การพัฒนาวิธีการตรวจหาสารพิษโบทูลินัมท็อกซินด้วยวิธี antibody capture ELISA

ปิยะดา หวังรุ่งทรัพย์[1] ธนิตชัย คำแถลง[1] ชุติมา จิตตประสาทศีล[1] นัฐพงษ์ ชื่นบาน[1] สมชาย แสงกิจพร[1]
ทายาท ศรียาภัย[2] โกสุม จันทร์ศิริ[3]
[1]สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
[2]คณะวัฒนธรรมสิ่งแวดล้อมและการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
[3]ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

Received: June 21, 2019
Revised: July 26, 2019
Accepted: July 31, 2019

บทคัดย่อ

เชื้อ *Clostridium botulinum* เป็นเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน แกรมบวก รูปท่อน สร้างสปอร์ และสามารถสร้างสารพิษต่อระบบประสาทได้ สารพิษแบ่งออกเป็น 8 ชนิด ได้แก่ A-H วิธีการตรวจพิสูจน์หาชนิดของสารพิษทำได้โดยการฉีดสารพิษในหนูทดลอง แต่ยังต้องการวิธีการทดสอบหาสารพิษด้วยวิธีอื่นเพื่อเป็นทางเลือกในการลดการใช้สัตว์ทดลอง เช่น วิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และ immunochromatography (IC) การศึกษาครั้งนี้ได้ทดสอบหาความเข้มข้นของ Primary antibody และ Secondary antibody ที่เหมาะสมที่สุดเพื่อที่จะนำมา Coating plate ในการทำ Capture ELISA ของสารพิษ 4 ชนิด ได้แก่ A, B, E และ F และทำการทดสอบหาปริมาณโบทูลินัมท็อกซิน (botulinum neurotoxin) ในอาหาร 4 ชนิด (หน่อไม้ ปูดอง ถั่วเน่า และน้ำส้ม) ที่มีการผสมโบทูลินัมท็อกซินทั้ง 4 ชนิดลงไป ผลการศึกษาสำหรับชนิด A, B และ E พบว่าใช้ Primary antibody เป็น Goat และ Secondary เป็น Rabbit complex แอนติบอดีทั้ง 2 ชนิดใช้ที่ความเข้มข้น 0.5, 0.5 และ 0.5 ug/ml ตามลำดับ สำหรับชนิด F พบว่าใช้ Primary antibody เป็น Rabbit complex และ Secondary antibody เป็น Goat ที่ความเข้มข้น 1 ug/ml สามารถตรวจหาสารพิษ ชนิด A, B, E และ F ที่ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดคือ 1, 10, 5 และ 1 ng/ml ตามลำดับ และทดสอบหา botulinum neurotoxin ที่เติมในอาหาร 4 ชนิด ได้แก่ หน่อไม้ ปูดอง ถั่วเน่า และน้ำส้ม โดยสามารถตรวจหาโบทูลินัมท็อกซิน ชนิด A, B, E และ F ได้น้อยที่สุดที่ความเข้มข้นช่วง 10-50 ng/ml ผลที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ สามารถนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจหาโบทูลินัมท็อกซิน โดยวิธี ELISA ในตัวอย่างทั้งอาหารและน้ำดื่ม ชุดตรวจวิเคราะห์มีความเหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในประเทศและเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการนำเข้าชุดทดสอบหาโบทูลินัมท็อกซินจากต่างประเทศ

คำสำคัญ: โบทูลินัมท็อกซิน *Clostridium botulinum* ELISA

ผู้นิพนธ์ประสานงาน:
โกสุม จันทร์ศิริ
ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
114 ถนนสุขุมวิท ซอยสุขุมวิท 23 แขวงคลองเตยเหนือ เขตวัฒนา กรุงเทพฯ 10110
อีเมล: kchansiri@yahoo.com

Development of botulinum toxin detection assay by antibody capture ELISA

Piyada Wangroongsarb[1], Thanitchai Kamthalang[1], Chutima Jittaprasatsin[1], Nattapong Cheunban[1], Somchai Sangkitporn[1], Thayat Sriyapai[2], Kosum Chansiri[3]

[1]National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health

[2]Faculty of Environmental Culture and Ecotourism, Srinakharinwirot University

[3]Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University

Abstract

Clostridium botulinum is an anaerobic bacteria, gram-positive rod-shaped spore-forming with the ability to produce the neurotoxin botulinum. The toxins are divided into 8 types (A-H). The typing identification of *C. botulinum* toxin is testing by injection in mice. The alternative toxin detection to reduce the use of laboratory animals is enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunochromatography (IC). The study tested the appropriate concentration of the primary antibody and a secondary antibody were coating plate in the Capture ELISA of 4 types including A, B, E and F. Four type foods (bamboo shoot, fermented soil bean, fermented crab and orange juices) spiked with 4 types botulinum neurotoxin were used for quantitative toxin detection assay. The results showed that type A, B and E were used goat antibody as primary antibody and rabbit complex as secondary antibody. Both antibodies were used concentration type A, B and E as 0.5, 0.5 and 0.5 ug/ml, respectively. For type F was used rabbit complex antibody as primary antibody and goat antibody as secondary antibody. Both antibodies were used concentration type F as 1 ug/ml. The least concentration detection toxin type A, B, E and F were 1, 10, 5 and 1 ng/ml., respectively. The botulinum neurotoxins (A, B, E and F) were detected in spiked 4 type foods (bamboo shoot, fermented soil bean, fermented crab and orange juices) at least about 10-50 ng/ml. The results of this research were developed assays for detection botulinum neurotoxin by ELISA for testing food samples and drinking water. The diagnostic kit is suitable for use in the country and reduces the cost of imports for botulinum neurotoxin test kits from abroad.

