

วารสาร



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 61 ฉบับที่ 1 มกราคม - มีนาคม 2562 Vol. 61 No. 1 January - March 2019

ISSN 0125-684X

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จัดทำโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เพื่อเผยแพร่ผลงานวิชาการด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ทุกสาขา

เจ้าของ	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข	
ที่ปรึกษาด้านบริหาร	นพ.โอภาส การย์กวินพงศ์ นพ.สมฤกษ์ จิงสมาน	นพ.พิเชฐ บัญญัติ
ที่ปรึกษาด้านวิชาการ	ศ.เกียรติคุณ นพ.ประเสริฐ ทองเจริญ พญ.มยุรา กุสุมภ์ ภญ.ดร.จงดี ว่องพินัยรัตน์ ภญ.ดร.สุมล ปวีตรานนท์ นางธีรนาถ จิระไพศาลพงศ์	ภญ.อมรา วงศ์พุทธพิทักษ์ นางพิมพ์ใจ นัยโกวิท ภญ.สุภัทรา อิมเอิบ ดร.ปนัดดา ชิลวา
บรรณาธิการ	ดร.บุษราวรรณ ศรีวรรณะ	
รองบรรณาธิการ	ดร.เดือนฉนอม พรหมชาติแก้ว นายสุธน วงษ์ชัย ดร.อภิวัฏ ธวัชสิน	นางกนกพร อธิสุข นางวิชุดา จริยะพันธุ์ นางสาวมาลินี จิตตกานต์พิชัย
คณะบรรณาธิการ	ศ.เกียรติคุณ ดร.พิไลพันธ์ พุฒวัฒน์ ศ.ดร.นพ.ประเสริฐ เอื้อวรากุล ศ.พญ.พรณี ปิติสุทธิธรรม รศ.ดร.พญ.พินทิพย์ พงษ์เพชร ผศ.สุชาดา ไชยสวัสดิ์ ดร.दनัย ทิวาเวช ภญ.สุวรรณา จารุสุข ดร.นพ.ปฐม สวรรค์ปัญญาเลิศ ดร.สลักจิต ชูติพงษ์วิเวท นางพรรษา ไชยวานิช ดร.อุษาวดี ถาวร นางสาวพรรณทิพย์ ตีัยพันธ์ นายศิริ ศรีมนโรด ภญ.ดร.สุภาณี ดวงธีรปรีชา ดร.ปิยะดา หวังรุ่งทรัพย์ ดร.วันทนา ปวีณกิตติพร ภญ.ดร.ดวงเพ็ญ ปัทมดิลก ภญ.ดร.ไตรพร วัฒนนถ	มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยมหิดล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี มหาวิทยาลัยนเรศวร มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ สำนักงานปลัดกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
ฝ่ายจัดการ	นางสาวน้ำฝน น้อยประเสริฐ นางสาวประสาน จุลวงษ์	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
กำหนดออก อัตราสมาชิก	ราย 3 เดือน ในประเทศปีละ 200.- บาท ต่างประเทศปีละ 50.00 เหรียญสหรัฐอเมริกา	
สำนักงานวารสาร	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 88/7 ซอยติวานนท์ 14 ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000 โทร. 0-2951-0000 โทรสาร 0-2951-1297	
พิมพ์ที่	หจก. อรุณการพิมพ์ 457/6-7 ถนนพระสุเมรุ แขวงบวรนิเวศ เขตพระนคร กรุงเทพฯ 10200 โทร. 0-2282-6033-4	

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 61 ฉบับที่ 1 มกราคม - มีนาคม 2562

Vol. 61 No. 1 January - March 2019

สารบัญ

หน้า

นิพนธ์ต้นฉบับ

- การตรวจสอบสายพันธุ์ย่อยของเชื้อ BCG Tokyo 172-1 ในวัคซีนป้องกันวัณโรค
ที่ผลิตในประเทศไทย โดยวิธี Real-Time PCR 1
- วิริยามาศย์ เจริญคุณธรรม สมปอง ทรัพย์สุทธิภาสน์ นวลจันทร์ วิจักขณ์จินดา และสุภาพร ภูมิอมร

