รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ
"การศึกษาอัตราการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ด้วยความร้อน"

Thermal Inactivation of Foot-and-mouth Disease Virus

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จฬ
สพ 15
012515

โดย ผศ.น.สพ.ดร. ศุภชัย เนื้อนวลสุวรรณ และคณะ

เมษายน 2548

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ
“การศึกษาอัตราการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ด้วยความร้อน”

Thermal Inactivation of Foot-and-mouth Disease Virus

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดย ผศ.น.สพ.ดร. ศุภชัย เนื้อนวลสุวรรณ และคณะ

เมษายน 2548

สัญญาเลขที่ RDG4720024

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

“การศึกษาอัตราการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยความร้อน”

Thermal Inactivation of Foot-and-mouth Disease Virus

โดย

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. ผศ.น.สพ.ดร. ศุภชัย เนื้อนวลสุวรรณ	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. สพ.ญ. สมใจ กมลศิริพิชัยพร	กรมปศุสัตว์
3. น.สพ. ร่มพฤกษ์ อุดล	กรมปศุสัตว์
4. น.สพ. ปณิธาน ทองทา	กรมปศุสัตว์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชุดโครงการ “การพัฒนาระบบรับรองความปลอดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ตลอดขั้นตอนการผลิตผลิตภัณฑ์สุกร”

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ฝ่ายเกษตร (ฝ่าย 2) ที่ให้การสนับสนุนด้านการเงินสำหรับโครงการวิจัยครั้งนี้ รศ.จันทร์จรัส เรี่ยวเดชะ สพ.ญ.ดร. วันทนีย์ กัลล์ประวิทย์ ให้การสนับสนุนและริเริ่มการดำเนินการศึกษาวิจัยโครงการ สพ.ญ.วิไล ลินจงสุบงกช ให้คำแนะนำและคำปรึกษาด้านวิชาการ สัตวแพทย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านจากศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยฯ อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา กรมปศุสัตว์ น.สพ.สุพัฒนศักดิ์ ศุภารัตน์ ช่วยเหลือด้านการวิเคราะห์ตัวอย่าง คุณพอจิต ชูใจ ตลอดรวมถึงทุกๆ ท่านที่อาจจะมิได้กล่าวนามมา ณ โอกาสนี้ คณะผู้วิจัยมีความซาบซึ้งและระลึกถึงความร่วมมือและการสนับสนุนที่ได้รับตลอดโครงการวิจัย หากปราศจากทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลืออย่างดีและอย่างเต็มความสามารถแล้วคงไม่สามารถดำเนินการโครงการวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

เมษายน 2548

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Executive Summary

การมีโรคปากและเท้าเปื่อยระบาดในประเทศไทยเป็นอุปสรรคในการส่งออกเนื้อสุกรและผลิตภัณฑ์สุกรไปยังประเทศที่ปลอดโรคปากและเท้าเปื่อย เช่น ประเทศญี่ปุ่น ในปัจจุบันนี้แม้ว่าประเทศญี่ปุ่นได้ยอมรับผลิตภัณฑ์จากเนื้อสุกรซึ่งผ่านกระบวนการผลิตด้วยวิธีการต้มและอบไอน้ำ โดยมีเงื่อนไขว่า อุณหภูมิใจกลางของเนื้อสุกรแปรรูปต้องสูงกว่า 100°ซ นาน 1 นาที โดยวิธีการต้มหรือการอบด้วยไอน้ำ หรือ อุณหภูมิใจกลางของเนื้อสุกรแปรรูปต้องสูงกว่า 70°ซ นานอย่างน้อย 30 นาที โดยการให้ความร้อนวิธีอื่นๆ เช่น การปิ้ง การทอด การย่าง เป็นต้น ซึ่งเงื่อนไขดังกล่าวก่อให้เกิดข้อจำกัดในเชิงความหลากหลายของผลิตภัณฑ์ และยังทำให้ผลิตภัณฑ์แปรรูปที่ได้ขาดคุณลักษณะที่ดีที่ผู้บริโภคยอมรับได้ อย่างไรก็ตาม การจะขอแก้ไขเงื่อนไขดังกล่าว จำเป็นต้องมีข้อมูลและหลักฐานทางวิทยาศาสตร์เพื่อใช้ในการเจรจาต่อรองทางการค้า

การศึกษาประสิทธิภาพการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยความร้อนจะทำให้ได้ข้อมูลที่สำคัญเพื่อใช้เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์เพื่อเจรจาต่อรองทางการค้ากับประเทศญี่ปุ่น โดยทำการศึกษาอัตราการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์และเสตรนที่มีการระบาดในประเทศไทยและได้คัดเลือกไว้เป็นเสตรนที่ใช้ในการผลิตวัคซีน คือ ซีโรไทป์โอ ประกอบด้วย 2 เสตรน คือ O189/87 และ OPN/65 ซีโรไทป์เอ ประกอบด้วย 3 เสตรน คือ A118/87, A-Sakolnakorn /97 และ A132/87 และ ซีโรไทป์เอเชียวัน 1 เสตรน คือ Petchaburi/85 ณ อุณหภูมิ 50, 60, 70, 80, 90, และ 100°ซ ในสารละลายก่อน จากนั้นเลือกไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่มีความทนทานต่อความร้อนมากที่สุดเพื่อนำไปศึกษาอัตราการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยความร้อนในเนื้อสุกรต่อไป

การวิเคราะห์หาอัตราการทำลายไวรัสที่เป็นมาตรฐานสามารถแสดงได้เป็นค่า D_T หรือ Decimal reduction time ซึ่งคือ เวลาที่ใช้ในการทำลายจำนวนไวรัสลง 10 เท่า ณ อุณหภูมิหนึ่งๆ โดยปกติแล้ว ค่า D_T จะลดลง เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น แสดงว่า อุณหภูมิสูงกว่าก็จะมีประสิทธิภาพการทำลายไวรัสมากกว่า และอีกความหมายหนึ่งของค่า D_T คือ ณ อุณหภูมิที่เท่ากัน ไวรัสเสตรนที่มีค่า D_T สูงกว่าก็จะทนต่อความร้อนมากกว่าไวรัสเสตรนที่มีค่า D_T ต่ำกว่า

ผลการศึกษาได้เส้นโค้งการทำลายไวรัส (inactivation curve) 3 แบบ ด้วยกัน คือ แบบเส้นตรง (linear) แบบหัวไหล่ (shoulder) และ แบบท้ายลาด (tailing) อัตราการทำลายไวรัสสำหรับกรณีที่มีรูปแบบการทำลายไวรัสแบบเส้นตรงจะอาศัยสมการเชิงเส้นแบบถดถอย (linear regression) ในการคำนวณค่า D_T โดยใช้ค่า root mean square error (RMSE) บอกระดับความเหมาะสมของค่า D_T ที่คำนวณได้จากสมการเส้นตรงนั้น

ถ้าหากรูปแบบการทำลายไวรัสเป็นแบบหัวไหล่ จะเปรียบเทียบค่า D_T กับค่า lag time (t_L) ถ้ามีค่าไม่แตกต่างกัน ก็ถือว่าไม่มี shoulder effect หรือสามารถใช้ค่า D_T ที่คำนวณจากเส้นโค้งการ

ทำลายไวรัสทั้งหมดได้ทันที แต่ถ้า t_L มากกว่า D_T แล้ว ให้คำนวณค่า D_T ใหม่เฉพาะส่วนที่ไม่มี shoulder effect ส่วนรูปแบบการทำลายไวรัสแบบท้ายลาด จะแยกคำนวณค่า D_T เป็น 2 ระยะ แล้วให้น้ำหนักของค่า D_T ตามสัดส่วนของปริมาณการทำลายไวรัสทั้ง 2 ระยะ

ค่า D_T ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้ง 6 เสตรน เมื่อวิเคราะห์แยกแต่ละอุณหภูมิพบว่าโดยมากแล้ว D_T ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) และผลการทดลองพบว่าพิสัยของ D_{50}, D_{60}, D_{70}, D_{80}, D_{90}, and D_{100} ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย 6 เสตรน คือ 732-2414, 16.37-42.00, 6.06-10.87, 2.84-5.99, 1.65-3.18, และ 1.90-2.94 นาที ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบค่า D_T ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทุกเสตรนของแต่ละซีโรไทป์ที่ทำการศึกษากับไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเสตรนอื่นๆ ที่แยกได้จากแหล่งต่างๆ ในประเทศอื่นๆ พบว่า ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่แยกได้จากการระบาดในประเทศไทยที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีความทนต่อความร้อนน้อยกว่าไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเสตรนอื่นๆ ที่แยกได้จากประเทศต่างๆ มาก

ค่า Z ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทุกเสตรนที่ทำการศึกษาไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ดังนั้น สามารถใช้ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์หรือเสตรนใดก็ได้ในการศึกษาอัตราการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยความร้อนในเนื้อสุกร และจากผลการทดลองพบว่า พิสัยของค่า Z ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์โอ และซีโรไทป์เอ คือ 21.78-23.26 และ 19.11-22.79°ซ ตามลำดับ และ ค่า Z ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์เอเชียวัน คือ 18.50°ซ

โดยสรุปผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทุกเสตรนที่ทำการศึกษาในครั้งนี้มีความทนต่อการถูกทำลายด้วยความร้อนที่ไม่แตกต่างกัน แต่มีความทนต่อการถูกทำลายด้วยความร้อนน้อยกว่าไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเสตรนที่มีการระบาดในต่างประเทศ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย การศึกษาอัตราการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยความร้อน

ชื่อผู้วิจัย ผศ.น.สพ.ดร. ศุภชัย เนื้อนวลสุวรรณ
สพ.ญ. สมใจ กมลศิริพิชัยพร
น.สพ. ร่มพฤกษ์ อุดล
น.สพ. ปณิธาน ทองทา

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ เมษายน 2548

บทคัดย่อ

ศึกษาการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์โอ เอและเอเชียวัน ณ อุณหภูมิ 50, 60, 70, 80, 90, และ 100°ซ ในสารละลาย PBS ได้เส้นโค้งการทำลายไวรัส (inactivation curve) 3 แบบ คือ แบบเส้นตรง (linear) แบบหัวไหล่ (shoulder) และแบบท้ายลาด (tailing) คำนวณหาประสิทธิภาพการทำลายไวรัสจากเส้นโค้งการทำลายไวรัสแบบเส้นตรงด้วยสมการเชิงเส้นแบบถดถอย (linear regression) เป็นค่า D สำหรับรูปแบบการทำลายไวรัสแบบหัวไหล่ถ้าไม่พบความแตกต่างของค่า D กับค่า lag time (t_L) ถือว่าไม่มี shoulder effect ส่วนรูปแบบการทำลายไวรัสแบบท้ายลาดจะคำนวณค่า D ตามสัดส่วนการทำลายไวรัสทั้ง 2 ระยะมารวมกัน พิสัยของ D_{50}, D_{60}, D_{70}, D_{80}, D_{90}, and D_{100} ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย 6 เสตรน คือ 732-2414, 16.37-42.00, 6.06-10.87, 2.84-5.99, 1.65-3.18, และ 1.90-2.94 วินาที ตามลำดับ พิสัยของค่า Z ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์โอ และซีโรไทป์เอ คือ 21.78-23.26 และ 19.11-22.79°ซ ตามลำดับ และ ค่า Z ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์เอเชียวัน คือ 18.50°ซ ค่า Z ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทุกเสตรนที่ทำการศึกษาไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าความทนต่อความร้อนของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทุกเสตรนที่ทำการศึกษาครั้งนี้ไม่แตกต่างกันแต่มีความทนต่อความร้อนน้อยกว่าไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเสตรนที่มีการระบาดในต่างประเทศ

คำสำคัญ : ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย การทำลายไวรัสด้วยความร้อน ค่า D ค่า Z

Project Title Thermal Inactivation of Foot-and-mouth Disease Virus

Name of Investigators Assistant Professor Dr. Suphachai Nuanualsuwan
Dr. Somjai Kamolsiripichaiporn
Dr Romphruke Udon
Dr. Panithan Thongtha

Year April 2005

Abstract

The thermal inactivation of foot-and-mouth disease virus serotypes O, A, and Asia1 were determined at 50, 60, 70, 80, 90, and 100^{o}C in phosphate buffer saline. The observed inactivation curves are linear, linear curve with shoulder, and linear curve with a tailing (biphasic curves). For linear curves, D-values were analyzed by linear regression. The difference of lag time of curves with shoulder (t_L) and D-value of the overall curves were employed to determine whether the shoulder effect existed. For curves with tailing, D-values were proportionate to the virus reduction of two combined inactivation phases. Ranges of D_{50}, D_{60}, D_{70}, D_{80}, D_{90}, and D_{100} of 6 FMDV strains were 732-2414, 16.37-42.00, 6.06-10.87, 2.84-5.99, 1.65-3.18, and 1.90-2.94 seconds, respectively. Ranges of Z-values of FMDV serotypes O and A were 21.78-23.26 and 19.11-22.79^{o}C, respectively and Z-value of FMDV serotype Asia1 was 18.50^{o}C. The Z-values of FMDV strains studied were not statistically significant ($p>0.05$). The result of this study demonstrated that heat resistance of FMDV strains studied was not different but it was much less than foreign epidemic FMDV strains.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Keywords : Foot-and-mouth disease virus, Thermal inactivation, D-value, Z-value

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	3
บทสรุปผู้บริหาร	4
บทคัดย่อภาษาไทย	6
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ (abstracts)	7
สารบัญ	8
บทนำ	9
วิธีการวิจัย	11
ผลการวิจัย	20
การอภิปรายผล	33
ข้อสรุป	37
เอกสารอ้างอิง	39
ภาคผนวก 1 การศึกษาการใช้แสงอัลตร้าไวโอเลตเพื่อทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย	41
ภาคผนวก 2 การแยกไวรัส (Virus isolation procedure)	42
ภาคผนวก 3 การทำ Tissue culture เพื่อการแยกไวรัส (Tissue culture for virus isolation)	46
ภาคผนวก 4 การแยกซีโรไทป์ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (ELISA typing)	52

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

อุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ในประเทศไทยที่มีความก้าวหน้าในระดับนานาประเทศ เช่น อุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่เนื้อ และการเลี้ยงกุ้ง ทั้งนี้มีผลมาจากปัจจัยหลักที่สำคัญอันหนึ่ง คือ ความสามารถและศักยภาพในการปรับปรุงและพัฒนาผลิตภัณฑ์ให้สามารถส่งออกสู่ตลาดโลก เช่น ประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรป หรือ ประเทศญี่ปุ่น อย่างไรก็ตาม อุปสรรคสำคัญที่ทำให้อุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรซึ่งมีศักยภาพทัดเทียมกับกลุ่มอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์อื่นในการส่งออก คือ ปัญหาโรคปากและเท้าเปื่อย ทำให้ไม่สามารถส่งออกสุกรมีชีวิต หรือ ผลิตภัณฑ์สุกรแปรรูปบางชนิดได้ ในขณะนี้แม้จะมีการส่งออกเนื้อสุกรแปรรูปชนิดต้มหรืออบไอน้ำแล้วก็ตาม แต่ตลาดของผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรแปรรูปชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศญี่ปุ่นนั้นยังมีโอกาสอยู่มาก

ผลิตภัณฑ์แปรรูปเนื้อสุกรที่ภาคเอกชนมีความสนใจ คือ เนื้อสุกรชุบแป้งทอด(Tongkatsu) ปัจจุบันประเทศญี่ปุ่นได้ยอมรับผลิตภัณฑ์จากเนื้อสุกรซึ่งผ่านกระบวนการผลิตด้วยวิธีการต้มและอบไอน้ำ โดยมีเงื่อนไขว่า อุณหภูมิใจกลางของเนื้อสุกรแปรรูปต้องสูงกว่า 100 องศาเซลเซียส(^{o}ซ) นาน 1 นาที โดยวิธีการต้มหรือการอบด้วยไอน้ำ หรือ อุณหภูมิใจกลางของเนื้อสุกรแปรรูปต้องสูงกว่า 70 ^{o}ซ นานอย่างน้อย 30 นาที โดยการให้ความร้อนวิธีอื่นๆ ซึ่งเงื่อนไขดังกล่าว ก่อให้เกิดข้อจำกัดในเชิงความหลากหลายของผลิตภัณฑ์ เช่น การปิ้ง การทอด การย่าง และยังทำให้ผลิตภัณฑ์แปรรูปที่ได้ขาดคุณลักษณะที่ดีที่ผู้บริโภคยอมรับได้ ดังนั้น หากประเทศไทยต้องการต่อรองเงื่อนไขที่กำหนดโดยประเทศญี่ปุ่นนั้น ในฐานะผู้ผลิตอาหารประเทศไทยจำเป็นต้องมีข้อมูลที่ครบถ้วนและถูกต้องตามหลักการทางวิทยาศาสตร์เพื่อใช้ในการเจรจาลดความเข้มงวดของเงื่อนไขดังกล่าวลง

ในอดีตที่ผ่านมานั้น (ตารางที่ 1) ข้อมูลเกี่ยวกับอัตราการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยโดยใช้ความร้อน ณ อุณหภูมิ (temperature) และช่วงเวลา (time) ต่างๆ นั้นมีอยู่อย่างจำกัด ไม่ครบถ้วน ไม่สอดคล้องกัน และไม่สามารถนำมาใช้เปรียบเทียบกันได้ ข้อมูลที่ได้ส่วนใหญ่ไม่ได้อยู่ในช่วงอุณหภูมิเป้าหมาย ไวรัสเสตรน (strain)ที่ใช้ในการศึกษาเหล่านี้ก็มิใช่ไวรัสเสตรนที่ระบาดหรือแยกได้ในประเทศไทย ดังนั้น ข้อมูลที่มีอยู่จึงไม่ใช่ตัวแทนที่ดีในการนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับประเทศไทย ซึ่งในโครงการนี้ได้นำเสนอการศึกษาความสัมพันธ์ของการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย เสตรนที่ระบาดในประเทศไทย ณ อุณหภูมิและเวลาต่างๆ อย่างครบถ้วนเป็นระบบตามหลักการทางวิทยาศาสตร์ ซึ่งผลที่ได้จะทำให้ทราบถึงอัตราการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยครอบคลุมช่วงอุณหภูมิเป้าหมายในการผลิตผลิตภัณฑ์สุกร