Keywords: botulinum neurotoxin, *Clostridium botulnum*, ELISA

Corresponding Author:

Kosum Chansiri

Department of Biochemistry, Faculty of Medicine,

Srinakharinwirot University

114 Sukhumvit Road, Sukhumvit 23, Wattana, Bangkok 10110, Thailand

E-mail: kchansiri@yahoo.com

บทนำ

ในระหว่างปี พ.ศ. 2541- 2549 ประเทศไทยมีการเกิดโรคโบทูลิซึม (Foodborne botulism) ในเขตภาคเหนือหลายครั้ง ได้แก่ ในปี พ.ศ. 2541 เกิดที่จังหวัดน่าน มีผู้ป่วย 13 ราย ตาย 2 ราย ในปี พ.ศ. 2546 เกิดที่จังหวัดลำปาง มีผู้ป่วย 10 ราย ตาย 1 ราย และล่าสุดในปี พ.ศ. 2549 เกิดที่จังหวัดน่าน ทุกครั้งพบว่ามีสาเหตุมาจากการที่ชาวบ้านรับประทานหน่อไม้จากปี๊บโดยไม่ได้นำมาต้มก่อน โดยผู้ป่วยมีอาการของโรคโบทูลิซึมอย่างชัดเจน[1-4] โรค Foodborne botulism พบการระบาดในประเทศสหรัฐอเมริกา จีน อเมริกาใต้ และประเทศในยุโรปตอนใต้และชนิดของสารพิษที่พบบ่อย ได้แก่ ชนิด A และ B โดยมักพบสารพิษในอาหารที่เกี่ยวข้องกับการหมักดองผัก ในปี พ.ศ. 2557 ประเทศฝรั่งเศสมีการระบาดของโรคโบทูลิซึมที่เกิดจากการบริโภคแฮมที่ปนเปื้อนเชื้อ *Clostridium botulinum* (*C. botulinum*) ที่สร้างสารพิษชนิด B และ E[5] ในปี พ.ศ. 2558 ในรัฐโอไฮโอ ประเทศสหรัฐอเมริกาเกิดการระบาดของโรคโบทูลิซึมมีจำนวนผู้ป่วย 77 คน ซึ่งเกิดจากการรับประทานมันฝรั่งกระป๋องที่ปนเปื้อนเชื้อ *C. botulinum* ที่สร้างสารพิษชนิด A[6]

ปัจจุบันกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์มีความสามารถในด้านการตรวจวินิจฉัยเพื่อชันสูตรโรคทางห้องปฏิบัติการ โดยตรวจวินิจฉัยเชื้อ *C. botulinum* จากตัวอย่างที่สงสัยว่าปนเปื้อนเชื้อ *C. botulinum* โดยนำตัวอย่างมาเพาะแยกเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อในภาวะไร้ออกซิเจน ตัวอย่างที่เหมาะสำหรับการตรวจหาเชื้อ *C. botulinum* ได้แก่ Intestinal content อาหารที่ผู้วิจัยสงสัยว่าผู้ป่วยได้รับเชื้อจากการรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อเข้าไป และนำเชื้อที่เพาะแยกได้มาทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี และตรวจพิสูจน์หาชนิดสารพิษหรือ typing ของ *C. botulinum* โดยการฉีดในหนูทดลอง และตรวจยืนยันชนิดของเชื้อโดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) แต่ยังต้องการวิธีทดสอบหาสารพิษด้วยวิธีอื่นเพื่อเป็นทางเลือกที่ลดการใช้สัตว์ทดลอง เช่น วิธี ELISA ซึ่งปัจจุบันวิธี ELISA ได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยงาน Centers for disease control and prevention (CDC) ประเทศสหรัฐอเมริกา ดังนั้น การพัฒนาวิธี ELISA เพื่อจะทำการทดสอบหาชนิดของสารพิษจากเชื้อ *Clostridium* spp. จึงมีความสำคัญมากที่หลีกเลี่ยงจากการใช้สัตว์ทดลองและช่วยให้สามารถตรวจคัดกรองได้อย่างรวดเร็วภายในห้องปฏิบัติการ

วัตถุประสงค์

พัฒนาวิธี ELISA เพื่อทดสอบหาชนิดของโบทูลินัมท็อกซินที่ผลิตจากเชื้อ *Clostridium botulinum*

