การพัฒนาชุดทดสอบสารพิษเตโตรโดท็อกซิน

อารี ทัตติยพงศ์* ดารินี พูลโสภา* นันทวรรณ เมฆา* จิราภา อุณหเลขกะ
ลัดดาวัลย์ โรจนพรรณทิพย์*** พนาวัลย์ กลึงกลางดอน*** และปฐม สวรรค์ปัญญาเลิศ***
สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000
***ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 4 สมุทรสงคราม อำเภอเมือง สมุทรสงคราม 75000*
****สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000*

บทคัดย่อ เตโตรโดท็อกซิน [Tetrodotoxin (TTX)] เป็นสารพิษที่พบในปลาปักเป้า มีผลต่อระบบประสาท โดยขัดขวางการเข้าออกของโซเดียมไอออนใน Na+ channel ของเยื่อหุ้มเซลล์ประสาท มีฤทธิ์โดยตรงต่อเซลล์กล้ามเนื้อ โดยผู้ที่ได้รับสารพิษจากการรับประทานปลาปักเป้า จะเกิดอาการชารอบปาก แขนขาไม่มีแรง เป็นอัมพาต หายใจติดขัด และอาจเสียชีวิต วิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณเตโตรโดท็อกซิน คือ HPLC หรือ LC-MS ซึ่งทั้งสองวิธีต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง ผู้วิเคราะห์ต้องมีความรู้ ความชำนาญ ใช้เวลาในการวิเคราะห์นานและวิเคราะห์ได้ครั้งละ 1 ตัวอย่าง และทำได้ในห้องปฏิบัติการอ้างอิงเท่านั้น ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้พัฒนาชุดทดสอบเตโตรโดท็อกซินด้วยวิธีอิมมูโนโครมาโตกราฟี (TTX-IC) ซึ่งเป็นชุดทดสอบเบื้องต้นที่ง่ายทำได้สะดวก และรวดเร็ว อ่านผลภายใน 5 นาที วิเคราะห์ได้ครั้งละหลาย ๆ ตัวอย่าง ไม่ต้องอาศัยผู้ชำนาญในการทดสอบ ชุดทดสอบ TTX-IC ที่พัฒนาขึ้น มี Limit of detection เท่ากับ 2 พีพีเอ็ม ไม่พบปฏิกิริยาข้ามกันกับสารพิษ Saxitoxin ที่พบในปลาปักเป้าน้ำจืด จากการประเมินผลในภาคสนามเปรียบเทียบผลการทดสอบกับวิธี LC-MS/MS โดยใช้ตัวอย่างเนื้อปลาปักเป้าจำนวน 22 ตัวอย่าง พบว่าชุดทดสอบมีความไวร้อยละ 100 และความจำเพาะร้อยละ 80

บทนำ

เตโตรโดท็อกซิน [Tetrodotoxin (TTX)] เป็นสารพิษออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทโดยขัดขวางการเข้าออกของโซเดียมอิออนในเยื่อหุ้มเซลล์ประสาท[1] มีสูตรโครงสร้าง $C_{11}H_{17}N_3O_8$ น้ำหนักโมเลกุล 319.3 ดาลตัน พบมากในรังไข่ ตับ ไข่ หนัง และกล้ามเนื้อของปลาปักเป้า[2] นอกจากนี้ยังพบในแมงดาถ้วย คางคก ผู้รับประทานเนื้อปลาที่ปนเปื้อนเตโตรโดท็อกซิน จะเกิดอาการชาที่ริมฝีปาก มือ และเท้ากล้ามเนื้ออ่อนแรงเป็นอัมพาต หายใจขัด อาจเสียชีวิตอาการพิษเกิดได้ภายใน 10-45 นาทีหลังรับประทาน พบว่าเตโตรโดท็อกซิน 2 มิลลิกรัมเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคถึงชีวิต[2] กระทรวงสาธารณสุขจึงมีประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 264 พ.ศ. 2545[3] ให้ปลาปักเป้าทุกชนิดและอาหารที่มีเนื้อปลาปักเป้าเป็นส่วนผสมเป็นอาหารที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือจำหน่าย ซึ่งสารพิษดังกล่าวไม่ได้มีในปลาปักเป้าทุกตัว ชาวญี่ปุ่นนิยมบริโภคปลาปักเป้าโดยไม่ได้รับอันตรายเพราะสามารถแยกสายพันธุ์ปลาปักเป้าที่มีสารพิษและไม่มีสารพิษได้ และยังทราบวิธีการแล่ปลาไม่ให้มีสารพิษปนเปื้อน ทำให้สามารถบริโภคได้โดยไม่เป็นอันตราย

Accepted for publication, 13 October 2010

ปัจจุบันการตรวจวิเคราะห์หาสารพิษเตโตรโดท็อกซิน ทำโดยการนำสารสกัดเตโตรโดท็อกซินจากปลาฉีดเข้าสัตว์ทดลอง (วิธี Mouse bioassay) เพื่อดูความเป็นพิษ หรือวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน High performance liquid chromatography (HPLC)[4] หรือ Liquid chromatgraphy-mass spectrophotometry (LC/MS) วิธีแรกต้องใช้สัตว์ทดลอง วิธีหลังต้องการเครื่องมือพิเศษราคาแพงที่ไม่มีในห้องปฏิบัติการทั่วไป วิธีการวิเคราะห์ยุ่งยาก ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญมีประสบการณ์ และทำได้ในห้องปฏิบัติการบางแห่งเท่านั้น