รายงานจากห้องปฏิบัติการ

- การสร้างเซลล์ลูกผสม Dendritic cells กับเซลล์มะเร็งเต้านมในหลอดทดลอง
เพื่อกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกัน 18
- สุภาพร สุภารักษ์ ตะวันฉาย แสงเจริญ และบุษราวรรณ ศรีวรรณะ
- การตรวจสอบสายพันธุ์ของเชื้อเดงกีด้วยวิธีอนุชนิโมเลกุลที่สถาบันบำราศนราดูร 31
- สุนนมาลย์ อุทัยมกุล รวี นิธิยานนทกิจ สุภัทรา เดชสถิตย์ ศาริณี เรียวแรง
ปฐมมา สุทธา และวิศัลย์ มูลศาสตร์
- การวิเคราะห์สิ่งแปลกปลอมในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทเส้น 40
- ชั้นทอง เพ็ชรนอก ก่อเกียรติ ศาสตรินทร์ และกนกวรรณ ตุ่นสกุล

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 61 ฉบับที่ 1 มกราคม - มีนาคม 2562

Vol. 61 No. 1 January - March 2019

CONTENTS

Page

Original Articles

- Investigation of BCG Tokyo 172-1 Subpopulations in Tuberculosis Vaccine Produced in Thailand using Real-Time PCR** 1
Wereyarmarst Jaroenkunathum Sompong Sapsutthipas Nuanjun Wichukchinda and Supaporn Phumiamorn

Laboratory Findings

- In vitro* Generation of Dendritic Cell - Breast Cancer Cell Hybrids For Induction of Cellular Immunity** 18
Supaporn Suparak Tawanchai Sangcharoen and Busarawan Sriwanthana
- Molecular Laboratory Testing for Dengue Serotypes at Bamrasnaradura Infectious Diseases Institute** 31
Sumonmal Uttayamakul Ravee Nitiyanontakij Supatsa Dedsatit Sarinee Reawrang Patama Suttha and Visal Moolasart
- Analysis of Light Filth in Noodle Products** 40
Kuntong Pednog Kokeiat Sarttarin and Kanogwan Toonsakool



บรรณาธิการแถลง



วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เป็นสื่อสำหรับเผยแพร่องค์ความรู้และนวัตกรรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และสาธารณสุข ที่เกิดจากงานวิจัยหรืองานประจำมาต่อเนื่องนานกว่า 60 ปี ปัจจุบันได้รับการจัดอยู่ในวารสารกลุ่มที่ 2 จากศูนย์ดัชนีการอ้างอิงวารสารไทย (Thai Journal Citation Index Center) และบทความที่เผยแพร่ในวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์นั้น ความถูกต้องทั้งหมดเป็นความรับผิดชอบของผู้นิพนธ์

บรรณาธิการได้รับแจ้งแก้ไขความถูกต้องของตารางแสดงผลการศึกษาของบทความเรื่อง การใช้ Accuracy Profile ตรวจสอบความถูกต้องของแผ่นทดสอบ 3M Petrifilm™ Rapid Yeast and Mold Count Plate สำหรับการตรวจหาปริมาณยีสต์และราในเครื่องดื่ม ที่ตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปีที่ 59 ฉบับที่ 3 กรกฎาคม-กันยายน 2560 หน้า 152-170 ซึ่งได้ดำเนินการปรับแก้ดังปรากฏในวารสารออนไลน์ฉบับที่บทความดังกล่าวตีพิมพ์แล้ว