วิธีการศึกษา

1. สาร Botulinum neurotoxin และ Polyclonal antibody

Botulinum neurotoxin complex ชนิด A, B, E และ F (900 กิโลดาลตัน) สั่งซื้อจากบริษัท Metabiologics (Madison, WI) มีความเป็นพิษเท่ากับ 3.5×10^7 (LD_{50})/มิลลิกรัม, 1.2×10^7 (LD_{50})/มิลลิกรัม, 3.0×10^7 (LD_{50})/มิลลิกรัม และ 5.3×10^6 (LD_{50})/มิลลิกรัม ตามลำดับ

Botulinum neurotoxin complex toxiod เตรียมจากสารพิษ Botulinum neurotoxin complex ชนิด A, B, E และ F (900 กิโลดาลตัน) ที่ได้ถูกลดความเป็นพิษด้วย 0.5% ฟอร์มาลิน สารพิษนี้ได้สั่งซื้อจากบริษัท Metabiologics (Madison, WI) เพื่อนำมาฉีดกระตุ้นสร้างระดับภูมิคุ้มกันให้กระต่าย

Polyclonal antibody (IgG) ที่จำเพาะต่อ Botulinum neurotoxin ชนิด A, B, E และ F สำหรับใช้ในการศึกษานี้ได้สั่งซื้อจากบริษัท Metabiologics (Madison, WI) ซึ่งเป็นชนิด Goat IgG ที่ถูก biotinylated ด้วย N-hydroxysuccinimidobiotin (Sigma-Aldrich, St. Louis) และ Anti-rabbit IgG HRP conjugate สั่งซื้อจากบริษัท Jackson ImmunoResearch, Inc. (West Grove, PA)

2. การกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และการตรวจหาระดับภูมิคุ้มกัน

การกระตุ้นสร้างภูมิคุ้มกันต่อ Botulinum toxin ในกระต่ายสายพันธุ์ Newzealand white การทดสอบนี้ดำเนินภายใต้ระเบียบข้อบังคับการใช้สัตว์ทดลองตาม Guide for the care and use of laboratory animals[7] ของ the National Institutes of Health โดยได้รับการอนุมัติใช้สัตว์ทดลองในการทดลองจากคณะกรรมการจริยธรรมการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลองของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ตามหนังสืออนุมัติเลขที่ 001/2554, 002/2555 และ 009/2556 ดำเนินการโดยฉีด Botulinum neurotoxin toxoid ชนิด A, B, E และ F จากบริษัท Metabiologics (Madison, WI) ปริมาณ 100 ug เข้าใต้ผิวหนังกระต่ายแต่ละตัวในวันแรก, วันที่ 14, วันที่ 28, วันที่ 42 และ วันที่ 75 ในการฉีดเข็มแรกโดยใช้ adjuvant ชนิด Complete Freund's adjuvant (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) ตามวิธีการฉีดของ Keller[8] นำมาผสมให้เข้ากันแล้วนำมาบ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 60 นาที ก่อนฉีดเข้าใต้ผิวหนังกระต่าย 2 จุด ส่วนเข็มที่เหลือผสมกับ adjuvant ชนิด Incomplete Freund's adjuvant (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) หลังจากกระต่ายได้รับ Botulinum neurotoxin toxoid จะเจาะเลือดจากเส้นเลือดใบหูกระต่ายปริมาตร 10-20 ml นำมาปั่นแยกซีรั่มเพื่อตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันโดยวิธี Mouse neutralization test โดยใช้หนูทดลองสายพันธุ์ ICR ในการทดสอบเปรียบเทียบกับ standard Botulinum antitoxin (NIBSC, UK)[9] ที่ทราบระดับภูมิคุ้มกันโดยเจือจาง Standard Botulinum antitoxin และซีรั่มกระต่ายที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วย 0.2% fetal bovine serum ผสมกับ 900-kDa Botulinum neurotoxin complex ขนาดประมาณ 10 และ 100 mouse LD_{50} ผสมกันแล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1-2 ชั่วโมง จึงนำไปฉีดเข้าในหนูทดลอง สังเกตอาการและจำนวนหนูที่ตายและรอดชีวิตในแต่ละความเข้มข้นเป็นเวลา 14 วันและนำมาคำนวณหาระดับ 50% protection ของ standard botulinum antitoxoin และของซีรัมกระต่าย ด้วยวิธี Modified Reed & Muench[10] แบบวิธีของ Spearman-Karber[11,12] เมื่อฉีดกระต่ายได้ครบวันที่ 75 นำมาเจาะเก็บเลือดจากหัวใจเพื่อเก็บเลือดปริมาณมาก และนำมาคำนวณหาระดับภูมิคุ้มกันของกระต่ายที่ได้รับสารพิษชนิด A, B, E และ F เพื่อนำมาใช้ในการทดสอบ ELISA