ชุดทดสอบแอนติเจนด้วยวิธีอิมมูโนโครมาโตกราฟิกเอสเสย์ หรือ Lateral flow ได้พัฒนาตั้งแต่ปลาย ค.ศ. 1980[5] ปัจจุบันชุดทดสอบที่ใช้หลักการนี้มีจำหน่ายมากมาย เช่น ชุดทดสอบฮอร์โมนต่าง ๆ ได้แก่ ชุดทดสอบการตั้งครรภ์ ชุดทดสอบ tumor marker ได้แก่ ชุดทดสอบมะเร็งลำไส้ ชุดทดสอบมะเร็งต่อมลูกหมาก ชุดทดสอบไวรัส ได้แก่ ชุดทดสอบ HIV, ชุดทดสอบ Hepatitis B และ C ชุดทดสอบแบคทีเรีย ได้แก่ ชุดทดสอบเชื้อ *Streptococcus* group A, ชุดทดสอบเชื้อ *Chlamydia trachomatis* และชุดทดสอบเชื้อ *Helicobacter pyroli* เป็นต้น แต่ยังไม่มีชุดทดสอบเตโตรโดท็อกซินจำหน่าย แต่ปัจจุบันมีผู้วิจัยการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเตโตรโดท็อกซิน[6, 7]

ชุดทดสอบที่ใช้หลักการอิมมูโนโครมาโตกราฟิกเอสเสย์ ทำได้ง่ายและอ่านผลได้เร็วภายใน 2-15 นาที อาศัยปฏิกิริยาการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดี โดยติดฉลากแอนติบอดีที่จำเพาะกับเม็ดลาเท็กสี หรือนาโนพาร์ทิเคิล เช่น colloidal gold[8] การประกอบชุดทดสอบมี 2 แบบ คือ แบบ sandwich format ซึ่งเหมาะกับแอนติเจนที่มีโมเลกุลใหญ่ และแบบ competitive format ที่เหมาะกับเฮปเทนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ แอนติบอดีที่ติดฉลากจะจับกับแอนติเจนในตัวอย่าง แล้วเคลื่อนไปจับกับสารที่สเปรย์บนแถบทดสอบ (test line) และแถบควบคุม (control line) สารที่สเปรย์บนแถบทดสอบแบบ sandwich format เป็นแอนติบอดีตัวที่สองซึ่งสามารถจับกับแอนติเจนในตัวอย่างที่ได้จับกับแอนติบอดีจำเพาะแล้วเคลื่อนมาที่แถบทดสอบจึงมองเห็นแถบสีปรากฏที่แถบทดสอบ ส่วนสารที่สเปรย์บนแถบทดสอบชนิด competitive format เป็นแอนติเจนบริสุทธิ์ เมื่อแอนติบอดีที่ติดฉลากกับเม็ดพาร์ทิเคิลจับแอนติเจนในตัวอย่างเคลื่อนไปถึงแถบทดสอบถ้าแอนติเจนในตัวอย่างจับแอนติบอดีที่ติดฉลากหมดไม่เหลือแอนติบอดีให้จับกับแอนติเจนบนแถบทดสอบจึงไม่ปรากฏแถบสี แถบควบคุมจะปรากฏแถบสีทุกครั้งที่ทดสอบเพราะสามารถจับกับแอนติบอดีที่ติดฉลากได้ สำหรับการพัฒนาชุดทดสอบเตโตรโดท็อกซินซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะใช้แบบ competitive format การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและผลิตชุดทดสอบตรวจกรองสารพิษเตโตรโดท็อกซินด้วยวิธีอิมมูโนโครมาโตกราฟีและประเมินประสิทธิภาพชุดทดสอบในภาคสนาม

วัสดุและวิธีการ

1. การเตรียมสารสกัด TTX

นำตัวอย่างปลาปริมาณ 200-250 กรัมหรือในปริมาณที่เหมาะสมโดยไม่น้อยกว่า 3 กรัม บดให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน ชั่งเนื้อปลาบด 2 กรัม ใส่ 0.1% acetic acid อัตราส่วน 1:4 (น้ำหนัก/ปริมาตร) แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที โดยเขย่าหลอดเป็นระยะ ๆ เมื่อครบเวลานำหลอดมาวางที่อุณหภูมิห้อง สารสกัดในหลอดจะแยกชั้นเป็นสองส่วน ส่วนล่างเป็นเนื้อปลา ส่วนบนเป็นสารละลายใสซึ่งเป็นส่วนที่มี TTX ปนอยู่

2. การเตรียมชุดทดสอบ TTX-IC

2.1 การเตรียม conjugated BSA-TTX

ผสม TTX (Sigma Aldrich Inc., USA) 1 มิลลิกรัม และ Bovine serum albumin (BSA) 12.36 มิลลิกรัม ใน 1M sodium acetate pH 7.4 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน แล้วเติม 37% formaldehyde ปริมาตร 82 ไมโครลิตร ครั้งละ 1 หยด โดยใช้เครื่องเขย่า บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ใน shaking incubator เป็นเวลา 3 วัน แล้วทำ dialysis ที่ 4 องศาเซลเซียสด้วย 0.1 M Phosphate buffer saline pH 7.4 (PBS) ครั้งละ 1 ลิตร เป็นเวลา 2 วัน เปลี่ยน PBS วันละ 2 ครั้ง อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร คำนวณความเข้มข้นของ conjugated BSA-TTX (ความเข้มข้นของ conjugated BSA-TTX = OD280/0.667 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