ตารางที่ 1 เวลาที่ใช้ในการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยความร้อน

ซีโรไทป์ (Serotypes)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	สื่อและสภาวะ	เอกสารอ้างอิง
O	49	28.8	PBS, pH 8.0	(4)
	54	22.55[a]	PBS, pH 7.6	(9)
	60	0.645	น้ำนม	(1)
	63	0.323	น้ำนม	(1)
	80	10	บนสไลด์แก้วแห้ง	(3)
	86	2.42	ผงเลือดแห้ง	(5)
A	49	612	PBS, pH 8.0	(4)
	54	18.20[b]	PBS, pH 7.6	(9)
	80	12	บนสไลด์แก้วแห้ง	(3)
Asia 1	49	567	PBS, pH 8.0	(4)
	54	25.34[c]	PBS, pH 7.6	(9)
	80	15	บนสไลด์แก้วแห้ง	(3)
C	49	72	PBS, pH 8.0	(4)
	54	32.02[d]	PBS, pH 7.6	(9)
	80	15	บนสไลด์แก้วแห้ง	(3)
SAT I	49	4.5	PBS, pH 8.0	(4)
	54	15.50[e]	PBS, pH 7.6	(9)
SAT II	49	8.8	PBS, pH 8.0	(4)
	54	15.50[f]	PBS, pH 7.6	(9)
SAT III	49	8.8	PBS, pH 8.0	(4)
	54	13.48[g]	PBS, pH 7.6	(9)

[a] ค่าเฉลี่ยจาก 10 strains [b] ค่าเฉลี่ยจาก 16 strains [c] ค่าเฉลี่ยจาก 4 strains [d] ค่าเฉลี่ยจาก 5 strains [e] ค่าเฉลี่ยจาก 5 strains
[f] ค่าเฉลี่ยจาก 10 strains [g] ค่าเฉลี่ยจาก 3 strains

โครงการที่เสนอนี้เป็นโครงการย่อยของ “การพัฒนาระบบรับรองความปลอดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยตลอดขั้นตอนการผลิตผลิตภัณฑ์สุกร”

วิธีการวิจัย

1. ไวรัสและเซลเพาะเลี้ยง (Virus and cell culture)

ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (Foot-and-mouth-disease viruses หรือ FMDV) จำนวน 3 ซีโรไทป์ (serotypes) ทำการทดลองที่ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้งหมดได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย กรมปศุสัตว์ ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

1.1 ซีโรไทป์โอ 2 เสตรน คือ O/Udonthani/87(O189/87) และ O/Nakhonpathom/65 (OPN)

1.2 ซีโรไทป์เอ 3 เสตรน คือ A118/87, A132/89 และ A-Sakolnakorn/97

1.3 ซีโรไทป์เอเชียวัน 1 เสตรน คือ Asia1/Petchaburi/85

เซลเพาะเลี้ยงที่ใช้ คือ Baby hamster kidney 21 (BHK-21) โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซล (Growth medium : GM) ซึ่งประกอบด้วย

Eagle's Modified Eagle Medium Solution (Nissui® No.1) 9.4 กรัม/ลิตร	90	มล.
Normal Bovine Serum	10	มล.
ยาปฏิชีวนะ (Kanamycin 10 กรัม, Penicillin 1.173 กรัม, Streptomycin 10 กรัม)	1	มล.
Fungizone (Amphotericin 50 มิลลิกรัม)	0.5	มล.
7% bicarbonate Solution	1	มล.

นำไปเพาะเลี้ยงในตู้อบที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37°ซ เมื่อเซลเจริญเติบโตเต็มที่แล้วเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลเป็นชนิดที่มีปริมาณ serum ลดลง หรือ Maintenance medium (MM) ซึ่งประกอบด้วย

Eagle's Modified Eagle Medium Solution (Nissui® No.1) 9.4 กรัม/ลิตร	98	มล.
Normal Bovine Serum	2	มล.
ยาปฏิชีวนะ (Kanamycin 10 กรัม, Penicillin 1.173 กรัม, Streptomycin 10 กรัม)	1	มล.
Fungizone (Amphotericin 50 มิลลิกรัม)	0.5	มล.
7% bicarbonate Solution	1	มล.

นำไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยมาเพิ่มจำนวน (propagate) โดยเพาะไวรัสในเซลเพาะเลี้ยงประมาณ 18-24 ชั่วโมงหรือจนกว่าไวรัสจะทำลายเซลเพาะเลี้ยง (cytopathic effect หรือ CPE) จนหมดก่อนจึงเก็บ (harvest) ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย หลังจากนั้นนำสารละลายไวรัสที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง (centrifugation) เพื่อแยกโปรตีนขนาดใหญ่ออกจากสารละลายไวรัส แบ่งปริมาตรย่อย (aliquot) ก่อนทำการเก็บที่ -80°C

ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเป็นไวรัสที่มีความสามารถในการระบาดสูงมาก ดังนั้น ในการศึกษาจำเป็นต้องระมัดระวังเรื่องความสะอาดและความปลอดภัยเพื่อป้องกันมิให้มีการระบาดของไวรัสชนิดนี้ไปสู่ท้องที่ได้ สารละลายไวรัสและอุปกรณ์ที่ (มีโอกาส) ปนเปื้อนด้วยไวรัสใน

การศึกษาทั้งหมดจะต้องผ่านการทำลายเชื้อด้วยสารเคมี เช่น Glutaraldehyde ร้อยละ 10, Iodophore ร้อยละ 3 หรือ นำมานึ่งทำลายเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันสูง (Autoclave)

2. การทำลายไวรัสด้วยความร้อน (Thermal inactivation)

เตรียมหลอดแก้วที่ปราศจากเชื้อ (Sterile) ให้มีจำนวนเพียงพอกับจำนวนซีโรไทป์และจำนวนเวลาที่ต้องการทำการทดลองและหลอดอ่านอุณหภูมิ จากนั้นเจือจางสารละลายไวรัส (Virus suspension) ลงในหลอดแก้วที่เตรียมไว้ 10 เท่า (1 Log) ด้วยสารละลายเกลือ (Phosphate buffered saline : PBS[1]) ความเข้มข้น 0.01 Molar ที่ pH 7.4-7.6 โดยสัดส่วนที่ใช้คือ สารละลายไวรัส 200 µl ต่อ 0.01M PBS 1800µl ส่วนหลอดควบคุม (Control) ใส่ 0.04M PBS 2000µl ปิดจุกยางที่หลอดแก้วทุกหลอดให้สนิทยกเว้นหลอดอ่านอุณหภูมิ ระบุรายละเอียดของซีโรไทป์ ช่วงเวลาและอุณหภูมิที่ข้างหลอดแก้วให้ชัดเจน ทำการปรับอุณหภูมิของอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath; Julabo® TWB22) ให้อยู่ในระดับที่ต้องการ จุ่มหัววัดอุณหภูมิ (Probe) ของเครื่องวัดอุณหภูมิ (Thermocouple; Hanna® HI98701) ลงในหลอดควบคุมแล้วทำการบันทึกอุณหภูมิขณะนั้นเป็นช่วงเวลา 0 วินาที จากนั้นจึงทำการจุ่มหลอดแก้วทั้งหมดที่เตรียมไว้รวมทั้งหลอดอ่านอุณหภูมิลงในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิพร้อมกัน ทำการบันทึกอุณหภูมิจากเครื่องวัดอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นทุกๆ 10 วินาที ในขณะเดียวกันเครื่องวัดอุณหภูมิจะบันทึกการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิทุกๆ 60 วินาที เมื่อถึงช่วงเวลาที่กำหนดให้นำหลอดแก้วออกจากอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแล้วนำไปแช่น้ำแข็งให้อุณหภูมิลดลงอย่างรวดเร็วเพื่อเป็นการหยุดการทำลายไวรัสด้วยความร้อน จากนั้นจึงนำสารละลายไวรัสที่ผ่านการทำลายด้วยความร้อนแล้วไปวัดระดับความเข้มข้นของเชื้อที่เหลืออยู่ (Virus titration) ต่อไป(10-12)

3. การหาจำนวนไวรัส (Virus titration)

เตรียมสารละลาย MM ลงในหลอดพลาสติกที่ปราศจากเชื้อ (Sterile) หลอดละ 900 µl เพื่อใช้ในการเจือจาง (dilute)ไวรัสให้เป็น Serial 10-fold dilutions เมื่อสารละลาย FMDV เย็นลงแล้ว เติมสารละลายไวรัสลงในหลอดพลาสติคที่เตรียมไว้ 100 µl ผสมให้เข้ากันดี ซึ่งจะทำให้ได้ไวรัสที่เจือจางลงไป 10 เท่า (10^{-1}) เปลี่ยน Pipette tip ใหม่ แล้วดูดส่วนผสมของไวรัสในหลอดแรก 100 µl เติมลงในหลอดที่ 2 ผสมให้เข้ากันซึ่งจะทำให้ได้ไวรัสที่เจือจางลงไป 100 เท่า (10^{-2}) เปลี่ยน Pipette tip ใหม่ แล้วจึงทำซ้ำในลักษณะเดียวกันนี้จนกระทั่งได้ไวรัสที่เจือจางลงไป 1,000,000 เท่า (10^{-6}) ของสารละลายไวรัสเริ่มต้น

---

[1] NaCl 80 กรัม KCl 2 กรัม $NaHPO_4$ 11.5 กรัม (หรือ $NaHPO_4$ $2H_2O$ 14 กรัม หรือ $NaHPO_4$ $12H_2O$ 28.9 กรัม) KH_2PO_4 2 กรัม ผสมน้ำกลั่น 1 ลิตร

ทำการย่อยเซลเพาะเลี้ยง(BHK-21) ออกจากขวดเพาะเลี้ยงเซลโดยใช้ Trypsin-Versene (EDTA) แล้วนำเซลที่ย่อยได้มาเติมลงใน GM ที่เตรียมไว้โดยให้มีความเข้มข้นของเซลประมาณ 2.5×10^5 เซล/มล จากนั้นจึงทำการหยอดเซลลงใน Sterile 96-well plate (Costar® หรือ Cellstar® Micro-plate) ชนิดก้นแบนทุกหลุมๆ ละ 100 µl ทำการระบุรายละเอียดของซีโรไทป์ ระยะเวลา อุณหภูมิ และ ลำดับการเจือจางของสารละลายไวรัสตามแถวบนฝาของ 96-well plate ให้ชัดเจน การวัดระดับความเข้มข้นของไวรัสต่อ 1 ชุด (เวลา) ใช้เซลทั้งหมด 4 แถว จากนั้นจึงทำการหยอดสารละลายไวรัสที่เจือจางแล้วลงในแต่ละหลุมๆ ละ 50 µl ตามคอลัมน์ที่กำหนดไว้ คอลัมน์ที่เป็นเซลควบคุม (negative control) หยอดเฉพาะ MM เมื่อหยอดสารละลายไวรัสครบแล้วให้นำไปเพาะเลี้ยงในตู้อบที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37°ซ นาน 48 ชั่วโมง แล้วจึงทำการอ่าน และบันทึกผลโดยสังเกตจากการที่ไวรัสทำให้เซลเพาะเลี้ยงเกิดภาวะ Cytopathic effect (CPE) เท่ากับ 50% ของหน่วยเซลเพาะเลี้ยงทั้งหมด ซึ่งวิธีการคำนวณค่าระดับความเข้มข้นของไวรัสจะใช้วิธีการของ Reed and Muench (1938) ค่าความเข้มข้นของไวรัสที่ได้มีหน่วยเป็น Tissue culture infective dose 50% ($TCID_{50}$/ml) (13)

4. การแยกไวรัส (Virus isolation)

ถึงแม้ว่าตัวอย่างสุดท้ายที่ให้ผลลบ (negative) คือ ไม่พบ CPE ในเซลเพาะเลี้ยง ยังมีความจำเป็นที่ต้องยืนยันว่า สารละลาย FMDV ไม่มีไวรัสเหลืออยู่จริง โดยการนำสารละลาย FMDV เวลาแรกสุด 2 ชุดการเจือจาง (dilutions) ที่ให้ผลลบหรือไม่เกิด CPE ไปทดลองเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลปฐมภูมิจากเนื้อไตแกะ (primary lamb kidney cell) จำนวน 3 ครั้ง(passages)

ระบุหมายเลขตัวอย่างที่ต้องการแยกไวรัสให้ตรงกับขวดเซลเพาะเลี้ยง ใช้เซลเพาะเลี้ยงที่ไม่ใส่ตัวอย่างเป็นขวดควบคุม(negative control) เท GM ออกจากขวดเพาะเลี้ยงเซล ใส่สารละลายตัวอย่างที่ต้องการตรวจหาไวรัสประมาณ 1 มล./ขวด นำไปบ่มที่ 37°ซ นาน 60 นาทีเพื่อให้ไวรัสที่มีอยู่เกาะติดกับเซล (adsorb) ใส่ Eagle medium พอประมาณให้คลุมเซลทั้งหมด บ่มที่ 37°ซ นาน 2 วัน และสังเกตการทำลายเซล (CPE) ถ้าได้ผลบวกหรือ เกิด CPE จะนำเชื้อที่แยกได้ไปทำการระบุซีโรไทป์ของ FMDV ว่าเป็นซิโรไทป์เดียวกับที่ทำการทดลองหรือไม่

5. การระบุแยกซีโรไทป์ (ELISA typing)

ระบุซีโรไทป์ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย โดยการฉาบซีรั่มกระต่ายที่มีภูมิคุ้มกันต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (rabbit anti-FMD viruses) ซีโรไทป์ O, A, Asia 1 และซีรั่มกระต่ายปกติ (normal rabbit serum) บน ELISA plate โดยใช้สารละลายในการฉาบ (coating buffer) ซึ่งประกอบด้วย คาร์บอเนตและไบคาร์บอเนต pH 9.6) อบที่ 37°ซ นาน 60 นาที หรือเก็บค้างคืน (Over-night)ที่ 4 °ซ ในกล่องที่มีความชื้นเหมาะสม ล้าง plate 5 ครั้งด้วย PBS จากนั้นเจือจาง

ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยและตัวอย่างเป็นลำดับชุดแบบเท่าตัว (2-fold dilution) โดยใช้สารละลายอีไลซ่า(ELISA diluent) เติมไวรัสและตัวอย่างที่เจือจางแล้วลงใน coated plate แล้วอบ plate ไว้ที่ 37°ซ นาน 60 นาที ล้าง plate ด้วย PBS 5 ครั้ง ใส่ซีรั่มหนูตะเภาที่มี (homologous guinea pig anti-FMD serum) และซีรั่มหนูตะเภาปกติที่ไม่มีภูมิคุ้มกันต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (normal guinea pig serum) ซึ่งผสมซีรั่มโคเพื่อป้องกันการจับกับไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยอย่างไม่จำเพาะ(non-specific binding) โดยใช้สารละลายอีไลซ่า(ELISA diluent) ซึ่งมีโปรตีนไข่ขาวจากโค (3% Bovine Serum Albumin) เป็น blocked diluent อบ plate ที่ 37°ซ นาน 30 นาที ล้าง plate ด้วย PBS 5 ครั้ง เติม peroxidase conjugated rabbit anti-guinea pig immunoglobulin อบ plate ที่ 37°ซ นาน 30 นาที ล้าง plate ด้วย PBS 5 ครั้ง เติมสารละลาย substrate ที่มี TMB (3,3' 5,5' Tetramethly benzidine) และ H_2O_2 นาน 20 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 N. H_2SO_4 อ่านความเข้มข้นของสีที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

6. การคำนวณอัตราการทำลายไวรัส

วัตถุประสงค์ของการคำนวณหาอัตราการทำลายไวรัส ก็คือ การเปรียบเทียบความทนต่อความร้อนของไวรัสซีโรไทป์ต่างๆ จึงจำเป็นต้องมีการกำหนดค่ามาตรฐานที่ใช้วัดคุณสมบัติดังกล่าว

อัตราการทำลายไวรัสในแต่ละอุณหภูมิสามารถวิเคราะห์ได้จากการทำลายไวรัสจำนวนหนึ่งในช่วงเวลาต่างๆกัน ข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างเวลาทำลายไวรัสและจำนวนไวรัสที่เหลืออยู่จากการทำลายที่อุณหภูมิต่างๆ จะนำมาสร้างเส้นโค้งการทำลายไวรัส (inactivation curve) ได้จากความสัมพันธ์ระหว่างเลขยกกำลังของจำนวนอนุภาคไวรัสที่เหลือ(ตัวแปรตาม; Y) กับช่วงเวลาในการทำลายไวรัส (ตัวแปรอิสระ; X) ของกระบวนการความร้อนที่ไวรัสได้รับ ในลักษณะ semi-logarithmic scale เรียกความสัมพันธ์นี้ว่า เส้นโค้งการทำลายไวรัส (inactivation curve) ค่าความชัน (slope) ของเส้นโค้งนี้ คือ อัตราการทำลายไวรัส ณ อุณหภูมิหนึ่ง ซึ่งสามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในเชิงสมการเส้นตรงแบบถดถอยได้ (linear regression analysis) ดังสมการ (1) อนึ่งค่าลบของส่วนกลับของความชันของเส้นโค้งนี้ ก็คือ ค่า D_T นั่นเอง

$$Y = aX + b$$

Y = ปริมาณไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (log $TCID_{50}$)

a = ความชันของสมการเส้นตรงหรือเส้นโครงการทำลายไวรัส

X = เวลาที่ใช้ในการทำลายไวรัส (วินาที)

b = จุดตัดแกนตั้ง

ค่าความชันที่คำนวณได้จากสมการเส้นตรง จะทำการทดสอบสมมุติฐานว่าค่าความชันนี้มีความแตกต่างจากค่าความชันเท่ากับศูนย์หรือไม่ ($H_0 = \beta_1 = 0$) ที่ระดับนัยสำคัญร้อยละ 5

ค่า D_T หรือ Decimal reduction time (DRT หรือ D value) คือ ช่วงเวลาที่ใช้ในการลดจำนวนไวรัสลงเหลือร้อยละ 90 ณ อุณหภูมิหนึ่ง ภายใต้สภาวะการทดลองนั้น โดยค่า D_T นี้จะเป็นคุณสมบัติประจำอุณหภูมิของเชื้อที่ทำการศึกษา ค่า D_T ที่ได้จะใช้เป็นข้อมูลในการกำหนดเวลาที่ใช้ในการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้งหมดในเนื้อสุกร

