส่วนใหญ่จึงหันมาปรับปรุงและใช้วิธี ELISA กันอย่างกว้างขวาง เพราะเป็นวิธีการตรวจสอบที่ง่าย สะดวกรวดเร็ว ประหยัดและมีประสิทธิภาพสูง สามารถตรวจสอบได้หลายตัวอย่างพร้อม ๆ กัน (Lawellin *et al.*, 1977; El – Nakib *et al.*, 1981; Chu, 1983; Chu, 1984; Chu *et al.*, 1987)

ในประเทศไทยการวิเคราะห์สารพิษแอฟลาทอกซิน

เท่าที่ผ่านมาจะใช้วิธีการวิเคราะห์ทางเคมี (อรุณศรี และคณะ 2532a; อรุณศรี และคณะ 2532b) ส่วนการตรวจสอบโดยวิธี ELISA มักจะใช้ test kit ที่มีขายตามท้องตลาด ซึ่งมีราคาต่อตัวอย่างสูงมาก ดังนั้น จึงได้ทำการทดลองผลิตแอนติซีรั่มของสารพิษแอฟลาทอกซิน B₁ ขึ้นมา เพื่อที่จะนำไปใช้ประโยชน์ในการตรวจสอบสารพิษแอฟลาทอกซิน โดยวิธี ELISA ต่อไป ซึ่งจะทำให้ต้นทุนในการตรวจสอบต่อตัวอย่างลดลงไปอย่างมาก

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การผลิตแอนติซีรั่มสำหรับสารพิษแอฟลาทอกซิน B₁

การผลิตทำได้โดยนำสารพิษแอฟลาทอกซินที่ผูกต่อกับ

โปรตีน Brovine Serum Albumin (Aflatoxin B₁ - BSA conjugate) ฉีดเข้าไปบริเวณใต้ผิวหนังด้านหลังของกระต่ายพันธุ์ไวท์นิวซีแลนด์ ที่มีอายุ 2 เดือน โดยใช้ความเข้มข้นของ Aflatoxin B₁ - BSA ขนาด 300 ug ต่อกระต่าย 1 ตัว ผสมกับ Freund's complete adjuvant ในอัตราส่วน 1:3 สำหรับการฉีดครั้งแรก หลังจากนั้นประมาณ 1 เดือน จึงทำการฉีดกระตุ้น (booster injection) เข้าที่บริเวณกล้ามเนื้อขา โดยใช้ความเข้มข้นของ Aflatoxin B₁ - BSA ขนาด 250 ug ต่อกระต่าย 1 ตัว ผสมกับ Freund's incomplete adjuvant ในอัตราส่วน 1:2 ทำการเจาะเลือดออกจากใบหูของกระต่าย หลังจากการฉีดครั้งแรกแล้ว 3 สัปดาห์ และทำติดต่อกันทุกสัปดาห์เป็นเวลา 6 เดือน (Figure 1)