2.2 การเตรียม colloidal gold particle

ต้ม 1% gold (III) chloride trihydrate (Sigma Aldrich Inc.) 100 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นที่เดือด 1 ลิตร เป็นเวลา 2 นาที แล้วเติม 1% sodium citrate 21.5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 นาที หลังจากนั้นรอจนเย็น แล้วนำ colloidal gold particle ไปสแกนความยาวคลื่นที่ให้การดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank ค่า λ_{max} ควรอยู่ระหว่าง 519-520 นาโนเมตร

2.3 เตรียม conjugated colloidal gold-anti TTX

ไปเปต colloidal gold particle ตามที่ต้องการ ปรับ pH ให้ได้ 7.3-7.4 เติม anti-TTX (Hawaii Biotech Inc.) 3.0 ไมโครกรัมต่อ colloidal gold particle 1 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ 10 นาที เติม 1% BSA แล้วเขย่าเบา ๆ 10 นาที ปั่นตกตะกอนที่ 15,500 xg, ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ละลายตะกอนใน passive gold diluent (PGD; 0.001 M NaHPO4, 1% BSA, 8% sucrose, 2% trehalose) วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ให้ได้ optical density (OD) เท่ากับ 15 จะได้ conjugated-colloidal gold-anti TTX พร้อมใช้งาน

2.4 การเตรียม conjugated releasing pad, reaction membrane และ sample pad

2.4.1 การเตรียม conjugated releasing pad

จุ่ม conjugated releasing pad (CFCP 203000, Millipore Inc.) ช้า ๆ ลงในถาดที่มี conjugated releasing pad blocking buffer pH 8.0 (0.005 M $B_4Na_2O_7$, 4% goat serum, 3% BSA, 1% PVP-40) จนชุ่มประมาณ 2-3 นาที ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ วาง conjugated releasing pad บนกระดาษซับ ซับให้แห้ง นำไปบ่มให้แห้ง ในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

2.4.2 การเตรียมเมมเบรน (reaction membrane)

เท blocking buffer (0.01M NaH_2PO_4, 0.1% sucrose, 0.1% BSA, 0.1% PVP-40) ลงบน cellulose membrane (AE100, Whatman Corp.) จากริมด้านบนช้า ๆ ปล่อยให้สารละลาย buffer ไหลลงจนกระทั่ง เมมเบรนชุ่ม ซับส่วนเกินของ buffer ด้วยกระดาษซับเบา ๆ ระวังอย่าให้เมมเบรนขาด นำเมมเบรนไปตากให้แห้งในตู้อบที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

2.4.3 การเตรียม sample pad

ใช้ sample pad (Surewick C408, Millipore Corp.) ทำเช่นเดียวกับการเตรียม conjugated pad แต่ใช้ sample pad buffer pH 8.0 (0.5M Trisma-base, 0.2% 10G, 0.1%tween20, 0.25%PVP-40, 0.2%SDS) แทน membrane blocking buffer

2.5 การพ่นแถบทดสอบ และแถบควบคุม

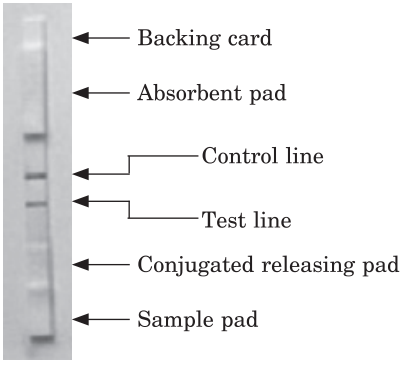
ใช้เครื่อง Biodot : BJQ 3000 model XYZ 3200 พ่น conjugated BSA-TTX ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ตำแหน่งแถบทดสอบด้วยความเร็ว 0.8 ไมโครลิตร/เซนติเมตร และพ่น anti-mouse Ig ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ตำแหน่งแถบควบคุมด้วยความเร็ว 0.8 ไมโครลิตร/เซนติเมตร แล้วนำเมมเบรนไป block ด้วย blocking buffer ตามข้อ 2.4.2 หลังจากนั้นนำไปอบให้แห้งที่ 37 องศาเซลเซียส

2.6 การพ่น conjugated pad

พ่น conjugated colloidal gold-anti-TTX บน conjugated pad ที่ block แล้ว ด้วยเครื่อง Biodot : BJQ 3000 model XYZ 3200 ความเร็ว 10 ไมโครลิตร/เซนติเมตร เมื่อพ่นเสร็จแล้วรอจนแห้งจึงนำมาประกอบเป็นชุดทดสอบ