3. การเคลือบเพลทด้วย polyclonal antibody

เตรียมการเคลือบเพลทด้วย primary polyclonal antibody ชนิด A, B, E, และ F ของ Goat IgG หรือ Rabbit โดยนำมาเจือจางด้วย 0.006 M Carbonate bicarbonate buffer pH 9.0 (CB) ใส่ปริมาตรหลุมละ 100 ul เคาะด้านข้างเพลทเบาๆ ปิดฝาเพลทใส่ในกล่องที่มีความชื้น เก็บที่อุณหภูมิ 2-8°C นาน 16-24 ชั่วโมง ล้างเพลทด้วย Phosphate Buffered Saline Tween-20 (PBS-T) จำนวน 3 ครั้ง เคาะเพลทให้แห้ง ล้างฝาเพลทด้วยน้ำสะอาดเช็ดให้แห้ง จากนั้นเติม 1 % Bovine serum albumin (BSA) ที่ละลายใน Phosphate Buffered Saline (PBS) ปริมาตร 200 ul ในทุกหลุมของเพลท เพื่อ blocking เคาะด้านข้างเพลทเบาๆ ปิดฝาเพลท ใส่ในกล่องที่มีความชื้น เก็บที่อุณหภูมิห้อง (25±5°C) นาน 2 ชั่วโมง ล้างเพลทซ้ำด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เคาะเพลทให้แห้ง วางคว่ำบนกระดาษซับสะอาด ที่อุณหภูมิห้อง (25±5°C) นาน 2 ชั่วโมง ล้างฝาเพลทด้วยน้ำสะอาดเช็ดให้แห้ง

การตรวจด้วยวิธี Antibody Capture ELISA เริ่มด้วยการเติมตัวอย่างสารพิษมาตรฐานที่ถูกเจือจางด้วย PBS ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 1 LD_{50}-1,000 LD_{50} ปริมาตร 50 ul ลงหลุมที่เคลือบเพลทด้วย primary polyclonal antibody เคาะด้านข้างเพลทเบาๆ ปิดฝาใส่ในกล่องที่มีความชื้น เก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเพลทด้วย PBS-T

จำนวน 5 ครั้ง เคาะเพลทให้แห้ง ล้างฝาเพลทด้วยน้ำสะอาดเช็ดให้แห้ง จากนั้นเติม second polyclonal antibody ชนิด A, B, E และ F ของ Goat IgG หรือ Rabbit ที่ถูกทำให้มีความเจือจางแตกต่างกันด้วย 1% BSA (1 % BSA ใน PBS-T) ปิดฝาใส่ในกล่องที่มีความชื้น เก็บที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง ล้างเพลทซ้ำด้วย PBS-T จำนวน 5 ครั้ง เคาะเพลทให้แห้ง ล้างฝาเพลทด้วยน้ำสะอาดและเช็ดให้แห้ง จากนั้นเติม Anti-rabbit IgG HRP conjugate (Promega, Madison, WIS) หรือ Anti-Goat IgG, HRP conjugate (Promega, Madison, WIS) ปริมาตร 50 ul ในทุกหลุม เคาะด้านข้างเพลทเบาๆ ปิดฝาใส่ในกล่องที่มีความชื้น เก็บที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง ล้างเพลทด้วย PBS-T จำนวน 10 ครั้ง เคาะเพลทให้แห้ง ล้างฝาเพลทอีกครั้งด้วยน้ำสะอาดเช็ดให้แห้ง เติม 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) ปริมาตร 100 ul ในทุกหลุม เคาะด้านข้างเพลทเบาๆ ปิดฝาเก็บในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง เติม 1N HCl 100 ul ทุกหลุม เคาะด้านข้างเพลทเบาๆ จากนั้นอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง ELISA Reader รุ่น Bio-Tek model EL 311 (Biotek, VA, USA) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร แปลผลการทดสอบจากการคำนวณค่าการดูดกลืนแสงในหลุมควบคุม (Blank) บวกด้วยห้าเท่าของค่า SD value (Blank ± 5 SD)[13] เป็นช่วง cut off การทดสอบในหลุมควบคุมจะใช้ PBS และไม่มีการเติมสารพิษมาตรฐาน ถ้าตัวอย่างอ่านค่าได้มากกว่าหลุมควบคุมให้แปลผลเป็นบวก ถ้าอ่านค่าได้น้อยกว่าหลุมควบคุมให้แปลผลเป็นลบ

4. การเตรียมตัวอย่างอาหาร

เตรียม botulinum neurotoxin complex ชนิด A, B, E และ F ความเข้มข้น 1 mg/ml ปริมาตร 500 ul ในสารละลาย BSA (1% BSA ใน PBS-T) สำหรับตัวอย่างหน่อไม้ให้ปรับ pH = 7.2 จากนั้นนำตัวอย่างหน่อไม้ ปูดอง และถั่วเน่ามาบดให้ละเอียดและเติม 1% Glyceral broth ในอัตราส่วน 1:3 เสร็จแล้วนำตัวอย่างปั่นที่ความเร็ว 5,000 rpm นาน 10 นาที แยกเอาของเหลวนำมาใช้ ส่วนตัวอย่างน้ำส้มนำมาทำการทดสอบได้โดยไม่ต้องปั่น แบ่งตัวอย่างทั้ง 4 อย่าง จำนวน 20 หลอดๆ ละ 5 ml จากนั้นเติมด้วย neurotoxin complex ชนิดต่างๆ โดยความเข้มข้นของสารพิษได้รับการปรับให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 200, 100, 50 และ 10 ng/ml ทำการผสม botulinum neurotoxin กับตัวอย่างด้วยการเขย่าแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำไปทำทดสอบต่อไป