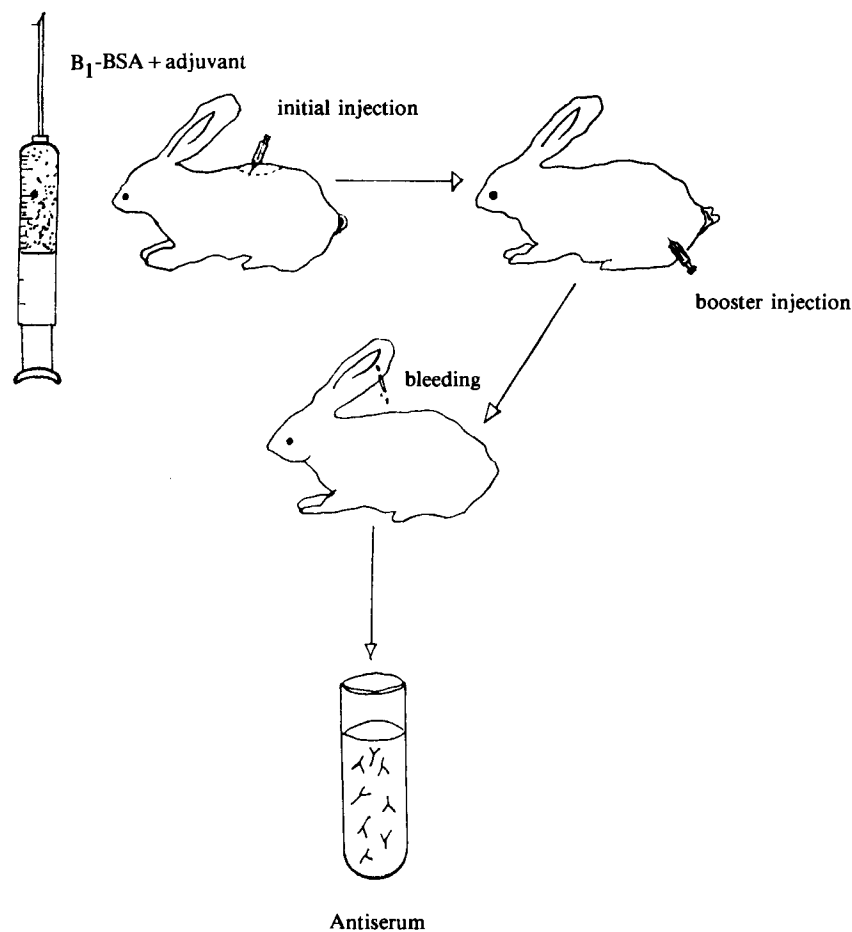


Figure 1. Illustration of antigen injection into a rabbit for antiserum production against Aflatoxin B₁.

ก่อนที่จะฉีด Aflatoxin B₁ – BSA เข้าไปในกระต่าย ได้ทำการเจาะเลือดกระต่ายทุกตัว เพื่อใช้เป็นซีรัมปกติ ในการเปรียบเทียบกับแอนติซีรัมที่ผลิตได้ การทดลองครั้งนี้ใช้กระต่ายทั้งหมด 4 ตัว

การเตรียมตัวอย่างสำหรับตรวจสอบด้วยวิธี ELISA

นำตัวอย่าง (ข้าวโพดหรืออาหารสัตว์) ที่ต้องการทดสอบ จำนวน 20 กรัม มาบดด้วยเครื่องบด (blender) กับสารละลาย (700 มล. methanol 290 มล. น้ำกลั่น และ 10 มล. dimethylformamide) 100 มล. นาน 2–3 นาที หลังจากนั้น ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที จึงนำเอาส่วนบนของสารละลาย มากรองผ่านกระดาษกรอง สารละลายที่กรองได้นำมาทำให้เจือจาง 1 : 20 เท่า ด้วย sample diluent (7% methanol + 92% 0.01 M PBS + 1% dimethylformamide) ก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์สารพิษแอฟลาทอกซินด้วยวิธี ELISA

การเตรียมสารพิษแอฟลาทอกซินมาตรฐาน

นำสารพิษแอฟลาทอกซินมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 1 ug/มล. มาทำให้เจือจางด้วย sample diluent ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ดังนี้ 5 1 0.5 0.1 0.05 0.001 และ 0 ug/มล.

ขั้นตอนการตรวจสอบสารพิษแอฟลาทอกซินด้วยวิธี ELISA

เทคนิค ELISA ที่ใช้ในการตรวจสอบสารพิษแอฟลาทอกซินเป็นแบบ direct competitive ELISA ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. หยดแอนติซีรัมบริสุทธิ์ที่เจือจาง 1 : 5,000 ใน coating buffer ลงในหลุมของ polystyrene plate (ของ costa) ปริมาณ 100 ul ต่อหลุม และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C. นาน 2 ชั่วโมง หรือ 6°C. ข้ามคืน หลังจากนั้นล้าง 3 ครั้ง ด้วย Phosphate Buffer Saline pH 7.4 ที่มี Tween 20 0.05% (PBS – T)

2. หยด 100 ul ของ 0.1% Brovine Serum Albumin ใน 0.01 MPBS ต่อหลุม และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที หลังจากนั้นล้าง 3 ครั้งด้วย PBS – T

3. หยดตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบและสารพิษแอฟลาทอกซินมาตรฐานดังที่กล่าวไว้ข้างต้น ลงในหลุมของ polystyrene plate หลุมละ 50 ul เรียงตามแผนผังที่ต้องการโดยแต่ละตัวอย่าง จะมี 3 ซ้ำ หลังจากนั้นหยด 50 ul ของ Aflatoxin B₁ – peroxidase conjugate ที่เจือจาง 1 : 600 ใน 0.01 MPBS +