การประเมินว่า สมการเส้นตรงที่ได้สามารถทาบกับข้อมูลดิบที่ได้มากน้อยนั้น(goodness of fit) สามารถแสดงได้ในรูปค่า root mean square error (RMSE) ยิ่งค่า RMSE น้อยลงเท่าไร สมการเส้นตรงที่ได้ก็จะมีความเหมาะสมกับข้อมูลดิบมากขึ้นเท่านั้น (6, 18)

$$\text{Root mean square error} = [\ \Sigma (Y_i - \hat{Y}_i)^2\ ]^{1/2} = MSE^{1/2}$$

นอกจากค่า RMSE แล้ว ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (correlation coefficient หรือ r^2) ก็เป็นค่าที่บอกระดับความเหมาะสมของสมการเส้นตรงกับข้อมูลดิบได้ในระดับหนึ่ง ในขณะเดียวกัน ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ยังเป็นค่าที่ใช้วัดระดับความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระและตัวแปรด้วย(7, 15)

$$r^2 = [SSY - SSE] / SSY$$

โดยที่ $SSY = \Sigma (Y_i - Y^{bar}_i)^2$

$SSE = \Sigma (Y_i - \hat{Y}_i)^2$

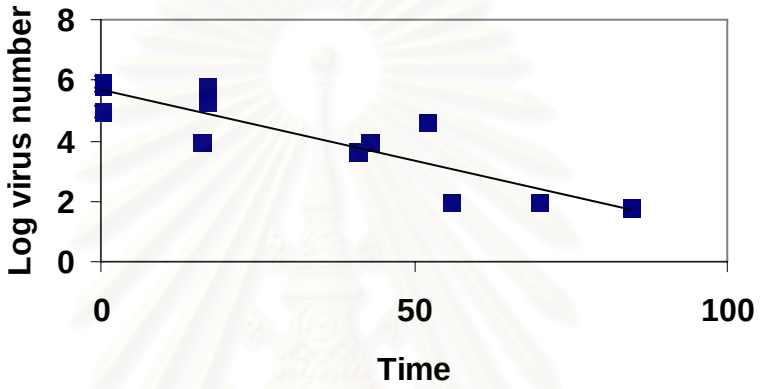
การศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นการทดลองจริงโดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ถึงแม้ว่าจะมีการกำหนดระยะเวลาการทำลายไวรัส (ตัวแปร X) ให้เหมือนกันทั้ง 3 การทดลองก็ตาม แต่เนื่องจากอัตราการเพิ่มอุณหภูมิของ water bath ในแต่ละการทดลองไม่เท่ากัน [โปรดศึกษาเพิ่มเติม เรื่อง การหาระยะเวลาแท้จริงในการทำลายไวรัส ในหัวข้อถัดไป] ดังนั้น จึงทำให้ระยะเวลาทำลายไวรัสของแต่ละการทดลองที่ได้มีความแตกต่างกัน ส่งผลให้ไม่สามารถทำการหาค่าเฉลี่ยของจำนวนไวรัสในแต่ละจุดเวลาการทำลายไวรัสได้ ดังนั้น ในการวิเคราะห์ข้อมูลจึงได้นำผลการทดลองทั้ง 3 ครั้งมาหาอัตราการทำลายไวรัสรวม

7. การหาระยะเวลาที่แท้จริงในการทำลายไวรัส

การคำนวณหาระยะเวลาที่ทำลายไวรัสจริง อาศัยหลักการคำนวณพื้นที่ใต้เส้นโค้งของความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิจริงในสารละลายและเวลาที่ทำการทดลอง แล้วหารด้วยอุณหภูมิเป้าหมายเพื่อให้ได้เป็นระยะเวลาการทำลายไวรัสจริง

8. รูปแบบหรือลักษณะเส้นโค้งการทำลายไวรัส มีปัจจัยหลายอย่างที่มีบทบาทต่อรูปแบบการทำลายไวรัส รูปแบบการทำลายไวรัสที่แตกต่างกันเป็นปัจจัยหลักที่กำหนดวิธีการวิเคราะห์หาอัตราการทำลายไวรัส โดยส่วนมากแล้วรูปแบบการทำลายจุลินทรีย์ (ด้วยความร้อน) มี 3 รูปแบบ (18) ดังนี้

8.1 รูปแบบเส้นตรง (linear) การวิเคราะห์หาค่า D_T (ภาพที่ 1) จะเป็นไปตามหลักการที่กล่าวไว้แล้วในหัวข้อ “การคำนวณอัตราการทำลายไวรัส”



ภาพที่ 1 เส้นโค้งการทำลายเชื้อแบบเส้นตรง (linear) โดยแกนนอนเป็นระยะเวลา (time) แกนตั้งเป็นความเข้มข้นไวรัส (log)

$$\log (N_t/N_o) = - t / D$$

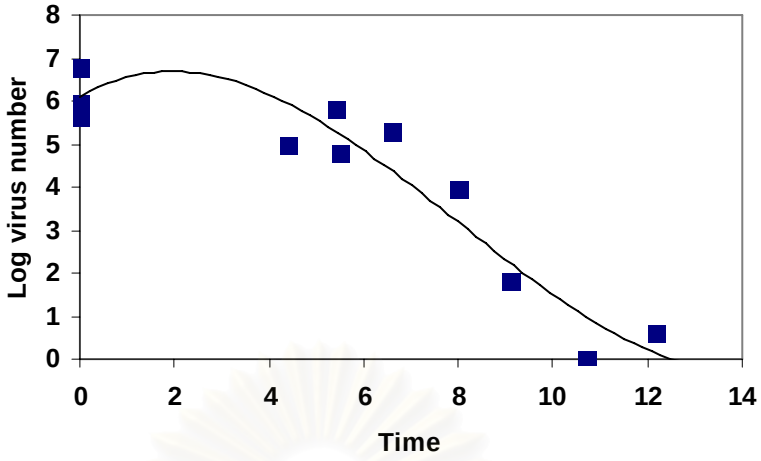
โดยที่ $\log N_t$ = จำนวนเชื้อ ณ เวลา t (Y)

$\log N_o$ = จำนวนเชื้อเริ่มต้น (b)

t = ระยะเวลาในการทำลายเชื้อ (X)

D = Decimal reduction time (-1/a)

8.2 รูปแบบหัวไหล่ (shoulder) รูปแบบการทำลายไวรัสในลักษณะนี้ มักเกิดจากเชื้อมีการรวมกันเป็นกลุ่มก้อน (clump) หรือ มีจุดในการทำลายไวรัสหลายจุด (multiple target sites) ทำให้การทำลายเชื้อเกิดขึ้นอย่างช้าๆ เป็นช่วงสั้นๆในระยะแรก จากนั้นจะมีการทำลายเชื้อในอัตราที่เร็วขึ้น (18) (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 เส้นโค้งการทำลายเชื้อแบบหัวไหล่ (shoulder) โดยแกนนอนเป็นระยะเวลา (time) แกนตั้งเป็นความเข้มข้นไวรัส (log)

$$\log (N_t/N_o) = 1 + -(t-t_L) / D$$

$$t_L = t - D\,[\log(N_t/N_o) - 1]$$

โดยที่ t_L คือ ระยะเวลาแรกที่ใช้ในการทำลายเชื้อลง 10 เท่า (lag time)

$\log N_t$ คือ จำนวนเชื้อ ณ เวลา t

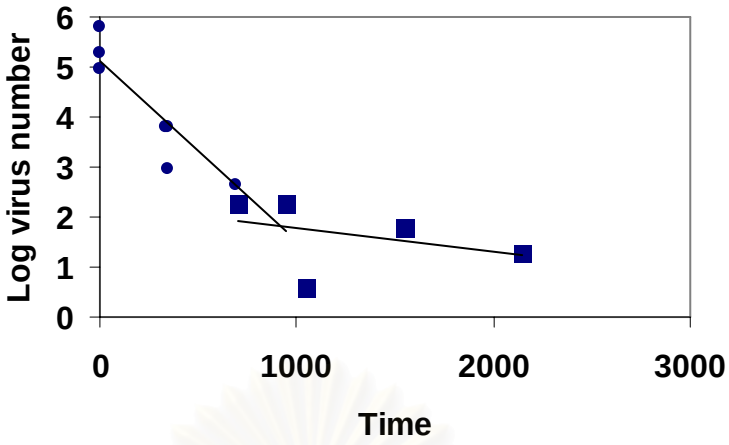
$\log N_o$ คือ จำนวนเชื้อเริ่มต้น

t คือ ระยะเวลาในการทำลายเชื้อ

D คือ Decimal reduction time

ทำการวิเคราะห์โดยคำนวณว่าค่า t_L น้อยกว่าค่า D_T ของการทำลายเชื้อรวมตลอดระยะเวลาการทดลองหรือไม่ ถ้าหากว่า t_L น้อยกว่าค่า D_T แล้ว แสดงว่าไม่มี shoulder effect ดังนั้นสามารถใช้ค่า D_T ของการทำลายเชื้อรวมตลอดระยะเวลาการทดลองได้ แต่ถ้า t_L ไม่น้อยกว่าค่า D_T แล้ว แสดงว่ามี shoulder effect ดังนั้น จึงให้ใช้ค่า D_T ของการทำลายเชื้อโดยไม่รวม t_L (16)

8.3 รูปแบบท้ายลาด (tailing) ในกรณีที่มีไวรัสกลุ่มย่อย (subpopulation) ที่มีความต้านทานความร้อนสูงกว่าประชากรรวมทั้งหมด ทำให้ไวรัสกลุ่มย่อยนี้ถูกทำลายในช่วงสุดท้ายและมีอัตราการทำลายที่ต่ำกว่าประชากรรวมทั้งหมด รูปร่างของเส้นโค้งหรืออัตราการทำลายจะเห็นเป็น 2 ส่วนแยกกันชัดเจน เรียกว่า เส้นโค้ง 2 ระยะ (biphasic curve) (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 เส้นโค้งการทำลายเชื้อแบบท้ายลาด (tailing) หรือแบบ 2 ระยะ (biphasic)

ทำการวิเคราะห์โดยเฉลี่ยตามสัดส่วนของปริมาณการทำลายไวรัสทั้ง 2 ระยะ เป็นค่า D_T ของการทดลองนั้นๆ (16, 18)

9. การคำนวณอัตราการเปลี่ยนค่า D_T

การคำนวณหาอัตราการเปลี่ยนค่า D_T จากเส้นโค้งการลดค่า D_T (Decimal reduction curve) เพื่อทำนายอัตราการทำลายไวรัส ณ อุณหภูมิอื่นๆ ที่ไม่ได้ทำการทดลองโดยตรง และคำนวณค่า Z ในสื่อที่ทำการศึกษาเพื่อใช้เปรียบเทียบกับอัตราการเปลี่ยนค่า D_T ในสื่ออื่นๆรวมถึงในเนื้อสุกรชุบแป้งทอด

ค่า Z คือ ช่วงอุณหภูมิที่เปลี่ยนค่า D ร้อยละ 90 โดยที่ค่า Z เป็นคุณสมบัติประจำไวรัสในสื่อที่ทดลองนั้นๆ ค่า Z นี้มีประโยชน์ในการทำนาย (predict) อัตราการทำลายไวรัสในอุณหภูมิอื่นๆ ได้โดยไม่จำเป็นต้องทำการทดลอง ณ อุณหภูมินั้นโดยตรง โดยค่า Z นี้หาได้จากความสัมพันธ์ ของเลขยกกำลังของค่า D_T (ตัวแปรตาม: Y) กับอุณหภูมิที่ใช้ (ตัวแปรอิสระ: X) ในลักษณะ semi-logarithmic scale เรียกความสัมพันธ์นี้ว่า เส้นโค้งการลดค่า D_T (Decimal reduction curve) ซึ่งสามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในเชิงสมการเส้นตรงแบบถดถอยได้ (linear regression analysis) อนึ่ง ค่าลบของส่วนกลับของความชันของเส้นโค้งนี้ ก็คือค่า Z นั่นเอง

ค่าความชันที่คำนวณได้จากสมการเส้นตรง จะทำการทดสอบสมมุติฐานว่าค่าความชันนี้มีความแตกต่างจากค่าความชันเท่ากับศูนย์หรือไม่ ($H_0 = \beta_1 = 0$) ที่ระดับนัยสำคัญร้อยละ 5

วิธีการวิเคราะห์รูปแบบหรือลักษณะเส้นโค้งการลดค่า D_T จะใช้วิธีการเดียวกับที่กล่าวไว้ในเรื่อง “รูปแบบหรือลักษณะเส้นโค้งการทำลายไวรัส” อย่างไรก็ตาม จากข้อมูลการศึกษานำร่องมีหลักฐานระบุว่าแนวโน้มของรูปแบบหรือลักษณะเส้นโค้งการลดค่า D_T มีรูปแบบเป็นแบบท้ายลาด (tailing) โดยที่มีค่า Z ที่อุณหภูมิ 50°ซ จะสูงกว่าและแยกจากกลุ่มค่า Z ที่อุณหภูมิ 60-100°ซ ดังนั้นการวิเคราะห์ข้อมูลค่า Z จะทำ 3 วิธีเปรียบเทียบกัน คือ

9.1 วิเคราะห์รวมระหว่างอุณหภูมิ 50-100°ซ

9.2 วิเคราะห์รวมระหว่างอุณหภูมิ 60-100°ซ

9.3 วิเคราะห์ตามรูปแบบท้ายลาด (tailing)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการวิจัย

1. อัตราการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย หรือ ค่า D_T

ค่า D_T ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์ต่างๆ ณ อุณหภูมิ 50°ซ, 60°ซ, 70°ซ, 80°ซ, 90°ซ และ 100°ซ แสดงในตารางที่ 2-7 ตามลำดับ

ตารางที่ 2 อัตราการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ณ อุณหภูมิ 50°ซ

Serotype	D-Value[I] (second)	SE[II]	r^2 [III]	RMSE[IV]	P value[V]
O189/87	806[a]	176	0.69	0.68	0.0001
OPN/65	890[a]	845	0.63	0.59	N/A[VI]
A118/87	2,414[b]	8,490	0.13	0.96	0.23
A-Sakol/97	2,279[b]	14,476	0.10	0.75	0.27
A132/87	732[a]	149	0.88	0.42	N/A
AS1/85	2,329[b]	3,657	0.25	0.71	0.14

[I] ตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05
[II] Standard error of regression coefficient
[III] Correlation coefficients
[IV] Root mean square error
[V] ทดสอบ regression coefficient = 0
[VI] Not applicable

ค่าพิสัยของ D_{50} ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ศึกษาครั้งนี้อยู่ระหว่าง 732 ถึง 2,414 วินาที หรือเท่ากับ 12.2 ถึง 40.2 นาที อาจจะสามารถแบ่งไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยโดยใช้ค่า D_{50} ออกเป็น 2 กลุ่มคร่าวๆ คือ กลุ่มที่มีค่า D_{50} ต่ำกว่าและสูงกว่า 15 นาที โดยพบว่า A118/87 อยู่ในกลุ่มที่มีค่า D_{50} สูงกว่า 15 นาที จากตารางที่ 2 ยังพบด้วยว่า A118/87 มีความทนความร้อนสูงสุดแต่กลับไม่แตกต่างจาก A-Sakolnakorn/97 และ AS1/85 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตาม ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในกลุ่มนี้มีทนความร้อนสูงกว่าไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยกลุ่มที่มีค่า D_{50} ต่ำกว่า 15 นาที คือ O189/87, OPN/65 และ A132/87 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

แม้ว่าค่า r^2 ที่ได้จากการทาบ (fit) ข้อมูลดิบกับสมการเส้นตรงจะมีค่าไม่สูงมากนัก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง r^2 ของ A-Sakol มีค่า 0.10 เท่านั้น ทั้งนั้นเนื่องมาจากความชันของสมการเส้นตรงมีค่าน้อยมาก โดยสามารถสังเกตได้จากค่า D_{50} ซึ่งมีค่าสูงมาก ในขณะที่ค่า RMSE ของ A-Sakol ก็ไม่สูงมาก เท่ากับว่า สมการเส้นตรงนั้นทาบกับข้อมูลดิบจากการทดลองได้ดี ดังนั้น ค่า r^2 ที่ต่ำมิได้เกิดจากความผิดพลาดหรือความไม่สม่ำเสมอในการทดลอง แต่น่าจะเกิดจากค่า D_T ที่

อุณหภูมิต่ำ มักมีค่าสูง เนื่องจาก ระดับความสัมพันธ์ของตัวแปรอิสระ คือ เวลาในการทำลายไวรัส และตัวแปรตาม คือ ปริมาณไวรัส นั้นมีค่าน้อย จึงทำให้ค่า r^2 ต่ำได้

จากประเด็นเรื่องของค่า r^2 ที่มีค่าต่ำ ส่วนหนึ่งเกิดจากระดับความสัมพันธ์ของตัวแปรอิสระและตัวแปรตาม จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่า เมื่อทำการทดสอบสมมุติฐานว่า ความชันของสมการเส้นตรงมีความแตกต่างจาก 0 ซึ่งเป็นการทดสอบว่า ตัวแปรอิสระและตัวแปรตามมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่ จากการทดสอบพบว่า ไวรัสในกลุ่มที่มีความทนความร้อนสูงนั้น ได้แก่ A118, A-Sakol และ AS1 มีความชันไม่แตกต่างจาก 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หมายความว่า ค่า D_T มีระดับที่สูงมาก หรือ ต้องใช้เวลานานมากในการทำลายไวรัสลง 10 เท่า ที่อุณหภูมิ 50°ซ

สำหรับไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย OPN และ A132 มีลักษณะที่เป็นแบบท้ายลาด (tailing) [ศึกษาเพิ่มเติมจากหัวข้อ “รูปแบบหรือลักษณะเส้นโค้งการทำลายไวรัส” ในเรื่องวิธีทำวิจัย] เมื่อทำการวิเคราะห์แล้วพบว่า ค่า RMSE ลดลง จาก 0.94 และ 1.12 (ไม่ได้แสดงข้อมูล) เป็น 0.59 และ 0.42 (ตารางที่ 2) ตามลำดับ ดังนั้น การปรับวิธีวิเคราะห์ค่า D_{50} โดยการใช้การวิเคราะห์แบบ tailing จะทำให้ได้ค่า D_{50} ที่มีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการคำนวณค่า D_{50} ตามวิธีการวิเคราะห์แบบ tailing เป็นการเฉลี่ยค่าตามสัดส่วนของ 2 ระยะการทำลายไวรัส ดังนั้น จึงไม่ได้รายงานค่า P value