ผลการศึกษา

1. การทดสอบหา Antibody titer ต่อ botulinum neurotoxin

จากการทดสอบหาระดับ Antibody titer ด้วยวิธี Mouse neutralization โดยการคำนวณหาค่า effective dose 50 (ED_{50}) เปรียบเทียบกับ Standard botulinum antitoxin ที่ทราบระดับแอนติบอดีไตเตอร์ พบว่าเมื่อกระต่ายได้รับ botulinum neurotoxin toxoid ระดับ Neutralizing แอนติบอดีไตเตอร์จะมีค่าสูงขึ้น ผลการทดสอบซีรัมของกระต่ายที่ได้รับสารพิษชนิด A, B, E, F มีระดับ neutralizing antibody คือ 110.5919 IU/ml, 10.24 IU/ml, 21.96 IU/ml และ 3.27 IU/ml ตามลำดับ โดย Botulinum antitoxin ชนิด A, B, F ที่ความเข้มข้น 1 IU สามารถ Neutralized botulinum neurotoxin ขนาด 10,000 LD_{50} ยกเว้นชนิด E 1 IU สามารถ Neutralized botulinum neurotoxin ที่ขนาด 1,000 LD_{50}

2. การเปรียบเทียบความไวของ substrate (Streptavidin และ TMB)

ทำการทดสอบโดยใช้ polyclonal antibody ที่ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 1.5 ug/ml

ในการ coating plate ทดสอบกับ botulinum neurotoxin ที่ความเข้มข้น 1 g/ml เพื่อทดสอบกับคอนจูเกต 2 ชนิด ได้แก่ Streptavidin และ TMB โดยเจือจางที่ความเข้มข้น 1:100, 1:200 และ 1:500 ผลการทดลองจากตารางที่ 1 พบว่าคอนจูเกตที่เป็น TMB ให้ผลที่ดีกว่า Streptavidin ในทุกช่วงความเข้มข้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้ TMB ที่ความเข้มข้น 1:500 เพื่อเป็นคอนจูเกตดังแสดงค่าในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงผลการทดสอบ Conjugate ระหว่าง TMB และ Streptavidin

Capture antibody (ug/ml)	Conjugate dilution	Streptavidin	TMB
0.5	1:100	0.398	0.746
	1:200	0.294	0.659
	1:500	0.209	0.559
1	1:100	0.406	1.097
	1:200	0.192	0.958
	1:500	0.16	0.866
1.5	1:100	0.382	1.189
	1:200	0.264	0.934
	1:500	0.204	0.819

3. การทดสอบความเข้มข้นของ polyclonal antibody เพื่อใช้ในการทดสอบ

การทดสอบหาความเข้มข้นของ polyclonal antibody ของ Goat และ Rabbit ที่เหมาะสมในการเคลือบเพลทของสารพิษทั้ง 4 ชนิด โดยเจือจางความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 1.5 และ 2 ug/ml แล้วทำการเคลือบเพลททั้ง 4 ชนิด โดยสลับกันเป็น primary และ Secondary antibody ซึ่งนำไปทำการทดสอบกับ botulinum neurotoxin ที่ความเข้มข้น 2, 1.5, 1 และ 0.5 ug/ml และใช้ TMB ที่ความเข้มข้น 1:500 เป็น คอนจูเกต ผลการทดสอบความเข้มข้น polyclonal antibody ของ Goat และ Rabbit ที่เหมาะสมสำหรับสารพิษชนิด A, B และ E พบในกลุ่มที่ใช้ primary polyclonal antibody ของ Goat และ Secondary polyclonal antibody ของ Rabbit ที่ความเข้มข้น 0.5, 0.5 และ 0.5 ug/ml ตามลำดับ ส่วนชนิด F พบว่าใช้ primary antibody ของ Rabbit และ Secondary antibody ของ Goat ได้ที่ความเข้มข้น 1 ug/ml (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดงผลการทดสอบความเข้มข้นของ polyclonal antibody ของ Goat และ Rabbit ที่เหมาะสม