0.1% BSA ตามลงไปทุกหลุม เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 30 นาที ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBS – T

4. หยด substrate หลุมละ 100 ul ที่มีส่วนผสมของ O – phenylene diamine 40 mg กับ 0.04 มล. 30% H₂O ใน 100 มล. substrate buffer (0.05 M citric acid + 0.1 M Na₂HPO₄, pH 5.0) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วย stopping solution (0.1 N HCl)

5. อ่านปฏิกิริยาการเกิดสีด้วยเครื่อง micro ELISA reader (BIO – TEK INSTRUMENTS EL 311) ที่ absorbance 490 นาโนมิเตอร์

ผลการทดลองและวิจารณ์

การผลิตแอนติซีรัมของสารพิษแอฟลาทอกซินและการวัดความเข้มข้น

ทำการเจาะเลือดกระต่ายครั้งแรกในสัปดาห์ที่ 3 หลังจากการฉีดแอนติเจนครั้งแรกเข้าไปและเจาะเลือดติดต่อกันทุกสัปดาห์ เป็นเวลานาน 18–21 สัปดาห์ โดยเจาะเลือดมาครั้งละ 10–15 มล. และตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็นนาน 24 ชั่วโมง เก็บเอาเฉพาะส่วนของน้ำเหลือง (serum) ไว้ และนำแอนติซีรัมที่ได้ในแต่ละสัปดาห์ มาวัดความเข้มข้นด้วยวิธี ELISA พบว่าแอนติซีรัมที่เก็บในครั้งแรกจะมีความเข้มข้นต่ำมากในกระต่ายตัวที่ 1 และในกระต่ายตัวที่ 2 3 และ 4 ยังไม่มีการสร้างแอนติซีรัม (Figures 2 and 3) ความเข้มข้นของแอนติซีรัมเพิ่มสูงขึ้นในสัปดาห์ที่ 4 และ

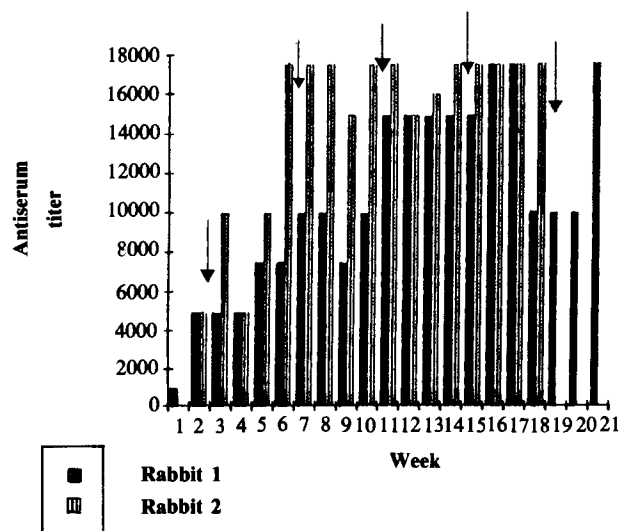


Figure 2. Antiserum titer against Aflatoxin B₁ from rabbit 1 and 2 (arrow indicate booster injection).

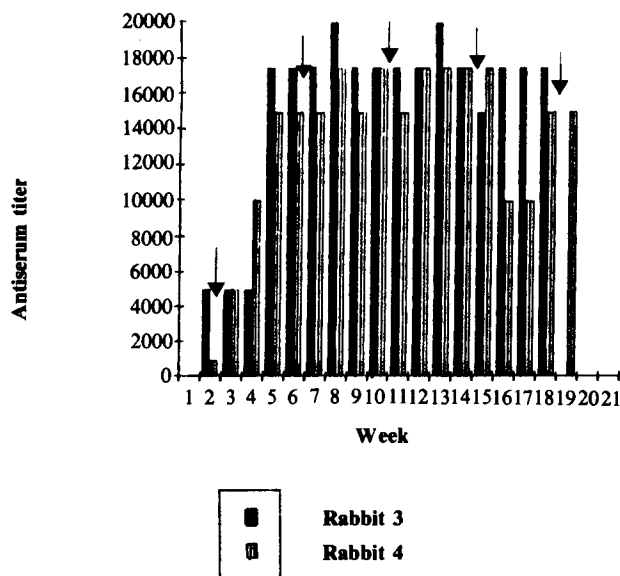


Figure 3. Antiserum titer against Aflatoxin B₁ from rabbit 3 and 4 (arrow indicate booster injection)