บรรณาธิการจึงขอเรียนแจ้งผู้อ่านวารสารเรื่องดังกล่าวมา ณ ที่นี้

บุษราวรรณ ศรีวรรณะ

บรรณาธิการวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

คำแนะนำสำหรับผู้นิพนธ์

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ รับผิดชอบเผยแพร่บทความด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่เกี่ยวกับ ชีววัตถุ เครื่องมือแพทย์ เครื่องสำอาง ยาที่เป็นเภสัชเคมีภัณฑ์ อาหารและเครื่องดื่ม สมุนไพร ยาเสพติด วัตถุอันตราย รังสี โรคติดต่อ โรคไม่ติดต่อ พะหรณ์นำโรค การประเมินความเสี่ยง การพัฒนาเทคโนโลยีวิจัยทางคลินิก ระบบบริหารจัดการคุณภาพ และอื่นๆ โดยตีพิมพ์ทุกสามเดือน ปีละสี่ฉบับ ได้แก่ 1) ฉบับเดือนมกราคม-มีนาคม 2) เดือนเมษายน-มิถุนายน 3) เดือนกรกฎาคม-กันยายน และ 4) เดือนตุลาคม-ธันวาคม

ประเภทของบทความ

บทความสามารถเขียนได้ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษโดยแบ่งบทความออกเป็นประเภทต่าง ๆ ดังนี้

1. นิพนธ์ต้นฉบับ

เป็นรายงานผลการศึกษาวิจัย พัฒนาเทคโนโลยี หรือพัฒนาระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการที่มีการวางรูปแบบและดำเนินการศึกษาวิจัยพัฒนา ตลอดจนวิเคราะห์ข้อมูลอย่างถูกต้องตามหลักวิชาการ

2. รายงานจากห้องปฏิบัติการ

เป็นรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการที่มีผู้นำตัวอย่างมาส่งตรวจ หรือรายงานผลการดำเนินงานที่เป็นงานประจำ

3. กรณีศึกษา

เป็นรายงานผลการศึกษาโดยใช้กลุ่มตัวอย่างไม่มากนัก ทั้งนี้อาจอยู่ภายใต้ตัวแปรที่ควบคุมได้ หรือสภาพแวดล้อมที่ไม่สามารถควบคุมได้ เพื่อทดสอบทฤษฎีหรือทำความเข้าใจถึงปรากฏการณ์บางอย่าง

4. บทความปริทัศน์

เป็นบทความที่ได้จากการทบทวนหรือรวบรวมความรู้วิชาการเรื่องใดเรื่องหนึ่งจากตำรา วารสารวิชาการหรือหนังสือต่างๆ มาวิเคราะห์และเรียบเรียง และควรมีความเห็นของผู้รวบรวมเพิ่มเติมด้วย เพื่อให้ได้บทความใหม่ที่มีความชัดเจนในประเด็นต่างๆ

5. บทความทั่วไป

เป็นบทความทางวิทยาศาสตร์ที่ไม่ลงลึกในรายละเอียดมากนัก หรือเป็นบทความเกี่ยวกับระบบที่สนับสนุนการดำเนินงานเพื่อให้เข้าใจหรือสามารถดำเนินการได้อย่างเป็นระบบ เช่นรายงานการพัฒนา

ระบบสนับสนุนการทำงาน การพัฒนาระบบเทคโนโลยีสารสนเทศ การพัฒนาระบบบริหารจัดการคุณภาพ ตามมาตรฐานสากล หรืออาจเป็นการเขียนถึงเรื่องราวที่อยู่ในความสนใจของประชาชน เป็นต้น

6. จดหมายถึงบรรณาธิการ

เป็นบทความที่ผู้อ่านวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์เขียนถึงบรรณาธิการหรือเจ้าของบทความ ที่ตีพิมพ์ในวารสารฯ แล้ว ทั้งนี้เพื่อเสนอแนะหรือแสดงข้อคิดเห็นเกี่ยวกับวารสารฯ หรือบทความนั้นๆ