2.7 การประกอบชุดทดสอบ

วางเมมเบรนตลอดแนว backing card แล้ววาง conjugated pad ทับเมมเบรน ด้านแถบทดสอบวาง wick (Whatman #470, Whatman Inc.) ทับด้านแถบควบคุม นำไปตัดเป็นชิ้นขนาด 4-5 มิลลิเมตร แล้วนำมาใส่ตลับ โดยให้ด้านหยดตัวอย่างซึ่งมีหลุมอยู่บนด้าน sample pad (ภาพที่ 1 และ 2)



ภาพที่ 1 ส่วนประกอบของชุดทดสอบขณะที่ยังไม่ได้ทดสอบจะมองไม่เห็นแถบ Test line และ Control line และที่ conjugated releasing pad มีสีแดงของ colloidal gold particle

(2 ก) (2 ข)

ภาพที่ 2 ผลบวกและผลลบเมื่อทดสอบด้วยชุดทดสอบ (2 ก) ผลลบ : พบแถบสีแดงบนแผ่นทดสอบ 2 แถบ (2 ข) ผลบวก : พบแถบสีแดงบนแผ่นทดสอบ 1 แถบ

2.8 วิธีการวิเคราะห์ด้วยชุดทดสอบ

นำตัวอย่างสารสกัดส่วนใส 100 ไมโครลิตร หยดลงบนหลุมบนตลับชุดทดสอบ วางไว้ 5 นาที อ่านผลการทดสอบ ผลบวกจะพบแถบสีแดงบนแผ่นทดสอบ 1 แถบ ที่ตำแหน่งแถบควบคุม ผลลบจะพบแถบสีแดงบนแผ่นทดสอบ 2 แถบที่ตำแหน่งแถบควบคุมและแถบทดสอบ

3. การศึกษาประสิทธิภาพของชุดทดสอบ

3.1 การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection LOD) เจือจางสารมาตรฐานเตโตรโดท็อกซิน ใน 0.1% acetic acid ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 และ 0.7 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยชุดทดสอบ ทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

3.2 การศึกษาความถูกต้องของชุดทดสอบในห้องปฏิบัติการ

3.2.1 นำตัวอย่างสารสกัดจากปลาที่ทราบปริมาณเตโตรโดท็อกซิน โดยการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC จำนวน 99 ตัวอย่าง จากกรมประมง มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับชุดทดสอบ

3.2.2 เลือกตัวอย่างสารสกัดปลาปักเป้าที่ทราบปริมาณเตโตรโดท็อกซิน มาเติมสารมาตรฐานเตโตรโดท็อกซิน ให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยชุดทดสอบ

3.3 การศึกษาปฏิกิริยาข้ามกัน (cross reaction) กับ saxitoxin

ศึกษาปฏิกิริยาข้ามกันกับ สารพิษ saxitoxin ที่พบในปลาปักเป้าน้ำจืด[9] โดยนำตัวอย่างสารสกัดที่มี saxitoxin 4 ตัวอย่างที่ได้วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC จากฝ่ายพิษวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข มาวิเคราะห์ด้วยชุดทดสอบ

3.4 การประเมินประสิทธิภาพของชุดทดสอบในภาคสนาม

เก็บตัวอย่างเนื้อปลาปักเป้าแล่แล้วที่จำหน่ายในจังหวัดสมุทรสาคร จำนวน 113 ตัวอย่าง ทุกตัวอย่างตรวจวิเคราะห์สารพิษด้วยชุดทดสอบ TTX-IC จากนั้นนำตัวอย่างบวกทุกตัวอย่างจำนวน 10 ตัวอย่าง และสุ่มตัวอย่างลบร้อยละ 12 มาตรวจยืนยันด้วยวิธี LC-MS/MS ตัวอย่างทั้งหมดที่ใช้ในการประเมินประสิทธิภาพชุดทดสอบ เท่ากับ 22 ตัวอย่าง

ผล

การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ

จากการทดสอบหาขีดจำกัดของการตรวจพบ หรือค่า LOD โดยทดสอบด้วยสารมาตรฐานเตโตรโดท็อกซินที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ตั้งแต่ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, และ 0.7 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ด้วยชุดทดสอบ TTX-IC พบว่า ความเข้มข้นต่ำสุดที่ให้ผลบวกคือ 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในการสกัดเตโตรโดท็อกซินจากตัวอย่างปลาใช้อัตราส่วนเนื้อปลา 1 กรัมต่อน้ำยาสกัด 4 มิลลิลิตร ดังนั้นจากการคำนวณปริมาณเตโตรโดท็อกซินที่ปนเปื้อนในเนื้อปลาที่ความเข้มข้นต่าง ๆที่นำมาทดสอบจึงเท่ากับ 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4, และ 2.8 พีพีเอ็ม ตามลำดับ ปริมาณเตโตรโดท็อกซินต่ำสุดที่ตรวจสอบได้จึงเท่ากับ 2.0 ไมโครกรัม/เนื้อปลา 1 กรัม หรือเท่ากับ 2 พีพีเอ็ม (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบสารพิษเตโตรโดท็อกซินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยชุดทดสอบ TTX-IC

ตัวอย่างที่	ปริมาณสารเตโตรโดท็อกซิน (พีพีเอ็ม)							
	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0	2.4	2.8
1	–	–	–	–	–	+	+	+
2	–	–	–	–	–	+	+	+
3	–	–	–	–	–	+	+	+