Type	Antibody Concentration (ug/ml)	Antigen concentrations (ug/ml)			Blank		Mean±5SD
		2	1	0.5			
A	0.5	2.701	2.242	1.925	0.083	0.084	0.087035534
Ab1: Goat	1	OUT	OUT	OUT	0.106	0.103	0.115106602
Ab2: Rabbit	1.5	OUT	OUT	OUT	0.124	0.122	0.130071068
Botulinum neurotoxin	2	OUT	OUT	OUT	0.141	0.137	0.153142136
B	0.5	1.534	1.383	1.314	0.057	0.062	0.07717767
Ab1: Goat	1	2.926	2.926	2.881	0.084	0.09	0.108213203
Ab2: Rabbit	1.5	OUT	OUT	1.522	0.11	0.114	0.126142136
Botulinum neurotoxin	2	OUT	OUT	OUT	0.097	0.12	0.18981728
E	0.5	2.425	2.378	2.103	0.052	0.054	0.060071068
Ab1: Goat	1	OUT	OUT	1.987	0.152	0.153	0.156035534
Ab2: Rabbit	1.5	OUT	OUT	OUT	0.166	0.142	0.238852814
Botulinum neurotoxin	2	OUT	OUT	OUT	0.204	0.203	0.207035534
F	0.5	0.322	0.235	0.204	0.084	0.087	0.096106602
Ab1: Rabbit	1	0.728	0.53	0.501	0.101	0.098	0.110106602
Ab2: Goat	2	2.301	1.984	1.476	0.141	0.138	0.150106602
Botulinum neurotoxin	1.5	1.291	0.97	0.8	0.104	0.106	0.112071068

หมายเหตุ: Ab1 คือ primary antibody
Ab2 คือ secondary antibody

4. การทดสอบหาความไวและความจำเพาะของวิธี capture ELISA

ทดสอบหาความไวของวิธี capture ELISA โดยเจือจาง botulinum neurotoxin ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 1 ng/ml ถึง 1,000 ng/ml ผลการทดสอบพบว่าสามารถตรวจหาสารพิษชนิด A, B, E และ F ได้น้อยที่สุดที่ความเข้มข้น 1, 10, 5 และ 1 ug/ml ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3 และผลการทดสอบความจำเพาะของวิธี capture ELISA พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามระหว่างสารพิษทั้ง 4 ชนิด ที่ใช้ในการทดสอบ

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบหาความไวของวิธี ELISA

Type	Antigen concentration (ng/ml)										Blank		Mean±5SD
	1000	800	600	400	200	100	50	10	5	1			
A	OUT	OUT	OUT	OUT	OUT	OUT	2.552	1.415	0.984	0.368	0.042	0.044	0.05007
B	2.76	2.047	1.654	1.203	0.804	0.502	0.368	0.121	0.108	0.096	0.08	0.09	0.12035
E	2.619	2.484	2.017	1.753	1.281	0.718	0.418	0.213	0.181	0.111	0.104	0.108	0.12014
F	1.777	1.647	1.596	1.504	1.428	1.365	1.244	0.696	0.348	0.286	0.154	0.152	0.16007

4. การทดสอบหาปริมาณสารพิษในตัวอย่างอาหารที่ใส่ botulinum neurotoxin

ทำการทดสอบหาปริมาณสารพิษในอาหาร โดยเลือกใช้อาหาร 4 ชนิด ได้แก่ หน่อไม้ ปูดอง ถั่วเน่า และน้ำส้ม โดยเติม botulinum neurotoxin ลงไปในตัวอย่างเพื่อให้ได้ความเข้มข้น 200, 100, 50 และ 10 ng/ml ตามลำดับ จากนั้นนำมาทดสอบด้วยวิธี capture ELISA จากการทดสอบพบว่า ตัวอย่างหน่อไม้สามารถตรวจหาสารพิษ ชนิด A, B, E และ F ได้น้อยที่สุดที่ความเข้มข้น 10 ng/ml ตัวอย่างถั่วเน่า ปูดอง และน้ำส้มสามารถตรวจหาสารพิษทั้งชนิด A, B และ E ได้น้อยที่สุดที่ความเข้มข้น 10 ng/ml ส่วนชนิด F สามารถตรวจพบที่ความเข้มข้น 50 ng/ml

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบหาปริมาณสารพิษในตัวอย่างอาหารที่เติม botulinum neurotoxin ลงไปอาหาร

ชนิด	ปริมาณสารพิษน้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบ (ng/ml)			
	หน่อไม้	ถั่วเน่า	ปูดอง	น้ำส้ม
A	10	10	10	10
B	10	10	10	10
E	10	10	10	10
F	10	50	50	50

อภิปรายผล

การศึกษาครั้งนี้ทางผู้วิจัยสามารถหาความเหมาะสมของแอนติบอดีสำหรับ botulinum neurotoxin ชนิด A, B และ E โดยการใช้ primary polyclonal antibody เป็น Goat และ secondary polyclonal antibody เป็น Rabbit ที่ความเข้มข้น 0.5, 0.5 และ 0.5 ug/ml ตามลำดับ ส่วนชนิด F ใช้ primary polyclonal antibody เป็น Rabbit และ secondary polyclonal antibody เป็น Goat ที่ความเข้มข้น 1 ug/ml และการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้ TMB ที่ความเข้มข้น 1:500 เป็นคอนจูเกต วิธี capture ELISA สามารถตรวจหาสารพิษชนิด A, B, E และ F ได้น้อยที่สุดที่ความเข้มข้น 1, 10, 5 และ 1 ng/ml ตามลำดับ จากการศึกษาของ Sharma และคณะ[14] พบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตจากสัตว์ต่อสารพิษ botulinum neurotoxin จะมีความเฉพาะเจาะจงกับชนิด A หรือ B ถึงแม้ว่าสารพิษ botulinum neurotoxin จะมีลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายคลึงกันก็ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามเกี่ยวระหว่างกัน[15-17] Sharma และคณะยังพบว่าไม่มีปฏิกิริยาข้ามเกี่ยวระหว่างแอนติบอดี แม้ความเข้มข้นของ polyclonal antibody จะสูงเป็นห้าเท่าของสารพิษซึ่งแสดงให้เห็นว่า polyclonal