7. สารติดต่อด้าน

เป็นรายงานวิจัยที่ดำเนินการแล้วเสร็จซึ่งมีประเด็นการศึกษาไม่มากนักแต่มีรายละเอียดครบถ้วน ตามหลักเกณฑ์ของงานวิจัย หรือเป็นรายงานการศึกษาวิจัยอย่างย่อโดยอาจเป็นข้อมูลที่ศึกษาเพิ่มเติมจากรายงานการศึกษาวิจัยที่ได้เคยตีพิมพ์แล้ว หรืออาจเป็นการรายงานผลการศึกษาบางส่วนที่อยู่ในความสนใจของสาธารณะหรือตอบปัญหาที่เกิดขึ้นในขณะนั้น

8. บทความพิเศษ

เป็นบทความที่มีเนื้อหาไม่เข้าข่ายบทความข้างต้น แต่เป็นความรู้หรือข้อคิดเห็นเกี่ยวกับเหตุการณ์ปัจจุบันซึ่งเกี่ยวข้องกับการแพทย์และสาธารณสุข เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้อง

ทั้งนี้บทความที่ส่งตีพิมพ์จะต้องไม่เคยตีพิมพ์ หรือกำลังตีพิมพ์ในวารสารฉบับอื่นมาก่อน

การพิจารณาบทความ

บทความทุกเรื่องจะต้องผ่านการพิจารณาตรวจแก้ไขจากผู้เชี่ยวชาญในสาขาที่เกี่ยวข้องอย่างน้อย 2 คน โดยบรรณาธิการจะเป็นผู้พิจารณาคัดเลือกผู้เชี่ยวชาญทบทวนบทความพิจารณาเบื้องต้น 2 คนแรก และหากจำเป็นอาจคัดเลือกผู้เชี่ยวชาญคนที่ 3 พิจารณาทบทวนบทความเพิ่มเติม บรรณาธิการจะเป็นผู้พิจารณาคำแนะนำของผู้เชี่ยวชาญทั้งหมดและแจ้งแก่ผู้นิพนธ์เพื่อแก้ไข (ถ้ามี) การแก้ไขอาจส่งให้ผู้เชี่ยวชาญพิจารณาตรวจสอบ โดยบรรณาธิการเป็นผู้ตรวจสอบบทความขั้นสุดท้ายก่อนส่งตีพิมพ์ ซึ่งกองบรรณาธิการขอสงวนสิทธิ์ในการตรวจแก้ไขต้นฉบับและพิจารณาตีพิมพ์ตามลำดับก่อนหลัง

ความรับผิดชอบ

บทความที่ตีพิมพ์ในวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถือเป็นผลงานทางวิชาการ และเป็นความเห็นส่วนตัวของผู้นิพนธ์ ไม่ใช่ความเห็นของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ หรือกองบรรณาธิการ ผู้นิพนธ์ต้องรับผิดชอบต่อบทความของตน

จริยธรรมในการวิจัย

กรณีที่เป็นบทความรายงานผลการวิจัยที่ทำการศึกษาวิจัยในมนุษย์หรือใช้ตัวอย่างใด ๆ จากมนุษย์ การวิจัยนั้นๆ ต้องผ่านการพิจารณาอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ และกรณีที่เป็นบทความที่รายงานผลการศึกษาวิจัยที่ใช้สัตว์ทดลอง การวิจัยนั้นๆ ต้องผ่านการพิจารณาอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลอง

การเตรียมต้นฉบับ

ภาษาที่ใช้คือ ภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ต้นฉบับภาษาไทย ควรใช้ภาษาไทยให้มากที่สุดเท่าที่จะทำได้ คำศัพท์เฉพาะหรือคำศัพท์ภาษาอังกฤษที่บัญญัติเป็นภาษาไทยแล้ว แต่ยังไม่เป็นที่ทราบกันอย่างแพร่หลาย หรือแปลแล้วเข้าใจยาก ให้ใส่ภาษาอังกฤษกำกับไว้ในวงเล็บ หรืออนุโลมให้ใช้ภาษาอังกฤษได้