การศึกษาความถูกต้องของชุดทดสอบในห้องปฏิบัติการ

จากผลการใช้ชุดทดสอบตรวจสอบตัวอย่างสารสกัดปลาปักเป้า จำนวน 99 ตัวอย่าง ที่ทราบปริมาณเตโตรโดท็อกซินจากการตรวจสอบด้วยวิธี HPLC แล้วนำผลการทดสอบจากทั้งสองวิธีมาเปรียบเทียบกัน ชุดทดสอบที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็นชุดที่ผลิตในรุ่นแรก ๆ ที่มี LOD 1.2 พีพีเอ็ม พบว่ามีความไว 93.8% และความจำเพาะ 84.0% จากการศึกษาในรายละเอียด (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ตัวอย่างที่ให้ผลบวกปลอมและผลลบปลอมมีค่าใกล้ ๆ LOD และไม่พบผลลบปลอมในตัวอย่างที่มีปริมาณเตโตรโดท็อกซินสูง (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ความไวและความจำเพาะของชุดทดสอบในห้องปฏิบัติการ

ชุดทดสอบ		HPLC		
		+	–	
TTX-IC	+	58	6	64
	–	4	31	35
Total		62	37	99

ความไวของชุดทดสอบ = (58/62) × 100 = 93.5%

ความจำเพาะของชุดทดสอบ = (31/37) × 100 = 84.0%

จากการตรวจสอบความถูกต้องของชุดทดสอบในตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานเตโตรโดท็อกซินลงในสารสกัดเตโตรโดท็อกซินที่ทราบปริมาณ พบว่าชุดทดสอบให้ผลลบเมื่อสารเตโตรโดท็อกซิน ในตัวอย่างมีค่าสูงสุด 1.836 พีพีเอ็ม และให้ผลบวกเมื่อเตโตรโดท็อกซิน มีปริมาณต่ำสุด 2.156 พีพีเอ็ม ซึ่งตรงกับค่า LOD ของชุดทดสอบ คือ 2 พีพีเอ็ม (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบสารสกัดปลาปักเป้าที่เติมสารมาตรฐานเตโตรโดท็อกซินปริมาณต่าง ๆ ด้วยชุดทดสอบ TTX-IC

ลำดับที่	TTX (ppm)	ผลการทดสอบด้วย TTX-IC	หมายเหตุ
1	0.556	–	สารสกัดปลาปักเป้า
2	1.356	–	สารสกัดปลาปักเป้า + TTX 0.80 พีพีเอ็ม
3	1.756	–	สารสกัดปลาปักเป้า + TTX 1.20 พีพีเอ็ม
4	2.156	+	สารสกัดปลาปักเป้า + TTX 1.60 พีพีเอ็ม
5	2.556	+	สารสกัดปลาปักเป้า + TTX 2.00 พีพีเอ็ม
6	0.636	–	สารสกัดปลาปักเป้า
7	1.436	–	สารสกัดปลาปักเป้า + TTX 0.80 พีพีเอ็ม
8	1.836	–	สารสกัดปลาปักเป้า + TTX 1.20 พีพีเอ็ม
9	2.236	+	สารสกัดปลาปักเป้า + TTX 1.60 พีพีเอ็ม
10	2.636	+	สารสกัดปลาปักเป้า + TTX 2.00 พีพีเอ็ม

การตรวจสอบปฏิกิริยาข้ามกันกับ saxitoxin

เนื่องจาก saxitoxin ซึ่งเป็นสารพิษที่พบในปลาปักเป้าน้ำจืด ไม่มีจำหน่าย จึงไม่สามารถนำสารบริสุทธิ์มาใช้ในการศึกษาปฏิกิริยาข้ามกันได้ การวิจัยนี้ได้ใช้ตัวอย่างที่ปนเปื้อนสารพิษ saxitoxin ซึ่งผ่านการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC มาวิเคราะห์ด้วยชุดทดสอบ จากผลการทดสอบ (ตารางที่ 4) พบว่าตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับ saxitoxin ด้วยวิธี HPLC เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยชุดทดสอบให้ผลลบทั้งหมด

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบปฏิกิริยาข้ามกันกับ saxitoxin

ลำดับที่	ชื่อตัวอย่าง	ผลการทดสอบด้วย TTX-IC
1.	น้ำแกง (saxitoxin positive)	–
2.	น้ำแกง (saxitoxin positive)	–
3.	urine (saxitoxin negative)	–
4.	urine (saxitoxin negative)	–
5.	TTX 2 ppm. (ตัวควบคุมผลบวก)	+
6.	saxitoxin มาตรฐาน (ตัวควบคุมผลลบ)	–

การประเมินประสิทธิภาพชุดทดสอบในภาคสนาม

ตัวอย่างที่ใช้ประเมินเป็นเนื้อปลาปักเป้าแล่จากโรงแล่ที่ไม่ได้มาตรฐาน 7 แห่ง จำนวน 113 ตัวอย่าง (ปลาปักเป้าชนิด *L. lunaris* 20 ตัวอย่าง และชนิด *L. spadiceus* 93 ตัวอย่าง) ทุกตัวอย่างตรวจวิเคราะห์สารพิษด้วยชุดทดสอบ TTX-IC จากนั้นนำ 22 ตัวอย่าง [ตัวอย่างบวก 10 ตัวอย่าง และสุ่มตัวอย่างลบ 12 ตัวอย่าง (ร้อยละ 12)] ไปตรวจยืนยันด้วยวิธี LC-MS/MS ผลการทดสอบ (ตารางที่ 5-6)