หลังจากการฉีดกระตุ้น ความเข้มข้นสูงสุดที่วัดได้ประมาณ 1 : 17,500-1 : 20,000 การวัดความเข้มข้นของแอนติซีรัมโดยวิธี ELISA นี้ ความเข้มข้นของสีที่เกิดจากปฏิกิริยา (absorbance) จะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้นของแอนติซีรัม (Figure 4) ซึ่งในการวัดความเข้มข้นทุกครั้งจะมีซีรัมของกระต่ายก่อนทำการฉีดแอนติเจนเป็นตัวเปรียบเทียบทุกครั้ง

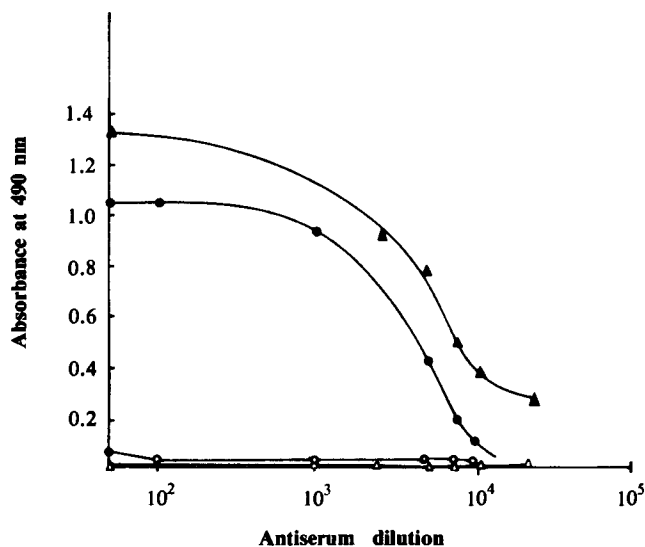


Figure 4. ELISA titration of afla B₁ antisera : serum dilutions were plotted on a logarithmic scale using
O - O and Δ - Δ rabbit 1 and 3 antiserum.
O - O and Δ - Δ rabbit 3 preimmune serum.

การตรวจสอบสารพิษแอฟลาทอกซินด้วยวิธี Direct Competitive ELISA

ตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบหาสารพิษแอฟลาทอกซินครั้งนี้ คือ ข้าวโพดและอาหารสัตว์ โดยการตรวจสอบแต่ละครั้งจะมี สารพิษแอฟลาทอกซินมาตรฐานที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ กัน เป็นตัวเปรียบเทียบ วิธีการ Direct Competitive ELISA เป็นการแข่งขันกันระหว่างสารพิษในตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ (Free Aflatoxin B₁) กับสารพิษแอฟลาทอกซินที่เชื่อมต่อกับ เอนไซม์ซีบ็อก (labelled toxin) ในการเกาะจับกับแอนติบอดี ที่ถูกเคลือบไว้บนผิวของ polystyrene plate ดังนั้น ความเข้มของสีที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับ substrate จะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปฏิกิริยาแต่มีความสัมพันธ์ในทางตรงข้ามเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารแอฟลาทอกซินที่มีอยู่ในตัวอย่างนั้น ๆ นำค่าความเข้มของสีที่อ่านได้จากสารพิษแอฟลาทอกซินมาตรฐานมาทำ standard curve โดยพล็อตลงบนกระดาษ semilogarithmic โดยให้ค่าความเข้มข้นของ สารพิษแอฟลาทอกซินมาตรฐานเป็นแกน X และค่าความเข้มของสี (optical density) เป็นแกน Y จากการทดลองทำ standard curve ของสารพิษแอฟลาทอกซินในการตรวจสอบอาหารสัตว์ พบว่าวิธี ELISA สามารถตรวจสอบสารพิษแอฟลาทอกซินได้ต่ำสุดถึง 0.1 ppb (part per billion) (Figure 5)