ต้นฉบับควรพิมพ์บนกระดาษขาวขนาด A4 ใช้ตัวอักษร (font) ชนิด Angsana New ขนาดตัวอักษร 16 พิมพ์บรรทัดคู่ (หรือแต่ละบรรทัดให้ห่างอย่างน้อย 6 มม.) พิมพ์หน้าเดียวและใส่เลขกำกับทุกหน้า โดยเว้นขอบด้านซ้ายและด้านบน 3.5 ซม. ด้านขวาและด้านล่าง 2.5 ซม.

หน้าแรกของต้นฉบับประกอบด้วยชื่อเรื่อง ชื่อผู้นิพนธ์และผู้ร่วมนิพนธ์ ชื่อผู้นิพนธ์ที่ทำหน้าที่ประสานงานกับคณะกรรมการ และสถานที่ทำงานที่สามารถติดต่อได้ทางไปรษณีย์ และชื่อเรื่องโดยย่อ (running title) ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ

หน้าที่สองเป็นบทคัดย่อ ต้องเขียนทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ความยาวไม่เกิน 250 คำ โดยบทคัดย่อควรครอบคลุมที่มาของหัวข้อวิจัย วัตถุประสงค์ ขอบเขตการวิจัย วิธีทำหรือวิธีการรวบรวมข้อมูลที่สำคัญโดยย่อ ผลใช้เฉพาะข้อมูลหลักที่สำคัญและสถิติที่ใช้ (ถ้าจำเป็น) และหลักการหรือองค์ความรู้สำคัญที่พบใหม่ ท้ายบทคัดย่อภาษาอังกฤษให้มีคำสำคัญของบทความ (key word) ไม่เกิน 5 คำ เป็นภาษาอังกฤษ

ต้นฉบับหน้าที่สามเป็นต้นไปเป็นส่วนหนึ่งของเนื้อเรื่อง ควรใช้ภาษาที่ง่าย สั้น กระชับ และชัดเจน

หากเป็นบทความประเภทนิพนธ์ต้นฉบับ และรายงานจากห้องปฏิบัติการให้เรียงลำดับดังนี้ :

บทนำ ในบทนำนี้ควรกล่าวถึงสมมุติฐานหรือหลักการเหตุผลที่ศึกษา รวมทั้งวัตถุประสงค์ของการศึกษาเมื่ออ้างอิงควรเลือกใช้เฉพาะเอกสารอ้างอิงที่สำคัญและเป็นปัจจุบัน

วัสดุและวิธีการ ในส่วนนี้ให้ข้อมูลทางวิชาการที่มากพอที่ผู้สนใจสามารถทำงานนี้ซ้ำได้ เช่น กลุ่มตัวอย่างหรือข้อมูลที่ศึกษาวิธีสุ่มเก็บตัวอย่างหรือข้อมูล วิธีวิเคราะห์ตัวอย่างหรือข้อมูล วิธีการคำนวณหรือวิเคราะห์ข้อมูล และสถิติที่ใช้ เป็นต้น ทั้งนี้หากมีการใช้น้ำยา สารเคมี อุปกรณ์ เครื่องมือ หรือจุลชีพที่เป็นปัจจัยสำคัญที่อาจมีผลกระทบต่อผลของการศึกษาวิจัย ให้ระบุแหล่งที่มาของน้ำยา หรือเกรดของสารเคมี หรือโมเดลของเครื่องมือ หรือสายพันธุ์ของจุลชีพในส่วนที่เกี่ยวข้องให้ละเอียด

กรณีเป็นบทความของการศึกษาในมนุษย์หรือใช้ตัวอย่างจากมนุษย์หรือการศึกษาที่ใช้สัตว์ทดลอง ให้ใส่ชื่อคณะกรรมการจริยธรรมหรือคณะกรรมการพิจารณาการวิจัยประจำสถาบัน และหมายเลขอ้างอิงที่ได้รับอนุมัติ