การประเมินประสิทธิภาพชุดทดสอบในภาคสนาม (ตารางที่ 5) พบว่าปลาปักเป้าที่แล่โดยโรงแล่ดังกล่าวเมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยชุดทดสอบจำนวน 113 ตัวอย่างให้ผลบวก 10 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 8.85 เมื่อนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยชุดทดสอบจำนวน 10 ตัวอย่างไปตรวจยืนยันด้วย วิธี LC/MS/MS พบว่าให้ผลบวก 7 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 6.19 (ตารางที่ 6)

เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยชุดทดสอบกับวิธี LC-MS/MS โดยใช้ตัวอย่าง 22 ตัวอย่างดังกล่าวข้างต้น พบว่าชุดทดสอบมีความไวร้อยละ 100 และความจำเพาะร้อยละ 80 ชุดทดสอบมีผลบวกปลอม 3 ตัวอย่างจากตัวอย่างผลลบทั้งหมด 15 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 20 และไม่มีผลลบปลอม (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์เนื้อปลาปักเป้าแล่ด้วยชุดทดสอบ TTX-IC

ชนิด	จำนวนตัวอย่าง	ผลบวก (%)	ผลลบ (%)
L. lunaris	20	2 (10)	18 (90)
L. spadiceus	93	8 (8.6)	85 (91.4)
รวม	113	10 (8.85)	103 (91.15)

ตารางที่ 6 ความไวความจำเพาะของชุดทดสอบ TTX-IC เทียบกับวิธี LC-MS/MS

ชุดทดสอบ		LC-MS/MS		
		+	–	
TTX-IC	+	7	3	10
	–	0	12	12
	Total	7	15	22

ความไว = 7/7 × 100 = 100%, ความจำเพาะ = 12/15 × 100 = 80%
ผลบวกปลอม = 3/15 × 100 = 20%

วิจารณ์

ญี่ปุ่นและเกาหลีเป็นประเทศที่นิยมบริโภคเนื้อปลาปักเป้า โดยที่ผู้บริโภคไม่ได้รับอันตรายเนื่องจากผู้แล่เนื้อปลาต้องได้รับการอบรมและขึ้นทะเบียน ทั้งสองประเทศได้กำหนดเกณฑ์การปนเปื้อนของเตโตรโดท็อกซินในเนื้อปลาปักเป้าไว้ไม่เกิน 2.2 พีพีเอ็ม (10 mouse unit)[10] ซึ่งเป็นปริมาณปนเปื้อนที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค ดังนั้นชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้น ควรมีค่า LOD ใกล้เคียง 2.2 พีพีเอ็ม ในกรณีที่มี LOD ต่ำกว่า 2 พีพีเอ็ม จะเกิดผลบวกปลอม และถ้า LOD สูงกว่า 2 พีพีเอ็มจะเกิดผลลบปลอม จากการศึกษา LOD ของชุดทดสอบ TTX-IC พบว่ามี LOD 2 พีพีเอ็ม ซึ่งเหมาะสมที่จะนำไปใช้เป็นชุดทดสอบในการตรวจกรองการปนเปื้อนของเตโตรโดท็อกซิน ในเนื้อปลาปักเป้า

ส่วนประกอบอื่น ๆ ของเนื้อปลาอาจส่งผลกระทบต่อการทดสอบ จากการทดลองเติมสารมาตรฐานเตโตรโดท็อกซินลงในสารสกัดจากปลาปักเป้าแล้วตรวจสอบด้วยชุดทดสอบ พบว่าตัวอย่างให้ผลบวกเมื่อค่าสูงกว่า 2 พีพีเอ็ม แสดงว่าสารอื่น ๆที่ปนอยู่ในสารสกัด ไม่มีผลหรืออาจมีผลน้อยต่อการทดสอบ อย่างไรก็ตามควรทดสอบตัวอย่างที่มีเตโตรโดท็อกซินระหว่าง 1.836-2.156 พีพีเอ็มด้วย ถ้าผลบวกมีค่าปริมาณเข้าใกล้ LOD มากที่สุด จะทำให้ค่า LOD ถูกต้องมากยิ่งขึ้น แต่การเติมสารมาตรฐานเตโตรโดท็อกซินที่มีค่าน้อยมากในระดับไมโครกรัมทำได้ยาก ผู้วิจัยจึงไม่ได้ทดสอบตัวอย่างที่มีปริมาณเตโตร-โดท็อกซินในช่วงนั้น แต่ปริมาณเตโตรโดท็อกซินที่ 2.156 พีพีเอ็มจะมีค่าใกล้เคียงกับค่ายอมรับที่ประเทศญี่ปุ่นและประเทศเกาหลีกำหนดไว้ที่ 2.2 พีพีเอ็ม