antibody มีความเฉพาะเจาะจงและไม่เกิดปัญหาในวิธีทดสอบ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบหาความจำเพาะในการศึกษาครั้งนี้ Doellgast และคณะกับ Notermans และคณะ[18-19] พบว่าตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมและน้ำเหลืองเป็นตัวอย่างที่ไม่จำเป็นต้องผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างและสามารถทำการทดสอบได้โดยตรง ในทางตรงข้ามตัวอย่างอาหารที่มีองค์ประกอบหลากหลายต้องทำการเตรียมตัวอย่างก่อนการตรวจวิเคราะห์ นอกจากนี้ ตัวอย่างอาหารอาจทำให้เกิด immune complex จาก Protein A, Protein G หรือ lectins ที่รบกวนเมื่อทำการทดสอบ ดังนั้น ในการทดสอบหาสารพิษจึงเลี่ยงไม่ได้ที่จะพบปฏิกิริยาข้ามเกี่ยวในตัวอย่างอาหารทำให้เกิดการรบกวนประสิทธิภาพในการทดสอบในกระบวนการวิธี ELISA จากการศึกษาของ Sharma และคณะ[14] พบว่าตัวอย่างเครื่องเทศอาจจะมีผลยับยั้งกระบวนทดสอบด้วยวิธี ELISA ส่วนการศึกษาของ Ferreira และคณะ[20] พบว่าเชื้อในกลุ่ม nonbotulinum เช่น *Clostridium novyi* ให้ปฏิกิริยาข้ามเกี่ยวกับวิธี amplified ELISA ของสารพิษชนิด A, B, E และ F ทำให้แสดงผลบวกได้ในค่าเกณฑ์การดูดกลืนแสงที่ต่ำ แตกต่างจากการศึกษาของ Sharma และคณะพบว่าเมื่อทดสอบกับ *C. novyi* ไม่พบปฏิกิริยาข้ามเกี่ยว อีกทั้งยังไม่พบว่ามีผลบวกปลอมกับเชื้อในกลุ่ม nonbotulinum

วิธี ELISA เป็นเทคนิคทาง immunoassay ที่พัฒนาเพื่อใช้ในการตรวจหาสารพิษ botulinum neurotoxin ซึ่งมีประโยชน์ในการช่วยลดการทดสอบในสัตว์ทดลองและสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้จำนวนมากในการทดสอบครั้งเดียว ทั้งยังสามารถใช้ตรวจสอบสารพิษได้ในปริมาณน้อยๆ จากการศึกษาก่อนหน้านี้ได้มีการพัฒนาวิธีการทดสอบให้แสดงค่าความไวในการตรวจ botulinum neurotoxin ชนิด A ได้ระหว่าง 10-100 MLD/ml[21-27] และจากการศึกษาของ Singh และคณะ[28] พบว่าการตรวจสอบหาสารพิษ botulinum neurotoxin กับตัวอย่างอาหาร สามารถตรวจพบสารพิษที่มีการปนเปื้อนน้อยที่สุด 700 pg/ml แต่การศึกษาวิจัยครั้งนี้สามารถตรวจพบได้น้อยที่สุดเพียง 1 ng/ml

สรุปผล

การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการตรวจสารพิษ botulinum neurotoxin ด้วยวิธี ELISA สามารถตรวจสอบสารพิษได้ทั้ง 4 ชนิด คือ A, B, E และ F นอกจากนี้ ยังตรวจหาสารพิษได้ในอาหารหลากหลายชนิด ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการทดสอบด้วยวิธี ELISA สามารถใช้เป็นวิธีการตรวจคัดกรองเบื้องต้นเพื่อหาสารพิษที่ก่อให้เกิดโรคโบทูลิซึม (botulism) ซึ่งสามารถนำไปใช้ทดแทนชุดทดสอบจากต่างประเทศและลดการทดสอบในสัตว์ทดลองได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