ตารางที่ 3 อัตราการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ณ อุณหภูมิ 60°ซ

Serotype	D-Value[I] (second)	SE[II]	r^2 [III]	RMSE[IV]	P value[V]
O189/87	16.37[a]	2.23	0.83	0.85	8×10^{-7}
OPN/65	42.00[a]	9.11	0.74	0.50	N/A[VI]
A118/87	18.36[a]	3.30	0.81	0.79	0.0001
A-Sakol/97	21.20[a]	4.36	0.77	0.77	0.0002
A132/87	21.73[a]	4.03	0.84	0.68	0.0002
AS1/85	32.83[a]	8.82	0.61	0.71	0.0003

[I] ตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05

[II] Standard error of regression coefficient

[III] Correlation coefficients

[IV] Root mean square error

[V] ทดสอบ regression coefficient = 0

[VI] Not applicable

ตารางที่ 4 อัตราการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ณ อุณหภูมิ 70°ซ

Serotype	D-Value[I] (second)	SE[II]	r^2 [III]	RMSE[IV]	P value[V]
O189/87	6.06[a]	1.22	0.81	0.67	0.0003
OPN/65	10.87[a]	7.58	0.59	0.68	N/A[VI]
A118/87	8.87[a]	1.29	0.86	0.65	1×10^{-5}
A-Sakol/97	8.68[a]	1.27	0.86	0.66	1×10^{-5}
A132/87	7.28[a]	2.32	0.66	1.16	0.003
AS1/85	9.24[a]	1.45	0.82	0.69	9×10^{-6}

[I] ตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05

[II] Standard error of regression coefficient

[III] Correlation coefficients

[IV] Root mean square error

[V] ทดสอบ regression coefficient = 0

[VI] Not applicable

แม้ว่าค่าพิสัยของ D_{60} ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้ง 6 เสตรนที่ศึกษาจะอยู่ระหว่าง 16.37 ถึง 42 วินาทีแต่ D60 ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้ง 6 เสตรนนั้นกลับไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีลักษณะเดียวกันกับที่พบที่อุณหภูมิ 70°ซ คือ ค่าพิสัยของ D_{70} ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ศึกษาอยู่ระหว่าง 6.06 ถึง 10.87 วินาที แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของ D_{70} ของไวรัสทั้งหมดจากการศึกษาครั้งนี้ เช่นเดียวกันกับที่อุณหภูมิ 60°ซ

ค่า D_{60} และ D_{70} มีค่าลดลงกว่า D_{50} เป็นการสะท้อนถึงระดับความสัมพันธ์ของตัวแปรอิสระและตัวแปรตามที่เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งจะสังเกตได้ว่า ค่า r^2 เพิ่มสูงขึ้นอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งไวรัส A-Sakol และ A118 มีค่า r^2 ที่ 50°ซ เท่ากับ 0.10 และ 0.13 ตามลำดับ แต่กลับมีค่า r^2 ที่ 60°ซ เป็น 0.77 และ 0.81 ตามลำดับ และ 70°ซ เป็น 0.86 เท่ากัน ในขณะที่มีค่า RMSE ที่ค่อนข้างคงที่ไม่เกิน 0.80 และ นอกจากนี้ ค่า P value ยังมีระดับที่ต่ำมากด้วย แสดงถึงความสัมพันธ์ที่มากขึ้นของตัวแปรทั้ง 2 หรือ ค่า D_{60} และ D_{70} เป็นค่าที่เชื่อถือได้

ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย OPN มีรูปแบบการทำลายไวรัสแบบ tailing ที่อุณหภูมิ 60°ซ และ 70°ซ เหมือนกับที่อุณหภูมิ 50°ซ มีค่า RMSE ที่ดีกว่าวิธีการวิเคราะห์แบบสมการเส้นตรงปกติ โดยค่า RMSE ที่อุณหภูมิ 60°ซ และ 70°ซ ลดลงจาก 0.58 และ 0.81 เป็นค่า 0.5 และ 0.68 ตามลำดับ จึงไม่รายงาน P value

ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย O189 แสดงลักษณะการทำลายไวรัสแบบหัวไหล่ (shoulder effect) ที่อุณหภูมิ 60°ซ และ 70°ซ แต่เมื่อทำการวิเคราะห์หาค่า t_L ที่อุณหภูมิ 60°ซ และ 70°ซ พบว่า

ไม่แตกต่างจาก D_{60} และ D_{70} ที่ได้จากการวิเคราะห์แบบวิธีสมการเส้นตรงปกติ หรือ ไม่มี shoulder effect นั่นเอง ดังนั้น จึงเลือกใช้ค่า D_{60} และ D_{70} เดิม

ตารางที่ 5 อัตราการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ณ อุณหภูมิ 80°ซ

Serotype	D-Value[I] (second)	SE[II]	r^2 [III]	RMSE[IV]	P value[V]
O189/87	2.84[a]	0.35	0.89	0.91	4×10^{-6}
OPN/65	5.99[b]	0.70	0.94	0.60	7×10^{-5}
A118/87	3.81[a,b]	0.54	0.85	0.95	6×10^{-6}
A-Sakol/97	5.16[b]	0.57	0.91	0.70	2×10^{-6}
A132/87	3.38[a]	0.32	0.94	0.61	1×10^{-6}
AS1/85	5.42[b]	0.37	0.95	0.48	3×10^{-10}

[I] ตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05

[II] Standard error of regression coefficient

[III] Correlation coefficients

[IV] Root mean square error

[V] ทดสอบ regression coefficient = 0

ค่าพิสัยของ D_{80} ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ศึกษาอยู่ระหว่าง 2.84 ถึง 5.99 วินาที แบ่งเป็นกลุ่มที่ทนความร้อนต่ำกว่า คือ O189, A118, A132 ซึ่งมีค่า D_{80} ต่ำกว่า 3.8 วินาที และกลุ่มที่ทนความร้อนสูงกว่า คือ A118, OPN, A-Sakol และ AS1 มีค่า D_{80} สูงกว่า 3.8 วินาที โดยที่ A118 จะอยู่กึ่งกลางของทั้ง 2 กลุ่ม

รูปแบบการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทุกเสตรนที่อุณหภูมิ 80°ซ มีลักษณะเป็นเส้นตรงทั้งหมด ไม่พบรูปแบบการทำลายไวรัสแบบ tailing หรือ shoulder

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 อัตราการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ณ อุณหภูมิ 90°ซ

Serotype	D-Value[I] (second)	SE[II]	r^2 [III]	RMSE[IV]	P value[V]
O189/87	2.35[a]	0.44	0.80	1.30	0.0001
OPN/65	3.18[a]	0.25	0.95	0.49	3×10^{-7}
A118/87	1.65[a]	0.34	0.83	1.05	0.0006
A-Sakol/97	1.75[a]	0.42	0.82	0.94	0.0009
A132/87	2.77[a]	0.44	0.87	0.87	0.0001
AS1/85	2.71[a]	0.32	0.90	0.67	2×10^{-6}

[I] ตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05

[II] Standard error of regression coefficient

[III] Correlation coefficients

[IV] Root mean square error

[V] ทดสอบ regression coefficient = 0

ตารางที่ 7 อัตราการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ณ อุณหภูมิ 100°ซ

Serotype	D-Value[I] (second)	SE[II]	r^2 [III]	RMSE[IV]	P value[V]
O189/87	2.94[a]	0.39	0.90	0.65	3×10^{-5}
OPN/65	2.88[a]	0.41	0.89	0.55	4×10^{-5}
A118/87	2.64[a]	0.66	0.76	0.64	0.001
A-Sakol/97	2.52[a]	0.45	0.78	1.04	3×10^{-5}
A132/87	2.49[a]	0.36	0.84	0.87	4×10^{-6}
AS1/85	1.90[a]	0.31	0.83	0.88	3×10^{-5}

[I] ตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05

[II] Standard error of regression coefficient

[III] Correlation coefficients

[IV] Root mean square error

[V] ทดสอบ regression coefficient = 0

ค่าพิสัยของ D_{90} ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้ง 6 เสตรนที่ศึกษาอยู่ระหว่าง 1.65 ถึง 3.18 วินาที และD_{90} ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้ง 6 เสตรนที่ศึกษาไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในลักษณะเดียวกันกับที่พบที่อุณหภูมิ 100°ซ ค่าพิสัยของ D_{100} ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ศึกษาอยู่ระหว่าง 1.90 ถึง 2.94 วินาที และไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของ D_{100} ของไวรัสทั้งหมดจากการศึกษาครั้งนี้ เช่นเดียวกันกับที่อุณหภูมิ 90°ซ

ที่อุณหภูมิ 90°ซ ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยมีลักษณะการถูกทำลายที่เบี่ยงเบนไปจากปกติ คือ เป็นลักษณะแบบหัวไหล่ทุกเสตรน ยกเว้น OPN เมื่อทำการวิเคราะห์การทำลายไวรัสแบบหัวไหล่แล้วพบว่า เฉพาะ O189 และ A132 ไม่มี shoulder effect ดังนั้นจึงใช้ค่า D_{90} เดิม แต่ A118, A-Sakol และ AS1 แสดง shoulder effect เนื่องจาก t_L ที่คำนวณได้มีความแตกต่างจาก D_{90} ดังนั้น จึงใช้ค่า D_{90} ที่คำนวณโดยไม่รวมส่วนแรกของการทำลายไวรัส แม้ว่าจะพบ shoulder effect หรือไม่ก็ตาม ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทุกเสตรนก็มีค่า D_T ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่อุณหภูมิ 90°ซ

ที่อุณหภูมิ 100°ซ มี 2 เสตรนที่มีรูปแบบการทำลายไวรัสแบบหัวไหล่ เมื่อทำการวิเคราะห์แล้วพบว่า A-Sakol ไม่มี shoulder effect ในขณะที่ AS1 มี shoulder effect

สรุปโดยรวม จะเห็นได้ว่าไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ระบาดในประเทศไทยทั้ง 3 ซีโรไทป์ 6 เสตรน โดยแต่ละเสตรนนั้นแทบจะไม่มีความแตกต่างกันในเชิงการทนต่อความร้อนระหว่างอุณหภูมิ 50-100°ซ ยกเว้นที่ อุณหภูมิ 50°ซ และ 80°ซ ซึ่งมีค่า D_T แบ่งเป็น 2 กลุ่ม และแต่ละกลุ่มก็ประกอบด้วยซีโรไทป์และเสตรนที่แตกต่างกันด้วย ดังนั้น ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในซีโรไทป์เดียวกันก็ไม่จำเป็นต้องมีลักษณะการทนความร้อนที่ใกล้เคียงกัน เนื่องจาก การ ฯแบ่งกลุ่มซีโรไทป์และเสตรนของไวรัสนั้นอาศัยลักษณะการคุ้มโรคที่เกิดจากร่างกายสัตว์ตอบสนองต่อโครงสร้างภายนอกของอนุภาคไวรัส

ค่า D_T ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเสตรน O189, OPN, A118, A-Sakol, A132, และ AS1 ณ อุณหภูมิต่างๆ แสดงในตารางที่ 8-13 ตามลำดับ

ตารางที่ 8 อัตราการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์ O189 ที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ	D-Value[I] (second)	SE[II]	r^2 [III]	RMSE[IV]	P value[V]
50	806[a]	176	0.69	0.68	0.0001
60	16.37[b]	2.23	0.83	0.85	8×10^{-7}
70	6.06[c]	1.22	0.81	0.67	0.0003
80	2.84[d]	0.35	0.89	0.91	4×10^{-6}
90	2.35[d]	0.44	0.80	1.30	0.0001
100	2.94[d]	0.39	0.90	0.65	3×10^{-5}

[I] ตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05

[II] Standard error of regression coefficient

[III] Correlation coefficients

[IV] Root mean square error

[V] ทดสอบ regression coefficient = 0

ค่า D_T ลดลงอย่างรวดเร็วจากอุณหภูมิ 50 °ซ มาที่อุณหภูมิ 60 °ซ ในขณะที่อุณหภูมิที่ค่อยๆ เพิ่มสูงขึ้นค่า D_T กลับลดลงอย่างช้าๆ โดยเฉพาะในช่วงอุณหภูมิ 60-80 °ซ ข้อสังเกตที่น่าสนใจ คือ ถึงแม้ว่าโดยหลักการแล้วค่า D_{100} ควรจะต่ำกว่า D_{80} และ D_{90} แต่จากการทดลองจริงค่า D_{80}, D_{90} และ D_{100} ของทั้ง 3 อุณหภูมิไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่า ที่ระดับอุณหภูมิสูง เกินกว่า 60°ซ นั้นไวรัสมีความไวต่อความร้อนใกล้เคียงกันอย่างมาก ดังนั้น ข้อแนะนำในการศึกษาต่อไป คือ การเพิ่มจำนวนซ้ำการทดลองเพื่อลดค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานหรือความแปรปรวนระหว่างช่วงอุณหภูมิลง จะทำให้มีโอกาสเห็นความแตกต่างของค่า D_T ที่อุณหภูมิต่างๆ ได้ชัดเจนขึ้น

ตารางที่ 9 อัตราการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์ OPN ที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ	D-Value[I] (second)	SE[II]	r^2 [III]	RMSE[IV]	P value[V]
50	890[a]	845	0.63	0.59	N/A[VI]
60	42.00[b]	9.11	0.74	0.50	N/A
70	10.87[c]	7.58	0.59	0.68	N/A
80	5.99[c]	0.70	0.94	0.60	7×10^{-5}
90	3.18[e]	0.25	0.95	0.49	3×10^{-7}
100	2.88[e]	0.41	0.89	0.55	4×10^{-5}

[I] ตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05

[II] Standard error of regression coefficient

[III] Correlation coefficients

[IV] Root mean square error

[V] ทดสอบ regression coefficient = 0

[VI] Not applicable

อัตราการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย เสตรน OPN ถึงแม้จะพบว่า ค่า D_T มีการเรียงลำดับจากมากไปหาน้อยขณะที่อุณหภูมิเพิ่มสูงมากขึ้น แต่พบว่าภายในคู่ D_{70} และ D_{80} รวมถึงภายในคู่ D_{90} และ D_{100} กลับไม่มีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จะสังเกตได้อีกครั้งว่า ค่า D_T ที่อุณหภูมิสูงมักไม่ค่อยมีความแตกต่างกันมากนัก

ตารางที่ 10 อัตราการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์ A118 ที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ	D-Value[I] (second)	SE[II]	r^{2} [III]	RMSE[IV]	P value[V]
50	2,414[a]	8,490	0.13	0.96	0.23
60	18.36[b]	3.30	0.81	0.79	0.0001
70	8.87[c]	1.29	0.86	0.65	1×10^{-5}
80	3.81[c,d]	0.54	0.85	0.95	6×10^{-6}
90	1.65[e]	0.34	0.83	1.05	0.0006
100	2.64[d,e]	0.66	0.76	0.64	0.001

[I] ตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05

[II] Standard error of regression coefficient

[III] Correlation coefficients

[IV] Root mean square error

[V] ทดสอบ regression coefficient = 0

อัตราการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์ A118 พบ ค่า D_{100} สูงกว่าค่า D_{90} แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ แม้ว่าค่า D_{100} แม้ว่าจะต่ำกว่าค่า D_{80} แต่ว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกัน ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์ A118 เป็นไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยอีกซีโรไทป์หนึ่งที่พบว่าค่า D_T ที่อุณหภูมิสูงๆ นั้นไม่ค่อยมีความแตกต่างกันมากนัก (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 11 อัตราการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์ A-Sakol ที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ	D-Value[I] (second)	SE[II]	r^{2} [III]	RMSE[IV]	P value[V]
50	2,279[a]	14,476	0.10	0.75	0.27
60	21.20[b]	4.36	0.77	0.77	0.0002
70	8.68[c]	1.27	0.86	0.66	1×10^{-5}
80	5.16[d]	0.57	0.91	0.70	2×10^{-6}
90	1.75[e]	0.42	0.82	0.94	0.0009
100	2.52[e]	0.45	0.78	1.04	3×10^{-5}

[I] ตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05

[II] Standard error of regression coefficient

[III] Correlation coefficients

[IV] Root mean square error

[V] ทดสอบ regression coefficient = 0

ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย A-Sakol มีค่า D_T ที่ลดลงตามลำดับอุณหภูมิที่เพิ่มมากขึ้น แต่ไม่พบความแตกต่างของค่า D_{90} และ D_{100} อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 12 อัตราการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์ A132 ที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ	D-Value[I] (second)	SE[II]	r^2 [III]	RMSE[IV]	P value[V]
50	732[a]	149	0.88	0.42	N/A[VI]
60	21.73[b]	4.03	0.84	0.68	0.0002
70	7.28[b]	2.32	0.66	1.16	0.003
80	3.38[c]	0.32	0.94	0.61	1×10^{-6}
90	2.77[c]	0.44	0.87	0.87	0.0001
100	2.49[c]	0.36	0.84	0.87	4×10^{-6}

[I] ตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05

[II] Standard error of regression coefficient

[III] Correlation coefficients

[IV] Root mean square error

[V] ทดสอบ regression coefficient = 0

[VI] Not applicable

อัตราการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์ A132 พบค่าD_{50} มีค่าสูงที่สุดและสูงกว่า D_{60} และ D_{70} ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ D_{80}, D_{90} และ D_{100} ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 12)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 13 อัตราการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์ AS1 ที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ	D-Value[I] (second)	SE[II]	r^2 [III]	RMSE[IV]	P value[V]
50	2,329[a]	3,657	0.25	0.71	0.14
60	32.83[b]	8.82	0.61	0.71	0.0003
70	9.24[c]	1.45	0.82	0.69	9×10^{-6}
80	5.42[d]	0.37	0.95	0.48	3×10^{-10}
90	2.71[e]	0.32	0.90	0.67	2×10^{-6}
100	1.90[e]	0.31	0.83	0.88	3×10^{-5}

[I] ตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05

[II] Standard error of regression coefficient

[III] Correlation coefficients

[IV] Root mean square error

[V] ทดสอบ regression coefficient = 0

อัตราการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์ AS18 พบค่า D_{50} สูงกว่าค่า D_{60}, D_{70} และ D_{80} ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ว่า D_{90} ไม่แตกต่างจาก D_{100} อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 13)