การศึกษาปฏิกิริยาข้ามกันของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อเตโตรโดท็อกซินในชุดทดสอบกับสารพิษ saxitoxin โดยนำตัวอย่างสารสกัดที่มี saxitoxin มาวิเคราะห์ด้วยชุดทดสอบ พบว่าให้ผลลบทุกตัวอย่าง แสดงว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีในชุดทดสอบไม่มีปฏิกิริยาข้ามกันกับ saxitoxin นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ทดสอบปฏิกิริยาข้ามกันของโมโนโคลนอลแอนติบอดีดังกล่าวกับสารสกัดเนื้อปลาต่าง ๆ ที่วางขายในตลาดจำนวน 31 ชนิด ด้วยวิธี ELISA (ข้อมูลไม่ตีพิมพ์) พบว่าตัวอย่างทั้งหมดให้ผลลบ แสดงว่าเนื้อปลาเหล่านั้นไม่รบกวนความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในชุดทดสอบ และปลาดังกล่าวไม่มีเตโตรโดท็อกซิน ดังนั้นชุดทดสอบ TTX-IC จึงมีความจำเพาะต่อเตโตรโดท็อกซินเท่านั้น

การประเมินประสิทธิภาพของชุดทดสอบในภาคสนามพบว่าชุดทดสอบไม่มีผลลบปลอม ตัวอย่างผลลบทั้ง 12 ตัวอย่าง ที่วิเคราะห์ด้วยชุดทดสอบ TTX-IC เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี LC-MS/MS ให้ผลลบทุกตัวอย่าง แต่ชุดทดสอบให้ผลบวกปลอมในบางตัวอย่าง จากการตรวจยืนยันตัวอย่างบวก 10 ตัวอย่าง พบว่ามีผลบวกปลอม 3 ตัวอย่าง ซึ่งอาจเกิดจากการกระจายของเตโตรโดท็อกซินในเนื้อปลาไม่สม่ำเสมอ เนื่องจากตัวอย่างที่ส่งยืนยันเป็นเนื้อปลาชิ้นเดียวกันแต่คนละส่วนกับเนื้อปลาที่วิเคราะห์ด้วยชุดทดสอบ หรือเกิดจากกระบวนการสกัดสารพิษที่ต่างกันของทั้งสองวิธี ดังนั้นในการวิเคราะห์ตัวอย่างควรนำเนื้อปลาที่แล่แล้วมาบดให้ละเอียดทั้งชิ้น (ปลา 1 ตัวแล่ได้ 2 ชิ้น) โดยทั่วไปมีน้ำหนักไม่เกิน 200 กรัม แล้วจึงแบ่งมาวิเคราะห์เพื่อป้องกันการกระจายของเตโตรโดท็อกซินที่ไม่สม่ำเสมอในเนื้อปลา ตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยชุดทดสอบจะต้องส่งตรวจยืนยันด้วยวิธีมาตรฐาน

ชุดทดสอบมีความไวสูงร้อยละ 100 มีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการตรวจกรอง เนื่องจาก

ไม่มีตัวอย่างที่ให้ผลลบปลอม ตัวอย่างที่ให้ผลลบทั้งหมดไม่ต้องตรวจยืนยันด้วยวิธีมาตรฐานที่มีราคาแพง จึงสามารถลดค่าใช้จ่ายลงได้ การไม่พบผลลบปลอมเมื่อวิเคราะห์ด้วยชุดทดสอบทำให้มีความเชื่อมั่นสูงในการนำไปใช้คุ้มครองผู้บริโภค อย่างไรก็ตามผลการประเมินประสิทธิภาพของชุดทดสอบในภาคสนามยังมีข้อจำกัดเรื่องจำนวนตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์น้อยไป

จากการประเมินชุดทดสอบยังพบเนื้อปลาปักเป้าที่แล่จำหน่ายมีเตโตรโดท็อกซินปนเปื้อนร้อยละ 6.19 โดยมีปริมาณอยู่ระหว่าง 2.85–6.93 พีพีเอ็ม (ไม่แสดงข้อมูล) แสดงว่าถ้าบริโภคเนื้อปลาน้ำหนัก 290–700 กรัม จะทำให้ได้รับเตโตรโดท็อกซินประมาณ 2 มิลลิกรัม ซึ่งอาจเป็นอันตรายถึงชีวิต การพบเตโตรโดท็อกซินในเนื้อปลาปักเป้าแล่อาจเกิดจากการปนเปื้อนของกระบวนการแล่ โดยเฉพาะการพบในปลาปักเป้าชนิด *L. spadiceus* ซึ่งกรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์รายงานว่าไม่พบเตโตรโดท็อกซินในปลาปักเป้าชนิดนี้ทุกส่วน เพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคผู้แล่เนื้อปลาต้องได้รับการอบรมและควรขึ้นทะเบียนเช่นเดียวกับที่ประเทศญี่ปุ่นและเกาหลี

สรุป

จากการศึกษาวิจัยการพัฒนาชุดทดสอบสารพิษเตโตรโดท็อกซินในปลาปักเป้า ได้ชุดทดสอบ TTX-IC ที่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้สะดวก รวดเร็ว เวลาที่ใช้ตั้งแต่การเตรียมตัวอย่างถึงการอ่านผลไม่เกิน 30 นาที มีค่า LOD 2 พีพีเอ็ม ไม่พบปฏิกิริยาข้ามกันกับสารพิษ Saxitoxin ที่พบในปลาปักเป้าน้ำจืด จากการประเมินประสิทธิภาพในภาคสนาม พบว่ามีความไวร้อยละ 100 ความจำเพาะร้อยละ 80 มีผลบวกปลอม แต่ไม่มีผลลบปลอม สามารถนำไปใช้ในการตรวจกรองได้ และควรส่งตัวอย่างที่ให้ผลบวกเมื่อวิเคราะห์ด้วยชุดทดสอบไปตรวจยืนยันด้วยวิธี LC-MS/MS หรือวิธี HPLC