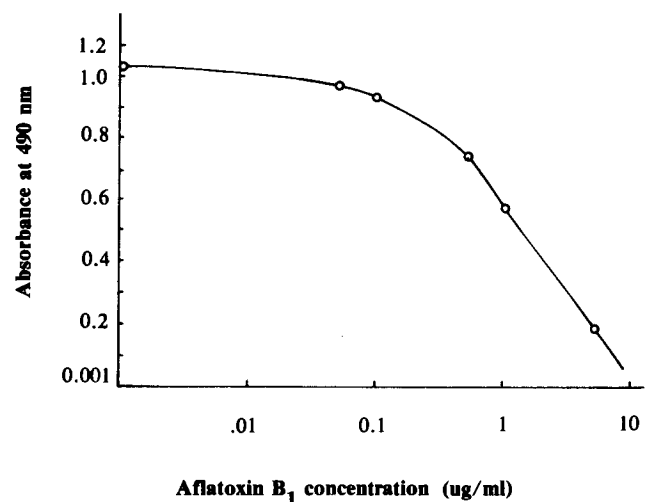


Figure 5. Standard curve for ELISA of Aflatoxin B₁.

ตัวอย่างอาหารสัตว์ที่นำมาตรวจสอบหาสารพิษแอฟลาทอกซินโดยวิธี ELISA 12 ตัวอย่าง พบว่าทุกตัวอย่างมีสารพิษแอฟลาทอกซินในปริมาณต่างกัน ตั้งแต่ 7 ppb จนถึงมากกว่า 100 ppb (Table 1) ถึงอย่างไรก็ตามพบอาหารสัตว์ 4 ตัวอย่างที่มีสารพิษแอฟลาทอกซินต่ำกว่าระดับมาตรฐานสากลที่ระบุไว้

(20 ppb) ในตัวอย่างข้าวโพด 9 ตัวอย่างพบ 3 ตัวอย่าง มีปริมาณสารพิษแอฟลาทอกซินมากจนไม่สามารถวัดได้ด้วยความเข้มข้นของน้ำคั้น 1 : 20 ดังนั้น ถ้าต้องการจะทราบปริมาณสารพิษแอฟลาทอกซินที่แน่นอน จะต้องนำตัวอย่างนั้นมาทำให้เจือจางลงอีกประมาณ 10 เท่า

Table 1. Aflatoxin B₁ detection from naturally contaminated corn and feed by ELISA.

Sample No.	Feed			Corn		
	Absorbance [☆]	(%) [△]	AFB ₁ (ppb) [°]	Absorbance	(%)	AFB ₁ (ppb)
1.	0.288	(26.4)	96	0.652	(56.7)	24
2.	0.249	(23.1)	108	0.003	(0.3)	>100ND [•]
3.	0.062	(5.7)	>100ND	0.415	(36.1)	60
4.	0.818	(75.7)	7	0.268	(23.3)	130
5.	0.474	(43.9)	36	0.688	(59.8)	21
6.	0.579	(53.6)	18	0.658	(57.2)	24.2
7.	0.537	(49.7)	27	0.002	(0.2)	>100ND
8.	0.545	(50.5)	26	0.484	(42.1)	42
9.	0.585	(54.2)	16	0.016	(1.4)	>100ND
10.	0.462	(42.8)	38	—	—	—
11.	0.664	(61.5)	15	—	—	—
12.	0.234	(21.7)	110	—	—	—

☆ Absorbance value at wave length 490 nanometer.

△ Percentage of AFB₁ – POD conjugate linked to B₁ antiserum when compared to control (sample without Aflatoxin B₁).

° Aflatoxin B₁ concentration in samples calculated from standard curve.

• ND = not determined.

นอกจากนี้ยังได้นำตัวอย่างข้าวโพดที่ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณแอฟลาทอกซินแล้วด้วยวิธี TLC มาทำการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA อีกครั้งเพื่อเป็นการทดสอบประสิทธิภาพของ

วิธีการวิเคราะห์ ผลปรากฏว่า วิธี ELISA สามารถตรวจวิเคราะห์สารพิษแอฟลาทอกซินได้ แม้ในปริมาณที่ต่ำมาก ในขณะที่วิธี TLC วิเคราะห์ไม่พบในบางตัวอย่าง (Table 2)

Table 2. Comparison of recoveries of aflatoxin B₁ from naturally contaminated corn by ELISA and TLC (Thin Layer Chromatography).

Sample No.	Absorbance. value	ppb.	TLC (ppb.)
1.	0.290*	60.0	41.3
2.	0.488	0.4	ND
3.	0.097*	360.0	140.0
4.	0.212	12.8	ND
5.	0.064	160.0	87.0
6.	0.013	>200	141.7
7.	0.136*	24.0	11.5
8.	0.041*	>200	219.1
9.	0.028	>200	370.2

* = Samples were diluted to 1 : 200.