สรุปค่า D_T ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์ O189, OPN, A118, A-Sakol, A132 และ AS1 ณ อุณหภูมิ 50°ซ, 60°ซ, 70°ซ, 80°ซ, 90°ซ และ 100°ซ แสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ค่า D_T ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์ต่างๆ ณ อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ	ค่า D_T (วินาที) ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์ต่างๆ					
(°ซ)	O189/87	OPN/65	A118/87	A-Sakol/97	A132/87	AS1/85
50	806	890	2,414	2,279	732	2,329
60	16.37	42.00	18.36	21.20	21.73	32.83
70	6.06	10.87	8.87	8.68	7.28	9.24
80	2.84	5.99	3.81	5.16	3.38	5.42
90	2.35	3.18	1.65	1.75	2.77	2.71
100	2.94	2.88	2.64	2.52	2.49	1.90

2. คำนวณหาอัตราการเปลี่ยนแปลงค่า D หรือ ค่า Z

ใช้ข้อมูลค่า D_T จาก 6 อุณหภูมิ คือ 50°ซ, 60°ซ, 70°ซ, 80°ซ, 90°ซ และ 100°ซ คำนวณค่า Z ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้ 3 วิธี ดังตารางที่ 15-17 และภาพที่ 4

ตารางที่ 15 ค่า Z ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในสารละลาย คำนวณจาก 50-100°ซ

Serotype	Z-Value[I] (°C)	SE[II]	r^{2} [III]	RMSE[IV]	P value[V]
O189/87	23.26[a]	11.78	0.69	0.60	0.04
OPN/65	21.78[a]	6.54	0.82	0.44	0.01
A118/87	19.11[a]	9.03	0.71	0.70	0.04
A-Sakol/97	19.17[a]	8.38	0.73	0.66	0.03
A132/87	22.79[a]	9.15	0.75	0.53	0.03
AS1/85	18.50[a]	6.51	0.79	0.59	0.02

[I] ตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05

[II] Standard error of regression coefficient

[III] Correlation coefficients

[IV] Root mean square error

[V] ทดสอบ regression coefficient = 0

ตารางที่ 16 ค่า Z ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในสารละลาย คำนวณจาก 60-100°ซ

Serotype	Z-Value[I] (°C)	SE[II]	r^{2} [III]	RMSE[IV]	P value[V]
O189/87	52.55[a]	26.62	0.75	0.20	0.06
OPN/65	34.95[a]	8.16	0.90	0.17	0.01
A118/87	41.41[a]	14.67	0.83	0.20	0.03
A-Sakol/97	39.29[a]	11.26	0.87	0.18	0.02
A132/87	43.45[a]	13.52	0.86	0.17	0.02
AS1/85	33.25[a]	4.95	0.95	0.12	0.00

[I] ตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05

[II] Standard error of regression coefficient

[III] Correlation coefficients

[IV] Root mean square error

[V] ทดสอบ regression coefficient = 0

ตารางที่ 17 ค่า Z ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในสารละลาย คำนวณจาก 50-100°ซ โดยใช้การปรับเส้นโค้งแบบ Tailing

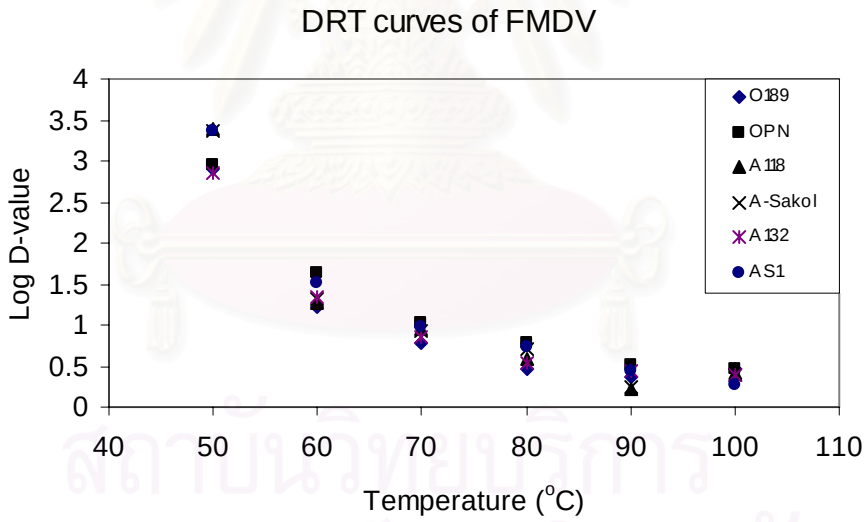
Serotype	Z-Value[I] (°C)	SE[II]	r^{2} [III]	RMSE[IV]
O189/87	20.26[a]	29.62	0.93	215.94
OPN/65	20.37[a]	3.58	0.98	178.43
A118/87	14.02[a]	10.59	0.93	205.11
A-Sakol/97	13.94[a]	7.16	0.95	202.51
A132/87	20.76[a]	7.45	0.96	196.19
AS1/85	15.40[a]	1.04	1.00	186.72

[I] ตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05

[II] Standard error of regression coefficient

[III] Correlation coefficients

[IV] Root mean square error



ภาพที่ 4 แสดงเส้นโค้งการเปลี่ยนแปลงค่า D_T ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้ง 6 เสตรน

พิสัยของค่า Z ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีรวม 6 อุณหภูมิ คือ 50-100°ซ อยู่ระหว่าง 19.11 ถึง 23.26 องศาโดย A118 และ O189 มีค่า Z สูงสุดและต่ำสุดตามลำดับ ส่วนพิสัยของค่า Z ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีรวม 5 อุณหภูมิ คือ 60-100°ซ อยู่ในช่วงที่ต่ำกว่าวิธีการวิเคราะห์ที่รวม 6 อุณหภูมิ คือ อยู่ระหว่าง 33.25 ถึง 52.55 องศาโดย O189 และ AS1 มีค่า Z สูงสุดและต่ำสุดตามลำดับ ทั้งนี้สาเหตุที่ทำให้ค่า Z วิเคราะห์ด้วยวิธีที่ 2 สูงกว่าค่า Z วิเคราะห์ด้วยวิธีแรก เนื่องจาก D_{50} สูงกว่ากลุ่ม D_{60} ถึง D_{100} ค่อนข้างมาก หรือ ค่าความชันของเส้นโค้งการทำลายไวรัสที่อุณหภูมิ

สูงมีค่าสูงกว่าค่าความชันของเส้นโค้งการทำลายไวรัสที่อุณหภูมิที่ต่ำกว่า (ภาพที่ 4) ทั้งนี้สังเกตได้จากค่า r^2 เพิ่มมากขึ้น เมื่อใช้วิธีวิเคราะห์วิธีที่ 2 แบบรวม 5 อุณหภูมิ

พิสัยของค่า Z ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี tailing โดยพิจารณารวม 6 อุณหภูมิ คือ 50-100°ซ อยู่ระหว่าง 13.94 ถึง 20.76 องศาโดย A132 และ A-Sakol มีค่า Z สูงสุดและต่ำสุดตามลำดับ จะสังเกตได้ว่า ค่า Z ที่ได้จากวิธีวิเคราะห์แบบ tailing มีค่าต่ำสุดในการวิเคราะห์ทั้ง 3 วิธี และมีค่า r^2 ที่สูงที่สุดด้วย

เมื่อวิเคราะห์หาความแตกต่างระหว่างค่า Z ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยแต่ละเสตรน พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งสิ้น ดังนั้น จึงไม่มีปัญหาเรื่องความทนความร้อนของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยระหว่างอุณหภูมิที่ใช้ทำลายไวรัส

การเลือกค่า Z จากการวิเคราะห์โดยวิธีทั้ง 3 นั้น อาจจะพิจารณาจากข้อมูลจากการศึกษาที่ผ่านมาทั้งสำหรับไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยหรือไวรัสอื่นในกลุ่มใกล้เคียงกัน พบว่า ไวรัสตับอักเสบเอ (hepatitis A virus) ซึ่งเป็นไวรัสที่อยู่ใน family เดียวกับไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยมีค่า Z ระหว่าง 11.26-21.41°ซ ในน้ำตาลซูโครส 28-52 °Brix(2) ในขณะที่ค่า Z ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยอยู่ที่ประมาณ 10°ซ ในน้ำนมหรือประมาณ 23 องศาในอาหารเลี้ยงเซล (1, 17) จะสังเกตได้ว่าค่า Z จะไม่เกิน 30 °ซ ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จะเลือกค่า Z ที่ได้จากการวิเคราะห์รวม 6 อุณหภูมิโดยมิได้ปรับ tailing แม้ว่า r^2 จะไม่สูงมากนักแต่มีค่า RMSE ที่ต่ำกว่ามาก (ตารางที่ 15 และ 17)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การอภิปรายผล

แม้ว่าไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์ที่มีการศึกษากันอย่างมาก คือ ซีโรไทป์โอ (serotype O) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเสตรน O-BFS 1860 (4, 9, 17) แต่กลับมีผลการศึกษาที่แตกต่างกันค่อนข้างมาก คือ ค่า D_{49} ประมาณ 28.8 นาที ใน PBS ที่ pH 8.0 (4) D_{50} ประมาณ 4.17 นาที ในอาหารเลี้ยงเซลล์(17) และ D_{54} ประมาณ 25.21 นาที ใน PBS ที่ pH 7.6 (9) แม้ว่าจะไม่สามารถเปรียบเทียบค่า D_T ณ อุณหภูมิเดียวกันได้ (โดยเชื้ออยู่ในสื่อที่แตกต่าง) แต่จะสังเกตได้ว่า ถ้าค่า Z อยู่ที่ประมาณ 10-20 องศา ดังนั้น D_T ที่จะลดลงมาได้ 10 เท่าต้องมีอุณหภูมิสูงกว่า D_T อ้างอิงนั้นประมาณ 10-20 องศา ดังนั้น เมื่อเปรียบเทียบค่า D_{49}, D_{50} และ D_{54} แล้ว พบว่า D_T ของทั้ง 3 ค่าจาก 3 การศึกษานั้นไม่อยู่ในช่วงที่เปรียบเทียบกันได้ หรือ สรุปได้ว่ามีความแตกต่างกันอย่างมาก อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบค่า D_T จากทั้ง 3 การศึกษากับการศึกษาครั้งนี้ แม้ว่าจะไม่ใช่ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเสตรน O-BFS 1860 ก็ตาม แต่ก็เป็นไวรัสในซีโรไทป์เดียวกัน พบว่า D_T ที่เปรียบเทียบกันได้ คือ D_{50} และ D_{54} เนื่องจาก ไม่สามารถคำนวณค่า D_{49} จากค่า Z ในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งได้จากการศึกษาช่วงอุณหภูมิระหว่าง 50-100°ซ ซึ่งอยู่นอกช่วง D_{49} (extrapolation) ผลการเปรียบเทียบค่า D_{50} และ D_{54} ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย O189 และ OPN กับ D_{50} และ D_{54} ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย O-BFS 1860 รวมถึง D_{54} ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์โอเสตรนอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 18

จากตารางที่ 18 จะเห็นได้ว่า D_{50} และ D_{54} ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย O189/87 และ OPN/65 อยู่ที่ประมาณ 13.4 นาทีและ 14.8 นาที ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่าค่า D_{50} ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย O-BFS 1860 ประมาณ 4.17 นาทีเท่านั้น ทั้งนี้เมื่อพิจารณาว่า ในอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งเป็นสื่อที่ใช้ในการศึกษาไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย O-BFS 1860 อาจมีโปรตีนหรือสารชนิดอื่นที่ช่วงป้องกันไวรัสจากความร้อน ทำให้ไวรัสที่ศึกษามีแนวโน้มทนความร้อนได้มาก (14) จะเห็นได้ว่า ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้ง O189/87 และ OPN/65 มีความทนทานต่อความร้อนสูงกว่าไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย O-BFS 1860 อย่างมาก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 18 ค่า D_{50} และ D_{54} ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์โอ เสตรนต่างๆ

เสตรน	D_{50} [a]	D_{54} [b]
O189/87	13.4	1.44
OPN/65	14.8	2.56
O-BFS 1860	4.17	25.21
O Lausanne	N/A[c]	26.20
O Pacheco	N/A	32.96
O Campos	N/A	25.97
O Colombia 7250	N/A	18.07
O Susan 5/75	N/A	23.81
O Susan 6/75	N/A	20.07
O Susan 1/76	N/A	18.07
OK 120/64	N/A	16.43

[a] ค่า D_T รายงานเป็นนาที

[b] ค่า Z ของ O189 = 23.26 องศา และ ค่า Z ของ OPN = 21.78 องศา

[c] Not applicable

อย่างไรก็ตามเมื่อทำการเปรียบเทียบค่า D_{54} ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย เสตรน O189 และ OPN กับ ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย เสตรน O-BFS 1860 และเสตรนอื่นๆ กลับให้ผลตรงกันข้าม คือ ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย O189 และ OPN กลับมีความไวต่อความร้อนสูงกว่าไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย เสตรน O-BFS 1860 และเสตรนอื่นๆ ประมาณ 6-10 เท่า นั่นหมายความว่า ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์โอ เสตรนที่มีการระบาดในประเทศไทยนั้นมีความไวต่อความร้อนมากกว่าไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย เสตรนที่พบในประเทศอื่นๆ ดังนั้น จะเห็นได้ว่า การเปรียบเทียบผลของแต่ละการศึกษาจะกระทำได้อย่างถูกต้องก็ต่อเมื่อมีวิธีการทำการทดลองและวิธีการวิเคราะห์ที่ใกล้เคียงกันหรือเหมือนกันเท่านั้น เท่ากับเป็นการสะท้อนให้เห็นว่าจำเป็นต้องมีการทดลองศึกษาหาอัตราการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยความร้อนโดยศึกษาจากไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเสตรนที่มีการระบาดจริงในประเทศไทย เพื่อให้ได้ข้อมูลที่แท้จริงของประเทศไทย

ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์เอ (serotype A) ในการศึกษาครั้งนี้ มีจำนวนมากที่สุด คือ 3 เสตรน เนื่องจาก เป็นซีโรไทป์ที่มีการระบาดค่อนข้างมากในประเทศไทย ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ซีโรไทป์เอ เสตรนที่ทำการศึกษาครั้งนี้ เป็นเสตรนที่แยกได้จากการระบาดจริงในประเทศและได้คัดเลือกเป็นเสตรนที่ใช้ในการผลิตวัคซีน ซึ่งมีความสัมพันธ์ทางซีรั่มวิทยาใกล้เคียงกับเชื้อที่

ระบาดในพื้นที่ ดังนั้น ผลการศึกษาจึงสามารถใช้เป็นข้อมูลหรือหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ได้อย่างมีน้ำหนักเพียงพอ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์เอ มีค่า D_{49} ประมาณ 612 นาที ใน PBS ที่ pH 8.0 (4) และ D_{54} ประมาณ 18.20 นาที ใน PBS ที่ pH 7.6 (9) จะสังเกตได้ว่า ลักษณะข้อมูลของ D_{49} และ D_{54} ค่อนข้างจะเหมือนกับกรณี D_{49} และ D_{54} ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์โอ คือ เป็นข้อมูลที่ไม่สามารถเปรียบเทียบกันได้อย่างตรงไปตรงมา เนื่องจาก ขาดข้อมูลของค่า Z ของแต่ละการศึกษาทำให้ไม่สามารถคำนวณค่า D_T เพื่อการเปรียบเทียบได้ เฉพาะข้อมูล D_{54} ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์เอ เสตรนอื่นๆ (9) เท่านั้น ที่สามารถนำมาเปรียบเทียบกับการศึกษาครั้งนี้ได้ เนื่องจาก อยู่ในช่วงอุณหภูมิที่ทำการศึกษา คือ 50-100°ซ จึงสามารถคำนวณหาค่า D_{54} ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์เอทั้ง 3 เสตรนได้ดังตารางที่ 19

ตารางที่ 19 ค่า D_{54} ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์เอ เสตรนอื่นๆ

เสตรน	ค่า D_{54} (นาที)
A118/87[a]	2.98
A-Sakol/87[b]	3.04
A132/87[c]	1.61
A_5 France 1/68	26.79
A_{22} Mahmatli	33.90
A_{22} Iraq 24/64	36.81
A Pando (1970)	37.97
A_{24} Cruzeiro	33.15
A Colombia 8046	15.35
A Bage	14.93
A Venceslau (Bra 1/77)	25.32
AK 18/66 (9)	18.34
A Sudan 2/75	15.23
A Morocco 5/77	18.58
A Morocco 8/77	12.34
A Philippine 10/75	12.07
A Philippine 14/75	13.95

[a] ค่า Z = 19.11 องศา

[b] ค่า Z = 19.17 องศา

[c] ค่า Z = 22.79 องศา

จากตารางที่ 19 จะเห็นได้ว่า ค่า D_{54} ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์เอ 3 เสตรนที่เคยมีการระบาดในประเทศไทยมีความทนต่อความร้อนน้อยกว่าซีโรไทป์เอ ทุกเสตรนที่ใช้ในการศึกษาที่ผ่านมาอย่างน้อยประมาณ 4 เท่า

ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์เอเชียวัน ถึงแม้ว่าไม่พบการระบาดในประเทศไทยมานานแล้ว แต่ยังมีความจำเป็นต้องทำการศึกษาความทนต่อความร้อนด้วย เนื่องจาก ซีโรไทป์เอเชียวันอาจเป็นซีโรไทป์ที่มีความทนต่อความร้อนสูงสุด ทำให้ต้องใช้ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์นี้ในการศึกษาในโครงการระยะต่อไป จากการศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลที่ผ่านมา(9) ดังแสดงในตารางที่ 20

ตารางที่ 20 ค่า D_{50} และ D_{54} ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์เอเชียวัน เสตรนต่างๆ

เสตรน	D_{52} [a]	D_{54} [b]
Asia1 Petchburi/85	4.83	3.76
Asia1 BHK TM3	70.42	N/A
Asia1 Pak 1/54	N/A	27.40
Asia1 Iran 1/73	N/A	26.79
Asia1 Turkey 73	N/A	23.53
Asia1 Hong Kong 24/75	N/A	24.09