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้สำเร็จได้ด้วยความร่วมมือของบุคคลหลายฝ่าย ผู้วิจัยขอขอบคุณ นายแพทย์พงศ์พันธ์ วงศ์มณี อดีตรองอธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นางพิมพ์ใจ นัยโกวิท ที่ปรึกษากรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นางจุรีภรณ์ บุณยวงศ์-วิโรจน์ รองอธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และนางสาวจารุวรรณ ลิ้มสัจจะสกุล ผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 4 สมุทรสงคราม ที่ช่วยสนับสนุนและผลักดันให้เกิดโครงการ กรมประมงที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างสารสกัดปลาปักเป้า โรงแล่เนื้อปลาที่จังหวัดสมุทรสาครที่สนับสนุนตัวอย่างเนื้อปลา สมาคมประมงที่สนับสนุนตัวอย่างปลาปักเป้า นางดวงจันทร์ สุประเสริฐ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่เอื้อเฟื้อสารสกัดจากปลาชนิดต่าง ๆ นางสาวพรรณทิพย์ ตียพันธ์ ฝ่ายพิษวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างสารสกัด saxitoxin สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาที่ช่วยประสานงาน และกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ให้ทุนสนับสนุนโครงการ

เอกสารอ้างอิง

1. Lipkind GM, Fozzard HA. A structure model of the tetrodotoxin and saxitoxin binding sites of the Na+ channel. Biophys J 1994; 66:1–13.
2. Geoffrey KI, Matthew CK. Neurotoxic marine poisoning. Lancet Neurol 2005; 4:219–28.

3. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 264 (พ.ศ. 2545) เรื่องกำหนดอาหารที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือจำหน่าย ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 119 ตอนพิเศษ 128 ง (ลงวันที่ 25 ธันวาคม 2545).
4. ดวงจันทร์ สุประเสริฐ. การวิเคราะห์หา Tetrodotoxin และอนุพันธุ์ โดยใช้ HPLC/MS. ว. กรมวิทย พ. 2537; 36 : 173-83.
5. Rapid diagostic test . Available from: URL: in. http://www.rapid-diagnostics.org
6. Kawatsu K, Shibata T, Hamano Y. Application of immunoaffinity chromatography for detection of tetrodotoxin from urine samples of poisoned patients. Toxico 1999; 37 : 325-33.
7. Raybould TJ, Bignami GS, Inouye LK, Simpson SB, Byrnes JB, Grothaus PG, et al. A monoclonal antibody-based immunoassay for detecting tetrodotoxin in biological samples. J Clin Lab Anal 1992; 6 : 65-72.
8. Verheijen R, Stouten P, Cazemier G, Haasnoot W. Development of a one step strip for detection of sulfadimidine residues. The Analyst 1998; 123 : 2437-41.
9. Zaman L, Arakawa O, Shimosu A, Onoue Y. Occurrence of paralytic shellfish poison in Bangladesh freshwater puffer fish. Toxicon 1997; 35: 423-31.
10. Kungsuwan A. Toxic puffer fish in Thailand. Thai J Toxicol 1992; 8: 23-30.

Development of Rapid Test for Detection of Tetrodotoxin

Aree Thattiyaphong* **Darinee Poolsopa*** **Nanthawan Mekha***
Jirapa Unahalekhaka** **Laddawan Rojanapuntip*****
Panawan Kluengklangdon*** **and Pathom Sawanpanyalert***

**National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000*
***Regional Medical Sciences Center 4th Samut Songkram, Amphoe Muang, Samut Songkram 75000*
****Bureau of Quality and Safety of Food, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000. Thailand*

ABSTRACT Tetrodotoxin (TTX) is a potent non-protein neurotoxin found in puffer fish. It acts as a blocker of voltage-dependent sodium channel on nerve cell membrane. Symptoms after the consumption of TTX-contaminated puffer fish begin with numbed lips, weakness of muscles, particularly, at hands and legs, respiratory system failure, and finally may result in death. At present, the reference method for the measurement of TTX is HPLC or LC-MS. By these methods, expensive equipments and well-trained personnel are required. In addition, the testing is time-consuming. It can detect only one sample at a time, and has to operate in reference laboratory. Therefore, the aim of this work is to develop a simple and rapid test to overcome those problems and to use as screening test. The rapid test called TTX-IC was developed. It is easy to perform, does not require well-trained personnel, and can get the result within 5 minutes. Many samples can be run at the same time. The test provides the detection limit at 2 ppm. and no cross-reaction with saxitoxin that is mainly found in freshwater puffer fish. Field evaluation using 22 samples of puffer fish flesh showed the sensitivity and specificity of rapid test compared with LC-MS/MS method are 100% and 80%, respectively.

Keywords: Tetrodotoxin, TTX, Puffer fish, Immunochromatographic test, Rapid test.