ND = Non – detected.

การตรวจสอบปริมาณสารพิษแอฟลาทอกซิน B₁ ในผลิตผลการเกษตร เช่น ข้าวโพด ถั่ว และอาหารสัตว์ ด้วยวิธี ELISA นั้น กำลังเป็นที่นิยมกันอย่างแพร่หลายในต่างประเทศ เพราะเป็นวิธีที่ง่าย สะดวกต่อการเตรียมตัวอย่าง สามารถทำได้หลายตัวอย่างพร้อมกันในเวลาอันรวดเร็วและปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงาน และมีความไวในการตรวจจับสารพิษแอฟลาทอกซินสูง (Chu *et al.*, 1987; El-Nakib *et al.*, 1982 and Anjaiah *et al.*, 1987) ในการทดลองครั้งนี้ได้นำวิธีการ ELISA ของ Chu *et al.* (1987) มาปรับปรุงใช้ในการตรวจสอบสารพิษแอฟลาทอกซินจากข้าวโพดและอาหารสัตว์ และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างวิธี TLC และ ELISA ปรากฏว่าในตัวอย่างเดียวกันวิธี ELISA สามารถตรวจจับสารพิษแอฟลาทอกซินได้ต่ำถึง 0.4 ppb ในขณะที่วิธี TLC ไม่สามารถตรวจพบได้ ถึงอย่างไรก็ตาม Chu *et al.* (1987) ได้ทดลองพบว่า ค่าของปริมาณสารพิษแอฟลาทอกซินที่วิเคราะห์โดยวิธี TLC จะมีความสัมพันธ์กับค่าของสารพิษแอฟลาทอกซินที่วิเคราะห์โดยวิธี ELISA แต่ค่าที่ได้จากวิธี ELISA จะมีความแม่นยำมากกว่าค่าที่วิเคราะห์ได้จากวิธี TLC

ปัจจัยสำคัญของการวิเคราะห์สารพิษแอฟลาทอกซินด้วยวิธี ELISA คือ แอนติซีรัมต่อสารพิษแอฟลาทอกซิน แอนติซีรัมของสารพิษแอฟลาทอกซินนี้มีจำหน่ายในต่างประเทศ แต่ราคาต่อมิลลิตรแพงมาก ดังนั้น จึงได้นำวิธีการผลิตแอนติซีรัมของ Chu และ Veno (1977) มาปรับปรุง โดยเพิ่มให้มีการฉีดแอนติเจนกระตุ้นซ้ำกลั่นเนื้อขาทุกเดือน หลังจากการฉีดแอนติเจนครั้งแรก ทำให้กระต่ายสามารถสร้างแอนติซีรัมอย่างต่อเนื่อง และการเจาะเลือดกระต่ายสามารถทำได้ทุกสัปดาห์ ซึ่ง Guan *et al.* (1980) รายงานว่าเขาสามารถเจาะเลือดกระต่ายเพื่อเก็บแอนติซีรัมได้ถึง 96 สัปดาห์ แต่ในการทดลองนี้ได้ทำอย่างต่อเนื่องเพียง 21 สัปดาห์เท่านั้น และความเข้มข้นของแอนติซีรัมที่ผลิตได้มีความเข้มข้นเฉลี่ยสูงถึง 1 : 15,000 การที่จะนำแอนติซีรัมมาใช้ในการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA จะต้องทำให้บริสุทธิ์ก่อนและหาความเข้มข้นของแอนติซีรัมที่เหมาะสมที่จะใช้วิธี ELISA ซึ่งการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมจะต้องทดสอบกับแอนติซีรัมแต่ละชุดก่อนที่จะนำมาใช้

นอกจากนั้น ขั้นตอนในการนำแอนติซีรัมมาเคลือบภาชนะทดสอบ (microtiter plate) เพื่อใช้ในวิธีตรวจสอบแบบ ELISA นั้น สามารถทำได้ล่วงหน้า โดยเก็บไว้ที่ 4° ซ. เป็นเวลานานถึง 6 เดือน ทำให้ลดระยะเวลาในการตรวจสอบลงไปได้หนึ่งขั้นตอน (Chu *et al.*, 1987) แต่ในการทดลองครั้งนี้ทำการเคลือบภาชนะทดสอบไว้ล่วงหน้าประมาณ 3 เดือน และเมื่อนำมาใช้พบว่า มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบดีเท่ากับที่เตรียมไว้ล่วงหน้า 1 วัน