[a] ค่า D_T รายงานเป็นนาที

[b] ค่า Z ของ Asia 1 = 18.50 องศา

[c] Not applicable

จากตารางที่ 20 พบว่า ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์เอเชียวัน เสตรน BHK TM3 มีค่า D_{52} ประมาณ 70.42 นาที (8) เป็นการศึกษาในประเทศไทยโดยใช้ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่แยกได้ในประเทศไทย และ ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์เอเชียวัน เสตรน Hong Kong 24/75 มีค่า D_{54} ประมาณ 24.09 นาที (9) เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเสตรน Petchburi/85 ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า D_{52} ประมาณ 4.83 นาที และ D_{54} ประมาณ 3.76 นาที ซึ่งจะเห็นได้ว่า ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์เอเชียวัน เสตรนที่แยกได้จากประเทศไทยอาจมีความทนทานต่อความร้อนแตกต่างกัน ทั้งนี้ อาจจะเนื่องมาจาก วิธีการศึกษาปริมาณไวรัสหรือวิธีการวิเคราะห์ข้อมูลหรืออาจเกิดจากการกลายพันธุ์ก็ได้ อย่างไรก็ตาม ผลที่ได้จากการศึกษาไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์เอเชียวันครั้งนี้ ทำให้ทราบว่า ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์เอเชียวัน เสตรน Petchaburi/85 มีความไวต่อความร้อนสูงกว่าไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์เอเชียวัน เสตรนอื่นๆ อย่างน้อย 6 เท่า

ข้อสรุป

1. ความร้อนในระดับอุณหภูมิระหว่าง 50-100°ซ มีประสิทธิภาพในการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้ง 3 ซีโรไทป์ คือ ซีโรไทป์โอ ซีโรไทป์เอ และซีโรไทป์เอชัยวัน รวม 6 เสตรน คือ O189, OPN, A118, A-Sakol, A132 และ AS1 ได้ในระดับที่แตกต่างกัน

2. ประสิทธิภาพการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ณ อุณหภูมิต่างๆ นั้นแสดงได้เป็นค่า D_T (Decimal reduction time) หรือ ระยะเวลาในการทำลายจำนวนไวรัสลง 10 เท่า ณ อุณหภูมิหนึ่งๆ ทั้งนี้ เมื่อมีการเพิ่มอุณหภูมิหรือเพิ่มระยะเวลาการให้ความร้อนแล้ว ทำให้อัตราการลดลงของจำนวนไวรัสเพิ่มขึ้นเป็นลำดับชัดเจน ดังตารางที่ 14 (ซ้ำ)

ตารางที่ 14 ค่า D_T ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์ต่างๆ ณ อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ	ค่า D_T (วินาที) ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์ต่างๆ					
(°ซ)	O189/87	OPN/65	A118/87	A-Sakol/97	A132/87	AS1/85
50	806	890	2,414	2,279	732	2,329
60	16.37	42.00	18.36	21.20	21.73	32.83
70	6.06	10.87	8.87	8.68	7.28	9.24
80	2.84	5.99	3.81	5.16	3.38	5.42
90	2.35	3.18	1.65	1.75	2.77	2.71
100	2.94	2.88	2.64	2.52	2.49	1.90

3. ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้ง 3 ซีโรไทป์ คือ ซีโรไทป์โอ ซีโรไทป์เอ และซีโรไทป์เอชัยวัน รวม 6 เสตรน คือ O189, OPN, A118, A-Sakol, A132 และ AS1 ที่ทำการศึกษาทั้งหมด มีความไวต่อความร้อนมากกว่าไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่มีการรายงานมาในอดีต

4. ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้ง 3 ซีโรไทป์ คือ ซีโรไทป์โอ ซีโรไทป์เอ และซีโรไทป์เอชัยวัน รวม 6 เสตรน คือ O189, OPN, A118, A-Sakol, A132 และ AS1 มีระดับความทนทานต่อความร้อนที่ไม่ความแตกต่างกันในระดับอุณหภูมิที่ทำการศึกษาทั้ง 6 อุณหภูมิ คือ 50°ซ, 60°ซ, 70°ซ, 80°ซ, 90°ซ และ 100°ซ ดังค่า Z ที่แสดงในตารางที่ 15 (ซ้ำ) ดังนั้น สามารถเลือกใช้ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์หรือเสตรนใดก็ได้เป็นตัวแทนในการศึกษาประสิทธิภาพการทำลายไวรัสในสื่ออื่นๆ เช่น เนื้อสุกร เป็นต้น

ตารางที่ 15 ค่า Z ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในสารละลาย คำนวณจาก 50-100°ซ

ซีโรไทป์	Z-Value[I] (°C)	SE[II]	r^{2} [III]	RMSE[IV]	P value[V]
O189/87	23.26[a]	11.78	0.69	0.60	0.04
OPN/65	21.78[a]	6.54	0.82	0.44	0.01
A118/87	19.11[a]	9.03	0.71	0.70	0.04
A-Sakol/97	19.17[a]	8.38	0.73	0.66	0.03
A132/87	22.79[a]	9.15	0.75	0.53	0.03
AS1/95	18.50[a]	6.51	0.79	0.59	0.02

[I] ตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05

[II] Standard error of regression coefficient

[III] Correlation coefficients

[IV] Root mean square error

[V] ทดสอบ regression coefficient = 0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

1. **de Leeuw, P. W., J. W. Tiessink, and J. G. van Bekkum.** 1980. Aspects of heat inactivation of foot-and-mouth disease virus in milk from intramammarily infected susceptible cows. J Hyg (Lond) **84:**159-72.
2. **Deboosere, N., O. Legeay, Y. Caudrelier, and M. Lange.** 2004. Modelling effect of physical and chemical parameters on heat inactivation kinetics of hepatitis A virus in a fruit model system. Int J Food Microbiol **93:**73-85.
3. **Dekker, A.** 1998. Inactivation of foot-and-mouth disease virus by heat, formaldehyde, ethylene oxide and gamma radiation. Vet Rec **143:**168-9.
4. **Doel, T. R., and P. J. Baccarini.** 1981. Thermal stability of foot-and-mouth disease virus. Arch Virol **70:**21-32.
5. **Forbes, L. S., and G. E. Cottral.** 1969. Heat inactivation of foot-and-mouth disease virus in blood products. Res Vet Sci **10:**98-100.
6. **Juneja, V. K., B. S. Eblen, and H. M. Marks.** 2001. Modeling non-linear survival curves to calculate thermal inactivation of salmonella in poultry of different fat levels. Int J Food Microbiol **70:**37-51.
7. **Kleinbaum, D. G., L. L. Kupper, and K. E. Muller.** 1988. Applied regression analysis and other multivariable methods, 2nd ed. PWS-Kent Pub. Co., Boston, Ms.
8. **Linchongsubongkoch, W., and S. Furuuchi.** The in vitro characteristic of foot and mouth disease virus, Pakchong.
9. **Nettleton, P. F., M. J. Davies, and M. M. Rweyemamu.** 1982. Guanidine and heat sensitivity of foot-and-mouth disease virus (FMDV) strains. J Hyg (Lond) **89:**129-38.
10. **Nuanualsuwan, S., and D. O. Cliver.** 2003. Capsid functions of inactivated human picornaviruses and feline calicivirus. Appl Environ Microbiol **69:**350-7.
11. **Nuanualsuwan, S., and D. O. Cliver.** 2003. Infectivity of RNA from inactivated poliovirus. Appl Environ Microbiol **69:**1629-32.
12. **Nuanualsuwan, S., T. Mariam, S. Himathongkham, and D. O. Cliver.** 2002. Ultraviolet inactivation of feline calicivirus, human enteric viruses and coliphages. Photochem Photobiol **76:**406-10.

13. **Reed, L., and H. Muench.** 1938. A simple method for estimating fifty percent endpoints. Am. J. Hyg. **27:**493.

14. **Russell, A. D., W. B. Hugo, and G. A. J. Ayliffe.** 1999. Principles and practice of disinfection, preservation, and sterilization, 3rd ed. Blackwell Science, Oxford England ; Malden, Ma.

15. **Smith, R. D.** 1995. Veterinary clinical epidemiology : a problem-oriented approach, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton.

16. **Toledo, R. T.** 1991. Fundamentals of food process engineering, 2nd ed. Van Nostrand Reinhold, New York.

17. **Turner, C., S. M. Williams, and T. R. Cumby.** 2000. The inactivation of foot and mouth disease, Aujeszky's disease and classical swine fever viruses in pig slurry. J Appl Microbiol **89:**760-7.

18. **Xiong, R., G. Xie, A. E. Edmondson, and M. A. Sheard.** 1999. A mathematical model for bacterial inactivation. Int J Food Microbiol **46:**45-55.

==========

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ภาคผนวก 1 การศึกษาการใช้แสงอัลตร้าไวโอเลตเพื่อทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

อัตราการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยแสงอัลตร้าไวโอเลตที่ความเข้มแสง 0.9 mW/cm^2

Serotype	D Value [I] (second)	SE [II]	r^2 [III]	RMSE [IV]	P value [V]
O189	38.35 [b]	7.87	0.54	1.18	9.26×10^{-5}
A132	19.42 [a]	0.85	0.97	0.33	3.39×10^{-14}
A-Sakol	23.09 [a,b]	1.74	0.90	0.59	3.39×10^{-14}
AS1	30.22 [b]	2.44	0.86	0.75	2.05×10^{-12}

[I] ตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05

[II] Standard error of regression coefficient

[III] Correlation coefficients

[IV] Root mean square error

[V] ทดสอบ regression coefficient = 0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก 2 การแยกไวรัส (Virus isolation procedure)

1. เนื้อหาทั่วไป

1.1 วัตถุประสงค์

1. เพื่อเพาะเชื้อไวรัส FMD จากตัวอย่างภาคสนาม และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์
2. เพื่อแยกชนิดของเชื้อไวรัส FMD จากตัวอย่างภาคสนาม ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ และอาหารสัตว์
3. เพื่อเก็บเชื้อไวรัสที่ได้จากภาคสนามที่อุณหภูมิ -80°C สำหรับใช้ในการวิจัย r-value การทำ PCR และการทำ seed for vaccine

1.2 ขอบเขตงาน

- การเตรียมอาหารเลี้ยงเซล
- แยกไวรัส
- ดูการเกิด CPE
- การบันทึกข้อมูล
- การ harvest เชื้อไวรัส
- การเก็บเชื้อไวรัส

1.3 บุคคลากรที่เกี่ยวข้อง

- สัตวแพทย์
- นักวิทยาศาสตร์การแพทย์
- นักเทคนิคการสัตวแพทย์

1.4 บทนำ

การเพาะเลี้ยงเซลสำหรับการแยกไวรัสในศูนย์ FMD (ปากช่อง ประเทศไทย) เซลที่ใช้ในการแยกครั้งที่หนึ่งมาจากเซลปฐมภูมิจากไตของลูกแกะซึ่งเตรียมโดยฝ่ายผลิต เพื่อเพิ่มปริมาณของเชื้อไวรัส เซล BHK ถูกนำมาใช้ในการ passage จนกระทั่งเกิด CPE ใน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นไวรัสจะถูกเก็บและยืนยันโดยการทำ ELISA TYPING

2. อุปกรณ์

2.1. เครื่องแก้ว

2.1.1. ปิเปตต์ขนาด 1, 5, 10 และ 20 ml

2.1.2. ขวดแก้วสำหรับการเพาะเลี้ยงเซล

2.1.3. ขวดแก้วสำหรับอาหารเลี้ยงเซล

2.1.4. หลอดทดลอง

2.2. หลอดปั่นแยก

2.3. แท่นใส่หลอดทดลอง

2.4. ปากกาสำหรับทำเครื่องหมาย

2.5. จุกยาง และ pipette aid

3. <u>เครื่องมือและวัสดุ</u>

3.1. clean bench

3.2. ตู้อบ

3.3. กล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted microscope

3.4. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ

3.5. ตู้เย็น

3.6. ตู้แช่แข็ง –20°C และ –80°C

3.7. เครื่องปั่นแยก

3.8. เครื่อง water bath

3.9. เครื่องดูดอากาศ

4. <u>สารเคมี</u>

4.1	การเตรียม Maintenance medium สำหรับเพาะไวรัส	100	ml
	สารละลาย MEM	98	ml
	Normal bovine serum	2	ml
	ยาปฏิชีวนะ	1	ml
	Fungizone	0.5	ml
	สารละลาย 7 % bicarbonate	3	ml
4.2	การเตรียม Fungizone		
	Fungizone (SQUIBB)	50	ml
	น้ำกลั่น	100	ml

- ปั่นให้ละลายจนหมด แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง 0.2 μm
- แจกใส่หลอดทดลอง หลอดละ 1 cc. เก็บที่อุณหภูมิ -20°C

(เตรียมครั้งละ 200 ml แจกหลอดละ 1 ml ได้ 200 หลอด)

4.3	การเตรียมสารละลาย 7% sodium bicarbonate ($NaHCO_3$) :	1	L
	Sodium bicarbonate	70	gm
	น้ำกลั่น	1,000	ml

- กรองด้วยกระดาษกรอง 0.2 μm
- แจกใส่หลอดทดลองหลอดละ 4 ml เก็บที่อุณหภูมิห้อง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4 การเตรียมยาปฏิชีวนะ : 1,000 ml

Kanamycin	10 gm
Penicillin	1.173 gm
Streptomycin	10 gm
ละลายในน้ำกลั่นนึ่ง	1,000 ml

- กรองด้วยกระดาษกรอง 0.2 μm
- เตรียมครั้งละ 1 L
- แจกใส่หลอดทดลองหลอดละ 3 ml เก็บที่ -20°C

5. <u>วิธีการแยกเชื้อไวรัส</u>

การแยกเชื้อไวรัสจากตัวอย่างภาคสนาม (10% w/v epithelial suspension)

5.1 ติดฉลากที่ขวดเพาะเลี้ยงเซลระบุรายละเอียดของเชื้อไวรัส การจำแนกตัวอย่างและวันที่

5.2 ควรเพิ่ม flask เพาะเลี้ยงเซลในชุดเดียวกันด้วยโดยไม่ต้องเพาะเชื้อไวรัส เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุมในการดูเปรียบเทียบ

5.3 ทิ้งอาหารเพาะเลี้ยงเซลไว้ในบีกเกอร์หรือเครื่องดูดอากาศด้วยวิธีปลอดเชื้อ

5.4 บ่มเซล monolayer ที่อยู่ด้านล่างของขวดเพาะเลี้ยงเซลไว้ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 60 นาที เพื่อให้เชื้อไวรัสที่อยู่ในสารแขวนลอยเข้าไปในเซลได้

5.5 เติม Eagle's medium (maintenance medium) ที่ปลอดเชื้อในปริมาณที่พอเพียง (5 ml) ให้ท่วมเซล monolayer

5.6 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37°C

5.7 ตรวจดูการเกิด cytopathic effect (CPE) ทุกวัน

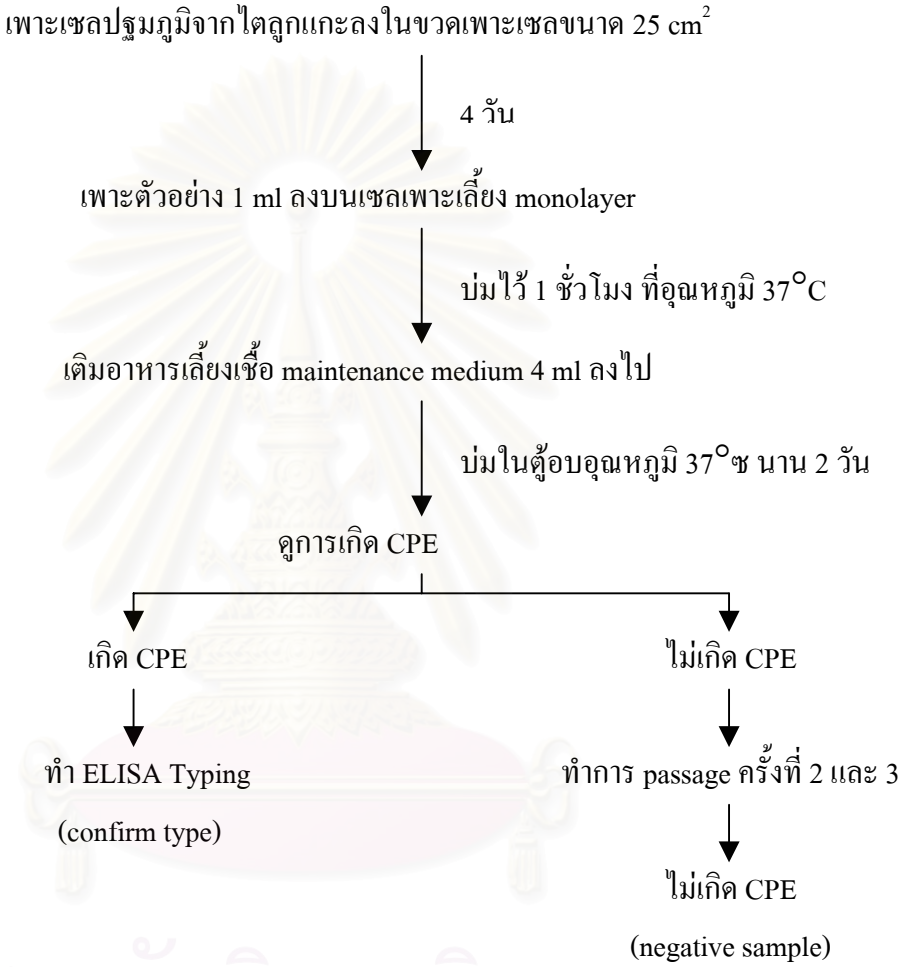
5.8 เมื่อเกิด CPE สมบูรณ์ เก็บของเหลวที่อยู่ส่วนบนของเซลเพาะเลี้ยงลงในหลอดปั่นแยก แล้วนำไปปั่นแยกที่ 2,500 rpm นาน 15 นาที

5.9 เขย่าของเหลวส่วนใสด้านบนที่มีเชื้อไวรัสแล้วใส่ลงในภาชนะที่ปลอดเชื้อ นำไปแบ่งเป็นส่วนๆ เพื่อใช้ในการทดสอบ ELISA Typing สารแขวนลอยที่มีไวรัสที่เหลืออยู่ อาจนำไปผสมรวมกับ glycerol หรือไม่ใช้ร่วมกับ glycerol ก็ได้ ติดฉลากระบุการจำแนก strain ของตัวอย่าง ระดับการทำ passage และวันที่ จากนั้นจึงเก็บตัวอย่างที่ผสมกับ glycerol

5.10 ถ้าการ passage ครั้งแรกไม่เกิด CPE ใน 48 ชั่วโมงหลังทำการเพาะเชื้อไวรัส ให้เก็บของเหลวส่วนบนมาเพาะเชื้อใหม่ (ทำการ passage ครั้งที่สอง) ตามวิธีตั้งแต่ 5.1 ถึง 5.2 แล้วตรวจดูการเกิด CPE ต่ออีก 48 ชั่วโมง

5.11 ถ้าไม่เกิด CPE หลังจากทำการ passage แล้ว 3 ครั้ง สรุปว่าตัวอย่างตั้งต้นไม่มีไวรัส FMD (no virus detected, NVD)

การทดสอบการแยกเชื้อไวรัส



6. <u>เอกสารอ้างอิง</u>

Ferris, N P and Dawson, M.1988. Routine application of enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with complement fixation for the diagnosis of foot and mouth and swine vesicular disease. Vet. Microbiol, 15, 101-209.