References

1. Swaddiwudhipong W, Wongwatcharapaiboon P. Foodborne botulism outbreaks following consumption of home-canned bamboo shoots in Northern Thailand. J Med Assoc Thai 2000;83:1021-5.
2. Centers for Disease Control and Prevention. Foodborne botulism associated with home-canned bamboo shoots, Thailand, 1998. MMWR 1999; 48:437-9.
3. Kongsaengdao S, Samintarapanya K, Rusmeechan S, et al. An Outbreak of botulism in Thailand: Clinical manifestations and management of

severe respiratory failure. Clin Infect Dis 2006;43:1247-56.
4. Centers for Disease Control and Prevention. Botulism from Home-Canned Bamboo Shoots – Nan Province, Thailand, March 2006. MMWR 2006;55: 389-92.
5. Mazuet C, Sautereau J, Legeay C, et al. An atypical outbreak of foodborne botulism due to B and E from ham. J Clin Microbiol Clostridium botulinum types 2015;53:722-6.
6. McCarty CL, Angelo K, Beer KD, et al. Large Outbreak of Botulism Associated with a Church Potluck Meal--Ohio, 2015. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2015;64 (29):802-3.
7. National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. Eighth edition National Academy Press, Washington, DC. 2011.
8. Keller JE. Characterization of new formalin-detoxified botulinum neurotoxin toxoids. Clin Vaccine Immunol 2008;15(9):1374-9.
9. Jones RG, Corbel MJ, Sesardic D. A review of WHO International Standards for botulinum antitoxins. Biologicals 2006;34:223-6.
10. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am J Hyg 1938;27:493-7.
11. Spearman C. The Method of "Right and Wrong Cases" (Constant Stimuli) without Gauss's Formula. Br J Psychol 1908;2:227-42.
12. Kärber G. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 1931;162:480-3.
13. Dixit A, Alam SI, Dhaked RK, et al. Development of an immunodetection test for a botulinum-like neurotoxin produced by Clostridium sp. RKD. Indian J Med Res 2006;124(3):355-62.
14. Sharma SK, Ferreira JL, Eblen BS, et al. Detection of type A, B, E, and F Clostridium botulinum neurotoxins in foods by using an amplified enzyme-linked immunosorbent assay with digoxigenin-labeled antibodies. Appl Environ Microbiol 2006;72(2):1231-8.
15. Horiguchi Y, Kozaki S, Sakaguchi G. Determination of Clostridium botulinum toxin by reversed passive latex agglutination. Nippon Juigaku Zasshi 1984;46:487-91.
16. Kozaki S, Miki A, Kamata Y, et al. Immunological characterization of papain-induced fragments of Clostridium botulinum type A neurotoxin and interaction of the fragments with brain synaptosomes. Infect Immun 1989;57: 2634-9.
17. Singh BR, Foley J, Lafontaine C. Physicochemical and immunological characterization of the type E botulinum neurotoxin binding protein purified from Clostridium botulinum. J Protein Chem 1995;14:7-18.
18. Doellgast GJ, Triscott MX, Beard GA, et al. Sensitive enzymelinked immunosorbent

assay for detection of Clostridium botulinum neurotoxins A, B, and E using signal amplification via enzyme-linked coagulation assay. J Clin Microbiol 1993;31:2402-9.

19. Notermans S, Nagel J. Assay for botulinum and tetanus toxins In : Simpson L, editor. Botulinum neurotoxin and tetanus toxin. Academic Press ed. New York; 1898. p.319-31.
20. Ferreira JL, Maslanka S, Johnson E, et al. Detection of botulinal neurotoxins A, B, E, and F by amplified enzyme-linked immunosorbent assay: collaborative study. J AOAC Int 2003;86:314-31.
21. Dezfulian M, Bartlett JG. Detection of Clostridium botulinum type A toxin by enzyme-linked immunosorbent assay with antibodies produced in immunologically tolerant animals. J Clin Microbiol 1984;19:645-8.
22. Dezfulian M, Hatheway CL, Yolken RH, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Clostridium botulinum type A and type B toxins in stool samples of infants with botulism. J Clin Microbiol 1984;20:379-83.
23. Doellgast GJ, Beard GA, Bottoms JD, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay and enzyme-linked coagulation assay for detection of Clostridium botulinum neurotoxins A, B, and E and solution-phase complexes with dual label antibodies. J Clin Microbiol 1994;32:105-11.
24. Doellgast GJ, Triscott MX, Beard GA, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay-enzyme-linked coagulation assay for detection of antibodies to Clostridium botulinum neurotoxins A, B, and E and solution-phase complexes. J Clin Microbiol 1994;32:851-3.
25. Poli MA, Rivera VR, Neal D. Development of sensitive colorimetric capture ELISAs for Clostridium botulinum neurotoxin serotypes E and F. Toxicon 2002;40:797-802.
26. Wictome M, Newton K, Jameson K, et al. Development of an in vitro bioassay for Clostridium botulinum type B neurotoxin in foods that is more sensitive than the mouse bioassay. Appl. Environ Microbiol 1999;65:3787-92.
27. Wictome M, Newton KA, Jameson K, et al. Development of in vitro assays for the detection of botulinum toxins in foods. FEMS Immunol Med Microbiol 1999;24:319-23.
28. Singh A, Datta S, Sachdeva A, et al. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit for the detection of botulinum neurotoxins A, B, E, and F in selected food matrices. Health Secur 2015;13(1):37-44.

.