สรุปผลการทดลอง

ในการศึกษานี้ พบว่าวิธี ELISA สามารถตรวจวิเคราะห์สารพิษแอฟลาทอกซินได้อย่างมีประสิทธิภาพ เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ง่ายต่อการเตรียมตัวอย่างที่จะทดสอบ และที่สำคัญคือ เป็นวิธีที่ปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงาน สมควรที่จะนำไปเผยแพร่เพื่อใช้ในการตรวจสอบสารพิษแอฟลาทอกซินในผลิตผลทางเกษตรต่อไป

การผลิตแอนติซีรัมต่อสารพิษแอฟลาทอกซิน B₁ ครั้งนี้เป็นประสบการณ์ความสำเร็จครั้งแรกของประเทศไทย นับว่า

เป็นประโยชน์อย่างมาก แอนติซีรั่มสามารถนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารพิษแอฟลาทอกซินโดยวิธีทาง Immunoassay หลายวิธี การที่เราผลิตแอนติซีรั่มขึ้นมาใช้ภายในประเทศได้เอง ทำให้ลดการนำเข้าและลดต้นทุนการตรวจสอบสารพิษแอฟลาทอกซินต่อตัวอย่างอีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

- อรุณศรี วงษ์อุไร, ปรีศนา สิริอาชา และประวีติ ตันบุญเอก. 2532 a. ศึกษาปริมาณสารพิษ Zearalenone และ Ochratoxin ในข้าวโพด, น. 115-117. ในรายงานผลงานวิจัย กองโรคพิษและจุลชีววิทยา, กรมวิชาการเกษตร.
- อรุณศรี วงษ์อุไร, ปรีศนา สิริอาชา และประวีติ ตันบุญเอก. 2532 b. ศึกษาปริมาณสารพิษ Aflatoxin และ Ochratoxin ในถั่วลิสง, น. 134-136. ในรายงานผลงานวิจัย กองโรคพิษและจุลชีววิทยา, กรมวิชาการเกษตร.
- Anjaiah, V., V.K. Mehan, S. Jayanthi and D.V.R. Reddy. 1987. Enzyme – Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Aflatoxin B₁ Estimation in Groundnut. *In* Summary and Recommendations of The international Workshop on Aflatoxin Contamination of Groundnut 6–9 Oct. 1987. ICRISAT, India.
- Chu, F. S. and I. Veno. 1977 Production of Antibody against Aflatoxin B. *Appl. and Environs. Microbiol.* 33 : 1125 – 1128.
- Chu, F.S. 1983. Immunochemical Methods for Mycotoxin Analysis, pp. 177-194. *In* Proc. Int. Symp. Mycotoxins.
- Chu, F. S., Titan Fan, Guang–Shi Z hang and Yi–Chun Xu. 1987. Improved and Emzyme – Linked Immunosorbent Assay for Aflatoxin B₁ in Agricultural Commodities. *J. Assoc. off. Anal. Chem.* 70 : 854 – 857.
- El–Nakib, O., J.J. Pestka and F. S. Chu. 1981. Determination of Aflatoxin B₁ in Corn, Wheat, and Peanut Butter by Enzyme – Linked Immunosorbent Assay and Solid – Phase Radioimmuno assay. *J. Assoc. off. Anal. Chem.* 64 : 1077 – 1082.
- Chu, F.S. 1984. Immunoassays for Analysis of Mycotoxins. *J. Food Protection.* 47 : 562 – 569.
- Guan, P. K., F. S. Chu and O.El Nakib. 1980. Comparison of Antibody Production Against Aflatoxin B₁ in Gaals and Rabbits. *Appl. and Environs. Microbiol.* 40 : 678 – 680.
- Lawcellin, D.W., D.W. Grant and B.K. Joyce. 1977. Enzyme – Linked Immunosorbent Analysis for Aflatoxin B₁. *Appl. and Environs. Microbiol.* 34 : 94 – 96.
- Pestka, J.J., P.K. Gaur and F.S. Chu. 1980. Quantitation of Aflatoxin B₁ Antibody by an Enzyme – Linked Immunosorbent Microassay. *Appl. and Environs. Microbiol.* 40 : 1027 – 1031.