Roeder, P L and Le Blanc Smith, P M. 1987. Detection and typing of foot –and- mouth disease virus by enzyme-linked immunosorbent assay : A sensitive, rapid and reliable technique for primary diagnosis. Res. Vet. Sci., 43, 225-323.

ภาคผนวก 3 การทำ Tissue culture เพื่อการแยกไวรัส (Tissue culture for virus isolation)

3. <u>เนื้อหาทั่วไป</u>

1.1 วัตถุประสงค์

4. เพื่อเตรียมเซล monolayer BHK-21 ซึ่งเป็นเซลปฐมภูมิจากไตลูกแกะสำหรับทำการแยกไวรัส
5. เพื่อเก็บเซล BHK-21 ในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -80°C
6. เพื่อ subculture เซล BHK-21

1.2 ขอบเขตงาน

- การเตรียมอาหารเลี้ยงเซล
- subculture เซลที่ใช้ในการแยกไวรัส
- subculture เซลสำหรับ seed cell

1.3 บุคคลากรที่เกี่ยวข้อง

- สัตวแพทย์
- นักวิทยาศาสตร์การแพทย์
- นักเทคนิคการสัตวแพทย์

1.4 บทนำ

Monolayer ของเซลที่เพาะออกมาได้พร้อมๆ กันอาจสามารถเก็บรักษาได้นานขึ้นในระหว่างการแบ่งเซลโดยการเก็บที่ 37°ซ

cell lines ควรถูก subculture ก่อนที่จะมีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนและแยกตัวออกจากผิวหน้าของ cell culture ในการทำ subculture ควรจะแน่ใจว่าเซลยังมีชีวิตอยู่เพื่อลดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนและการเจริญที่ไม่ดีของเซล ไม่ควรทำการ passage เซล stock พร้อมกันทั้งหมดในครั้งเดียว และเซลที่ใช้ควรแบ่งออกอย่างน้อยเป็นสองส่วนเพื่อใช้กับอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน

Versene (ethylenediamine tetracetic acid: EDTA) มักจะถูกใช้ร่วมกับ trypsin ในการแยกเซลสำหรับการ passage โดยที่ Versene เป็น chelating agent ซึ่งทำงานโดยการไปจับกับ divalent ions ของแคลเซียมและแมกนีเซียมซึ่งช่วยในการยึดเกาะระหว่างเซลที่ยังมีชีวิตกับผนังของเครื่องแก้ว ดังนั้น ในการเตรียม Versene จึงต้องใช้ สารละลายของเกลือที่ปราศจากแคลเซียมและแมกนีเซียมเป็นตัวทำละลาย เพื่อป้องกันการเกิด neutralization ของ Versene นอกจากนี้ยังช่วยให้เซลกับผนังเครื่องแก้วไม่แยกออกจากกัน อย่างไรก็ตาม Versene ไม่สามารถใช้งานได้หากไม่นำมารวมกับ trypsin (เอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน) ซึ่งเป็นตัวที่ทำให้เซลแยกออกจากกันได้อย่างรวดเร็ว

แต่ trypsin มีความเป็นพิษต่อเซลมาก สามารถทำให้เซลตายได้ภายใน 1 ชั่วโมง อาจป้องกันได้โดยการเติมซีรั่มลงในอาหารเลี้ยงเซลเมื่อเซลเริ่มมีการแยกออกมาแล้วเพื่อ inactivate เอนไซม์ trypsin

2 <u>อุปกรณ์</u>

2.1. เครื่องแก้ว

2.1.1 ปิเปตต์ขนาด 1, 5 และ 10 ml

2.1.2 ปิเปตต์ชนิด Komagome pipette

2.1.3 ขวดแก้วสำหรับการเพาะเลี้ยงเซล ขนาด 25, 75 และ 150 cm^2

2.1.4 ขวดแก้วสำหรับอาหารเลี้ยงเซล

2.1.5 หลอดทดลอง

2.2 Automatic syringe

2.3 หลอดปั่นแยก

2.4 Cryotube ขนาด 1 และ 5 ml

2.5 แท่นใส่หลอดทดลอง

2.6 ปากกาและเทปสำหรับทำเครื่องหมาย

2.7 pipette aid

2.8 จุกยาง

2.9 rubber stopper

3 <u>เครื่องมือและวัสดุ</u>

3.1 clean bench

3.2 ตู้อบ

3.3 กล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted microscope

3.4 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ

3.5 ตู้เย็น

3.6 ตู้แช่แข็ง –20°C และ –80°C

3.7 เครื่องปั่นแยก

3.8 เครื่อง water bath

3.9 เครื่องสูบอากาศ

4. <u>Reagent</u>

4.1. Growth medium

4.2 Maintenance medium

4.3 Fungizone

4.4 7% sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5 ยาปฏิชีวนะ

4.6 สารละลาย 2 % Trypsin – Versene

4.6.1 การเตรียม stock 1 % Trypsin

Trypsin x 250	1	gm
ละลายในสารละลาย PBS ที่นึ่งแล้ว	100	ml

- ปั่นผสมให้เข้ากันแล้วเก็บที่ 4°ซ ข้ามคืน
- กรองด้วยกระดาษกรอง 0.45 μm
  ถ้าตันให้เปลี่ยนแผ่นใหม่จน trypsin หมด
- กรองด้วยกระดาษกรอง 0.2 μm ที่ฆ่าเชื้อแล้ว เก็บที่อุณหภูมิ -40°C

4.6.2 การเตรียม stock 1 % Versene

EDTA	1	gm
ละลายในสารละลาย PBS	100	ml

- ฆ่าเชื้อโดยการนึ่งที่อุณหภูมิ 110°C นาน 15 นาที เก็บที่ -40°ซ

4.6.3 การเตรียมสารละลาย 0.2 % Trypsin – Versene

- ละลายสารละลาย stock แล้วเตรียมใน clean bench

	100 ml	**1 L**	**2 L**
1 % Trypsin	12.5 ml	125 ml	250 ml
1 % Versene	2.5 ml	25 ml	50 ml
PBS ที่นึ่งแล้ว	85 ml	850 ml	1700 ml
รวม	100 ml	1000 ml	2000 ml

4.7 การเตรียมอาหารเลี้ยงเซล MEM

4.8 การเตรียม PBS (phosphate buffer saline) No Mg^{+} และ Ca^{+} ความเข้มข้น 10x : 5 L

NaCl (sodium chloride) Grade for Analysis	400	gm
KCl (potassium chloride) Grade for Analysis	10	gm
$NaHPO_4$ (di-sodium hydrogen orthophosphate anhydrous)	57.5	gm
Or $NaHPO_4.2H_2O$	70	gm
Or $NaHPO_4.12H_2O$	144.5	gm
KH_2PO_4 (potassium dihydrogen orthophosphate) Anular	10	gm
ละลายในน้ำกลั่น	5,000	ml

- ปั่นละลายจนหมด
- เตรียมเป็นความเข้มข้น 1x โดยนำ PBS 10x 500 ml ผสมกับน้ำกลั่น 4500 ml
  รวมได้ 5 L

- แบ่งใส่ขวด 100 ml นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ รอจนเย็นแล้วนำไปใช้ในการล้างเซลโดยไม่ต้องทำการปรับ pH (pH 6.6-6.8)

5. <u>วิธีการทำ cell passage</u>

5.1 subculture เซลเมื่อเซล monolayer มีการเรียงตัวดีแล้ว

5.2 เทอาหารเลี้ยงเซลใน flask ออก

5.3 ใส่เซล monolayer ในสารละลาย PBS อุ่นที่ปราศจาก Ca^{+} และ Mg^{+} แล้วทำการเคาะ flask เบาๆ ที่ด้านข้างนาน 20 วินาที และทิ้งไว้

5.4 เติมสารละลาย Trypsin – Versene อุ่นที่เพิ่งเตรียมใหม่ลงไปในเซล monolayer 1 ml/25 cm^2 ของ flask แล้วทิ้ง flaskไว้เพื่อให้ Versene – Trypsin ปิดคลุมเซลจนกระทั่งเซลหลุดออกจาก flask ซึ่งจะเกิดได้ดีภายใน 5 นาที แล้วจึงทำการเขย่าให้เซลขึ้นมาอยู่ในสารละลายส่วนบน

5.5 เตรียมอาหารเลี้ยงเซลใหม่ให้เหมาะสม โดยทำการอุ่นล่วงหน้าที่ 37°C ดูดสารละลายส่วนบนที่มีเซลขึ้นมา 3-4 ml ด้วยปิเปตต์ขนาด 10 ml เขย่าขึ้นลงเบาๆ เพื่อให้กลุ่มเซลกระจายเป็นเซลเดี่ยวๆ แล้วนำไปใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อตามปริมาณที่กำหนด

5.6 แบ่งสารแขวนลอยของเซลนี้ตามจำนวนของ flask ที่กำหนดไว้ ตรวจสอบให้แน่ใจว่าเซลเรียงตัวหนาแน่นดี และทำการติดฉลากระบุชนิดเซล passage level และวันที่

5.7 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37°C โดยวาง flask ไว้บนพื้นผิวที่เรียบเสมอกันเพื่อให้เซลเจริญเป็นเซล monolayer ได้

5.8 เก็บบันทึกข้อมูลในการทำ tissue culture passaging

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก 4 การแยกซีโรไทป์ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (ELISA typing)

1. <u>เนื้อหาทั่วไป</u>

1.1 วัตถุประสงค์

เพื่อทำการจำแนก serotype ของตัวอย่างที่สงสัยโดยวิธี ELISA

1.2 ขอบเขตงาน

- เพื่อจำแนก serotype ของตัวอย่างจากภาคสนาม หรือของเหลวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลในการทำการแยกเชื้อไวรัสโดยวิธี ELISA
- รายงานผลไปยัง DLD ศูนย์สัตวแพทย์ หรือห้องปฏิบัติการ

1.3 บุคคลากรที่เกี่ยวข้อง

- สัตวแพทย์
- นักเทคนิคการสัตวแพทย์

1.4 บทนำ

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) เป็น ปฏิกิริยาที่ใช้ในการตรวจจับและวัดปริมาณของเชื้อไวรัส การทดสอบจะใช้ทฤษฎี indirect double antibody sandwich ELISA ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เกิดได้เร็ว มีความจำเพาะสูงและไวต่อการทดสอบ สามารถตรวจจับเชื้อได้แม้มีปริมาณน้อยโดยไม่มีปัญหาเกี่ยวข้องเหมือนกับการใช้วิธี complement fixation (CF) test ในการหาเชื้อไวรัส FMD

indirect double antibody sandwich ELISA ได้รับการรับรองว่าสามารถใช้ในการตรวจจับ antigen ของเชื้อ foot and mouth disease virus ได้ (FMDV ; Roeder and Le Blanc Smith, 1987; Ferris and Dawson, 1988) และยังมีข้อได้เปรียบมากกว่าการทดสอบโดยวิธี complement fixation test (CFT) อีกด้วยคือ

1. ELISA มีความไวต่อการทดสอบมากกว่าวิธี CFT โดย ELISA สามารถตรวจจับปริมาณ antigen ที่น้อยกว่าได้ถึง 500 เท่า
2. ELISA ไม่มีผลกระทบจากการเกิดปฏิกิริยาต่อต้าน complement มาเกี่ยวข้องซึ่งการเกิดปฏิกิริยานี้ทำให้การใช้วิธี CFT ไม่ได้รับการรับรองให้ใช้สำหรับการทดสอบ
3. ELISA มีความเหมาะสมทางเศรษฐกิจในการนำมาใช้กับการจำแนก antiserum อ้างอิงจำเพาะมากกว่า
4. reagent ที่ใช้สามารถนำมาทำเป็น standardized ได้ และยังมีอายุยาวนานกว่า
5. ELISA สามารถให้ผลวิเคราะห์ที่เห็นได้ชัด เชื่อถือได้ ทดสอบใหม่ได้ และปฏิบัติได้ง่าย

จากข้อได้เปรียบนี้ทำให้มีการตกลงกันระหว่างห้องปฏิบัติการทั่วไปให้ใช้ standard level assay ของ ELISA ในการทดสอบเพื่อตรวจจับ FMDV antigen

2. <u>อุปกรณ์</u>

2.1. Control antigens

Strain ของเชื้อ foot and mouth disease virus type O 189/87, type A 132/87 และ type Asia1/85 ที่เลี้ยงใน BHK-21 monolayer cell ของเหลวจากการเพาะเลี้ยงเซลถูกเก็บเมื่อเกิด cytopathic effect (CPE) สมบูรณ์ ของเหลวที่มีเชื้อไวรัสจะทำให้บริสุทธิ์โดยการนำไปปั่นแยก และทำให้เชื้อ inactivate ด้วยการเติม 2% BEI และ 20% (V/V) glycerine แล้วแบ่งลง vial หรือ cryotube จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่ -20 ºC เป็น stock antigen

2.2. ตัวอย่างจากภาคสนาม

เก็บตัวอย่างจากเยื่อบุลิ้น หรือเนื้อเยื่อระหว่างกีบ แล้วนำไปเตรียมเป็น 10% suspension โดยวิธีการสกัดเนื้อเยื่อทำได้ตามตารางที่ 1

2.3. การเตรียม Coating buffer

0.05 M Carbonate bicarbonate buffer pH 9.5

Na_2CO_3 (anhydrous)	1.59	gm
$NaHCO_3$	2.93	gm

ทำให้เป็น 1 L ในน้ำกลั่น

2.4. การเตรียม PBS สำหรับ ELISA washing dilution buffers

2.4.1 การเตรียม stock PBS A 10X : 5 L

NaCl (sodium chloride) Grade for Analysis	400	gm
KCl (potassium chloride) Grade for Analysis	10	gm
$NaHPO_4$ (di-sodium hydrogen orthophosphate anhydrous)	57.5	gm
KH_2PO_4 (potassium dihydrogen orthophosphate) Anular	10	gm
ละลายในน้ำกลั่น	5000	ml

2.4.2 การเตรียม Stock $MgCl_2$ 10X

$MgCl_2 .6H_2O$	5	gm
ละลายในน้ำกลั่น	500	ml

2.4.3 การเตรียม Stock $CaCl_2$ 10X

$CaCl_2$ (anhydrous)	6.65	gm
ละลายในน้ำกลั่น	500	ml

การเตรียม washing buffer 10 L

- เตรียม PBS A 1000 ml.
- ผสมในน้ำกลั่น 7000 ml
- เจือจาง 10X $CaCl_2$ 100 ml ในน้ำกลั่น 900 ml
- เติมสารละลาย $CaCl_2$ ลงในสารละลาย PBS A
- เจือจาง 10X $MgCl_2$ 100 ml ในน้ำกลั่น 900 ml
- เติมสารละลาย $MgCl_2$ ลงในสารละลายผสมของ PBS A และ $CaCl_2$
- ปรับค่า pH ให้เป็น 7.3

2.5. การเตรียม ELISA diluent (PBST + 3% Bovine serum albumin) : 500 ml

- เตรียม Bovine serum albumin 15 G. (3%, W/V)
- ละลายในน้ำกลั่น 350 ml
- เติม 10X PBS A 50 ml
- เจือจาง 10X $CaCl_2$ 5 ml ในน้ำกลั่น 45 ml
- เติมสารละลาย $CaCl_2$ ลงไปผสมกับสารละลายด้านบน
- เจือจาง 10X $MgCl_2$ 5 ml ในน้ำกลั่น 45 ml
- เติมสารละลาย $MgCl_2$ ลงไปผสมกับสารละลายด้านบน
- เติม NaCl 10 G.
- เติม Tween 20 0.25 ml
- เติม 1% phenol red 1 ml
- ปรับค่า pH ให้เป็น 7.4 - 7.6

2.6. การเตรียม Citrate – Acetate buffer

2.6.1 การเตรียม Stock 1 M Citric acid

Citric acid	20	gm
น้ำกลั่น	100	ml

2.6.2 การเตรียม Stock 1 M Sodium acetate

Sodium acetate	8.2	gm
น้ำกลั่น	100	ml

ใช้ 1 M Citric acid ปริมาณเล็กน้อย (ประมาณ 4 ml) และ 1 M Sodium acetate ผสมแล้วปรับ pH ให้เป็น 5.6

2.7. การเตรียม Chromogen/TMB Substrate solution (3,3’5,5’ Tetramethyl benzidine)

2.7.1 การเตรียม stock 1%

TMB substrate	0.1	gm

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DMSO (Dimethylsulfoxide)	10	ml.

- แบ่งเป็นส่วนๆ ปริมาณ 1 ml แล้วเก็บในที่อุณหภูมิ 4 ºC

2.7.2 การเตรียมสารละลาย substrate

- ส่วน A

น้ำกลั่น	9	ml.
1% TMB	0.1	ml.
Citric acetate buffer	1	ml.

- ส่วน B

H_2O_2 (30% W/V)	25	µl.
ละลายให้เข้ากันในน้ำกลั่น	400	µl.

- นำสารละลายส่วน B 25 µl เติมลงในสารละลายส่วน A แล้วนำไปใช้ทันที

2.8. การเตรียม Stopping solution

1 N. H_2SO_4 :

Conc. H_2SO_4 (36 N)	1	ml.
ละลายในน้ำกลั่น	35	ml.

2.9. การเตรียมยาฆ่าเชื้อ

สารละลาย 4% Na_2CO_3 (W/V)

สารละลาย 0.5% Iodophore (V/V)

สารละลาย 10% Citric acid (W/V)

3. <u>เครื่องมือและวัสดุ</u>

3.1. Photometer : มี interference filter 450 nm

3.2. Orbital Shaker

3.3. Washer สำหรับ plate ขนาด 96 หลุม หรือ Handi-wash microplate washer หรืออาจใช้ขวดพลาสติกหรือถุงขนาดใหญ่พอเหมาะ

3.4. ปิเปตต์และ tips ขนาด 5 – 50 µl และ 50 – 250 µl และ eppendorf ขนาด 1 - 20 µl, 20 – 200 µl และ 200 – 1000 µl

3.5. เครื่องทำน้ำบริสุทธิ์

3.6. microplate ชนิดก้นหลุมแบน ขนาด 96 หลุม

3.7. ตู้เย็น อุณหภูมิอยู่ในช่วง +4 ºC ถึง +6 ºC

3.8. ตู้แช่แข็ง อุณหภูมิอยู่ในช่วง –18 ºC ถึง –22 ºC

3.9. incubator อุณหภูมิอยู่ในช่วง +35 ºC ถึง +39 ºC

3.10.เครื่อง water bath อุณหภูมิอยู่ในช่วง +35 ºC ถึง +39 ºC

3.11.เครื่องวัดค่า pH

3.12.เครื่องแก้ว และพลาสติก

- ขวดมีฝาปิดขนาด 50, 250, 500 และ 1,000 ml
- Flask ขนาด 1000 – 5000 ml
- กระบอกตวงที่มีขีดบอกปริมาตรขนาด 100 – 5,000 ml
- ปิเปตต์ที่มีขีดบอกปริมาตรขนาด 1 – 10 ml พร้อมจุกยาง
- ขวดเก็บสารที่มีฝาปิดขนาด 10 – 20 ml
- หลอดเจือจางขนาด 2 – 5 ml และแท่นวางหลอด
- ภาชนะสำหรับบรรจุ wash fluid พร้อมด้วย tap และที่ดูด wash fluid จากภาชนะนี้ไปยัง plate washer หรือขวดทีใช้สำหรับการล้าง

3.13.Cryopreservation Vials ชนิด polypropylene และมี screw cap ที่มี thread และ O-ring (1 – 5) พร้อมด้วยแท่นวาง

3.14.Vortex mixer

3.15.Weighing Balance

3.16.เครื่องจับเวลา

3.17.ผ้าเช็ดมือที่ซับน้ำ

3.18.ปากกาสำหรับทำเครื่องหมายและป้ายฉลาก

4. <u>ELISA Reagent</u>

4.1. การเตรียม Trapping antibodies

เตรียม Rabbit serum anti FMDV type O, A และ Asia1 โดยการฉีด antigen 146 S บริสุทธิ์ของแต่ละ type ที่ผสมกับ Complete Freund adjuvant เข้ากล้ามเนื้อของกระต่าย เชื้อที่ใช้ในการฉีดประกอบด้วย 40 µg ของ 146 S antigen ต่อ 1 ml ต่อการฉีดในกระต่าย 1 ตัว ทำการ boosted กระต่ายที่ 28 วันหลังการฉีดครั้งแรกโดยใช้ 20 µg ของ 146 S antigen ที่ผสมกับ Incomplete Freund adjuvant ให้เก็บเลือดหลังการ boosted 10 วัน แล้วแยกเลือดไว้เป็นรายตัว นำไปทำการไตเตรตเพื่อหาการเจือจาง ที่เหมาะสมในการนำไปใช้ทำ ELISA assay

การเก็บ Rabbit anti FMDV serotype O, A และ Asia1 จะทำการเก็บที่อุณหภูมิ -20 ºC

4.2 การเตรียม Detecting antibodies

เตรียม Guinea pig serum anti FMDV type O, A และ Asia1 โดยการฉีด 20 µg ของ 146 S antigen ที่ผสมกับ Complete Freund adjuvant เข้ากล้ามเนื้อหนูตะเภาครั้งเดียว เก็บเลือดที่ 28

วันหลังการฉีด นำเลือดไปทำการไตเตรตเพื่อหาการเจือจางที่เหมาะสม และทำการทดสอบการเกิด cross reaction ระหว่าง type O, A และ Asia1

การเก็บ Guinea pig anti FMDV type O, A และ Asia1 จะทำโดยการทำ pre-blocked กับ normal, non-immune bovine serum ก่อน แล้วทำการเก็บที่อุณหภูมิ -20 ºC

4.4 การเตรียม Control Virus

เตรียมเชื้อไวรัสโดยการทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ FMDV type O, A และ Asia1 ทำการ inactivate ด้วย BEI และ glycerinate (20% v/v) แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 ºC

4.5 การเตรียม Control normal serum

ใช้ serum ของกระต่ายและหนูตะเภาปกติซึ่งจะไม่มีภูมิคุ้มกันเป็นกลุ่มควบคุมในการวิเคราะห์

4.7 การเตรียม Anti-species conjugate

ใช้ Horseradish peroxidase-conjugate rabbit anti-guinea pig immunoglobulin ในการทดสอบวิเคราะห์ โดย Conjugate จะถูกทำการ pre-blocked ด้วย normal, non-immmmune bovine serum (50% v/v) นาน 15 นาทีก่อนนำมาใช้

4.8 การเตรียม Substrate

Hydrogen peroxide (stock 30%) ทำการเก็บที่อุณหภูมิ 4 ºC

4.7 การเตรียม Chromogen

0.01% Tetramithyl benzidine ;TMB (stock 1% ใน DMSO; Dimethyl sulfoxide) ทำการเก็บที่อุณหภูมิ 4 ºC

4.8 การเตรียม Chromogen buffer

Citrate-Acetate buffer pH 5.6 ทำการเก็บที่อุณหภูมิ 4 ºC

4.9 การเตรียม Coating buffer

0.05 M Carbonate-bicarbonate buffer pH 9.5 ทำการเก็บที่อุณหภูมิ 4 ºC

4.10 การเตรียม ELISA washing buffer

1X PBS A ทำการเก็บที่อุณหภูมิห้อง

4.11การเตรียม Stopping solution

1 N H_2SO_4 ทำการเก็บที่อุณหภูมิห้อง

5. <u>วิธีการทำ typing</u>

Coat plate ด้วย rabbit antiserum ที่ละลายใน coating buffer สำหรับ reagent อื่นให้ละลายใน ELISA Diluent (Blocking buffer) ถ้าไม่มี orbital shaker และไม่ได้ทำการอุ่นข้ามคืน ให้ทำการเคาะเบาๆ ที่มุมของ plate ทุก 20 นาที เพื่อให้ reagent กระจายทั่ว

5.1. การ coat plate

- coat plate ด้วย rabbit antiserum ที่ละลายใน coating buffer
- เตรียม rabbit anti FMD viruses O, A, Asia1 และ serum กระต่ายปกติ เจือจาง 1:5000 ใน coating buffer (Carbonate/bicarbonate pH 9.5)

ขั้นแรก : เตรียม 1:250 โดยเติม rabbit anti FMD viruses O, A, Asia1 และ serum กระต่ายปกติ 2 µl ลงใน coating buffer 500 µl แล้วผสมให้เข้ากันดี

ขั้นที่สอง : เตรียม 1:20 โดยเติม 100 µl ของสารละลายจากขั้นแรกลงใน coating buffer 2 ml (ต่อ 1 plate) เพื่อทำให้เป็นสารละลายเจือจาง 1:5000

หยอด rabbit anti FMD viruses ลงในแต่ละหลุมของ plate แล้วเคาะ plate เบาๆ โดยให้เติม

Type O	ลงในแถว A และ E
Type A	ลงในแถว B และ F
Type Asia1	ลงในแถว C และ G
Serum กระต่ายปกติ	ลงในแถว D และ H

- ปิด plate ด้วยฝาปิดและวางไว้บน orbital shaker ใน incubator ที่อุณหภูมิ 37 ºC นาน 1 ชั่วโมง หรือไว้ใน moisture chamber ที่อุณหภูมิ 4 ºC ข้ามคืน
- ELISA plate ที่ coat แล้วจะทำการล้างด้วย phosphate buffer saline washing buffer 5 ครั้ง

5.2. การเตรียมเชื้อไวรัส

5.2.1 การเตรียมเชื้อไวรัสกลุ่มควบคุม

เตรียมเชื้อไวรัสใน microtube ทำการเจือจาง antigen control ที่ 1:5 ตามผลจากการไตเตรตด้วย ELISA diluent ซึ่งประกอบด้วย 3% BSA ใน PBST (PBS และ tween 20)

ตัวอย่างเช่น ผสมเชื้อไวรัส 100 µl กับ diluent 400 µl แล้วทำการเจือจาง 2 เท่า 3 ครั้ง

5.2.2 ตัวอย่างภาคสนามและตัวอย่างจากการแยกเชื้อไวรัส

- ตัวอย่างภาคสนาม : เริ่มเจือจางที่ 1:1 โดยเติมเชื้อไวรัสลงในหลอดแรก 500 µl แล้วทำการเจือจาง 2 เท่า 3 ครั้ง
- ตัวอย่างการแยกเชื้อไวรัสจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ : เริ่มเจือจางที่ 1:5 โดยเติมตัวอย่างจากการแยกเชื้อไวรัส 100 µl ลงใน ELISA diluent 400 µl แล้วทำการเจือจาง 2 เท่า 3 ครั้ง
- เติม ELISA diluent 50 µl ลงในหลุมตามคอลัมน์ที่ 4, 8 และ 12
- เติมเชื้อไวรัสกลุ่มควบคุมและเชื้อไวรัสกลุ่มตัวอย่าง

- ปิด plate ด้วยฝาปิดแล้ววางบน orbital shaker ใน incubator ที่อุณหภูมิ 37 ºC นาน 60 นาที แล้วทำการล้าง plate ด้วย PBS washing buffer 5 ครั้ง

5.3. การเตรียม Guinea pig anti FMD

- การเตรียม Guinea pig anti FMD viruses type O, A, Asia1 และ normal guinea pig serum (GPS) โดยเจือจางกับ ELISA diluent 1:1000 ตัวอย่างเช่น ใน 1 plate จะใช้ GPS 2 µl + diluent 2000 µl

- หยอด serum ที่เจือจางแล้วลงในแต่ละหลุมของ plate โดยให้เติม

Type O	ลงในแถว A และ E
Type A	ลงในแถว B และ F
Type Asia1	ลงในแถว C และ G
Serum หนูตะเภาปกติ	ลงในแถว D และ H

- วาง plate ลงบน orbital shaker ที่อยู่ใน incubator ที่อุณหภูมิ 37 ºC นาน 30 นาที แล้วล้างด้วย PBS washing buffer 5 ครั้ง

5.4. การเตรียม Anti-species conjugate

- นำ Horseradish peroxidase-conjugate rabbit anti-guinea pig immunoglobulin ไปทำการ pre-blocked conjugate ด้วย Fetal Bovine Serum (FBS) ซึ่งเป็น non-immune serum 1:1 แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนานอย่างน้อย 15 นาที ตัวอย่างการเตรียม conjugate สำหรับ 1 plate จะใช้สารละลาย 6 ml โดยเตรียมสารละลายจาก conjugate block 2 µl และ FBS 2 µl ที่อุณหภูมิห้องนานอย่างน้อย 15 นาทีแล้วผสมกับ diluent 6 ml (conjugate ที่ใช้ใช้การเจือจางที่ 1 :3000)

- หยอดสารละลาย conjugate ที่เจือจางแล้วลงในแต่ละหลุมของ plate

- วาง plate ลงใน incubator ที่อุณหภูมิ 37 ºC นาน 30 นาที แล้วล้างด้วย PBS washing buffer 6 ครั้ง

5.5. การเตรียม Substrate/Chromogen Solution

การเตรียมสารละลาย substrate สำหรับ 1 plate

- ส่วน A

น้ำกลั่น	9	ml.
1% TMB	0.1	ml.
Citric acetate buffer	1	ml.

- ส่วน B

H_2O_2 (30% W/V)	25	µl.
ละลายให้เข้ากันในน้ำกลั่น	400	µl.

- นำสารละลายส่วน B 25 µl เติมลงในสารละลายส่วน A แล้วนำไปใช้ทันที
- หยอดสารละลาย TMB 100 µl ลงในแต่ละหลุมของ plate
- ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยานาน 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการหยอด 1 N H_2SO_4 50 µl ลงในแต่ละหลุมตามลำดับ
- อ่านผลของ plate ด้วยเครื่อง spectrophotometer (OD) ที่ความยาวคลื่น 450 nm บน Titertek Multislan (Flow Laboratories)
- ผลบวกจะอ่านจากหลุมที่มีค่า OD มากกว่า 0.2 เมื่อตัดค่า background ออก

6. <u>การแปลผล</u>

6.1. การแปลผลโดยการใช้เครื่องอ่าน microplate

Plate ที่จะอ่านผลจะต้องมีการเกิดสีที่หลุม antigen control เพื่อบ่งชี้ว่ามีการ coat plate ด้วย antisera เกิดขึ้นจริง ทำการคำนวณหาค่าเฉลี่ยการเกิดปฏิกิริยา background โดยการรวมค่า optical density (OD) values ที่หลุมแถวที่ 4, 8 และ 12 แล้วหารด้วย 3 การเติม OD value จะขึ้นกับ reagent ของแต่ละหลุม และไม่จำเพาะกับปฏิกิริยาที่เกิดระหว่าง antigen และ antiserum

ตัวอย่างการตัด OD ของ background ในแต่ละ serotype ออกจากค่า OD ที่แท้จริงเพื่อให้มีค่า OD value ที่ถูกต้อง เช่น type O แถว A ให้รวม OD value ลงในหลุม A4, A8 และ A12 จากนั้นทำการหาร 3 จะได้ค่าเฉลี่ยของ background OD สำหรับแถว A นำค่าที่คำนวณได้นี้ไปหักออกจากค่า OD ที่วัดได้จริงของแถว A ทำเช่นกันในแถวอื่นๆ ค่าเฉลี่ยที่ได้จากแต่ละกลุ่มของ 3 หลุมนี้สามารถนำไปใช้เป็นค่าเฉลี่ยใน antiserum serotype อื่นได้

6.2. การแปรผลโดยการดูจากตัวอย่าง

ถ้าค่าเฉลี่ย OD เกิน 0.2 จะบ่งชี้ว่าผลเป็นบวกและจะสามารถอ่าน serotype นี้ได้ ถ้าค่าใกล้เคียง 0.2 ควรดูด้วยความระวังก่อนจะทำการสรุปผลการทดสอบและอาจต้องทำการยืนยันผลด้วยการทดสอบอื่นเพิ่มเติม หรืออาจใช้การเพิ่มปริมาณในเซลเพาะเลี้ยงแล้วทดสอบกับของเหลวที่อยู่ส่วนบนของเซลเพาะเลี้ยงที่ใหม่อยู่

6.3. การแปลผลโดยการดูด้วยตาเปล่า

ต้องดูการเกิดสี background ในคอลัมน์ที่ 4, 8 และ 12 ของแถว A ถึง H การเกิดสีของ background ที่เกิดมากกว่าปกติสำหรับ 3 หลุมนี้ของแต่ละแถวจะบ่งชี้ถึงการเกิดผลบวก ซึ่งการอ่านผลนี้สามารถอ่านได้กับ serotype อื่นตามการหยอดสารลงใน plate แต่ไม่ควรยึดการอ่านผลแบบนี้เพียงอย่างเดียวในการแปลผลแค่ 1 – 2 หลุม เพราะอาจจะเกิด false positive ได้ในกรณีที่ล้าง plate ไม่เพียงพอ

ถ้ามี antigen อยู่ในตัวอย่างมากก็จะเกิดสีได้มากทำให้สีเข้ม และถ้ามี antigen อยู่น้อยก็จะเกิดสีจางระวังการสรุปการเกิดผลบวกในกรณีที่ใช้ตัวเทียบที่มีสีจางเป็นเกณฑ์ ซึ่งอาจต้องทำการทดสอบใหม่หรือทำการเพิ่มปริมาณในเซลเพาะเลี้ยงแล้วทดสอบกับของเหลวที่อยู่ส่วนบนของเซลเพาะเลี้ยงที่ใหม่อยู่

6.4. ข้อสำคัญควรจำ

วิธีการทดสอบด้วย ELISA ถือว่าทำได้ง่ายมากและเป็นมาตรฐาน แต่อย่างไรก็ตามก็ต้องมีการปฏิบัติให้ถูกต้องเพื่อที่จะได้ประสบความสำเร็จในการทดลอง นั่นคือ

6.4.1 ต้องมีสมาธิในการปฏิบัติทุกขั้นตอน เช่น แน่ใจว่าใช้ reagent ในแต่ละขั้นตอนถูกต้อง เติม antiserum ใส่ในหลุมถูกต้อง

6.4.2 เปลี่ยน tips ทุกครั้งและใช้ reagent ที่เตรียมใหม่

6.4.3 ผสม reagent ให้เข้ากันดีและไม่มีการผสมข้าม serotype

6.4.4 ใช้ tips ของปิเปตต์แยกกันในการทดสอบต่าง antigen ตัวอย่าง

6.4.5 ใช้ antigen ที่ยังมีความสามารถทำให้ติดเชื้อได้อยู่ และใช้ด้วยความระวัง

6.4.6 รางที่ใช้ใส่ reagent ควรล้างด้วยน้ำกลั่นทันทีหลังการใช้

6.4.7 ล้าง plate อย่างละเอียดหลังการ incubate ทุกขั้นตอน โดยเฉพาะหลังจากการเติม conjugate และก่อนการเติม TMB

6.4.8 ต้องแน่ใจว่า TMB ถูก activate ด้วย hydrogen peroxide และนำมาใช้ทันที

6.4.9 เติม TMB และ 1 N H_2SO_4 ลงใน plate ตามลำดับเพื่อให้แน่ใจว่าเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาใกล้เคียงกันในแต่ละหลุม

6.4.10 หลีกเลี่ยงการจับส่วนล่างของ plate เพื่อไม่ให้มีรอยนิ้วมือไปรบกวนการมองเห็น

6.4.11 ไม่ควรใช้ tips ของปิเปตต์ที่ใช้ในการ conjugate ซ้ำ

==========