ผล ให้นำเสนอผลงานตามลำดับ หลีกเลี่ยงการใช้กราฟหรือภาพที่ไม่จำเป็น ถ้ามีตารางข้อมูลกราฟหรือภาพให้เสนอพร้อมกับคำอธิบายที่มีเนื้อหาชัดเจนครบถ้วน

วิจารณ์ วิจารณ์สิ่งที่ค้นพบและอาจเปรียบเทียบกับงานที่ผู้อื่นทำและเผยแพร่ไว้ก่อนหน้านี้แล้ว ทั้งนี้ควรระวังไม่นำส่วนของผลมากล่าวซ้ำในส่วนนี้ หากจำเป็นต้องกล่าวถึงควรเขียนผลในภาพรวมที่สำคัญ และอาจเขียนถึงผลกระทบตามหลักวิชาการที่อาจเกิดขึ้นหรือการนำไปใช้ประโยชน์จากผลการศึกษาวิจัยนี้

สรุป เน้นสิ่งที่พบใหม่ที่สำคัญจากการศึกษานี้ และเชื่อมโยงการสรุปกับวัตถุประสงค์

ตารางและภาพ ให้แยกออกจากเนื้อเรื่อง หน้าละ 1 รายการ ภาพถ่ายควรเป็นภาพขาวดำที่มีความชัดเจน ขนาดไม่เล็กกว่าโปสการ์ด ส่วนภาพวาดควรวาดบนกระดาษขาวอย่างดีด้วยหมึกดำลายเส้นคมและชัดเจน ในส่วนของเนื้อเรื่องที่ต้องการแสดงตารางหรือภาพ ให้เว้นที่ว่างพอสมควรและให้เขียนในกรอบว่า

ใส่ตารางที่ 1

หรือ

ภาพที่ 1

กิตติกรรมประกาศ (ถ้ามี)

เอกสารอ้างอิง การอ้างอิงเอกสารในเนื้อเรื่องให้ใช้ระบบของ the Uniform Requirements style (the Vancouver Citation style) ส่วนเอกสารอ้างอิงท้ายเรื่องให้อ้างเฉพาะบทความที่ตีพิมพ์แล้วในสิ่งตีพิมพ์ปฐมภูมิเท่านั้น การเรียงลำดับเอกสารอ้างอิงให้เรียงตามลำดับการอ้างอิง ผู้นิพนธ์ต้องรับผิดชอบในความถูกต้องของเอกสารอ้างอิง สามารถดูรายละเอียดเพิ่มเติมได้ที่

URL: <http://www2.dmsc.go.th/Web/DMSC.LIB/page5.html>

URL: <http://www2.dmsc.go.th/Web/DMSC.LIB/VANCOUV.PDF>

ผู้นิพนธ์ตั้งแต่ 1 ถึง 6 คน ให้ใส่ชื่อทุกคน ถ้ามีมากกว่า 6 คนให้ใส่ชื่อ 6 คนแรกตามด้วย และคณะ หรือ et al กรณีบทความไม่มีชื่อผู้นิพนธ์ให้ใช้ชื่อเอกสารแทนชื่อผู้นิพนธ์

การเขียนเอกสารอ้างอิงให้ใช้รูปแบบดังตัวอย่าง

1. การอ้างบทความวารสาร (Article in Journal)

ตัวอย่าง : สุภาวรรณ จงธรรมวัฒน์, บำรุง คงดี, วิชัย ประสาททอง, มณี เขม้นเขตรการ, จิราภรณ์ อ่ำพันธุ์, กมล ฝอยศิริ และคณะ. การสำรวจคุณภาพอุทยานแห่งชาติทั่วประเทศ. ว กรรมวิทย์ 2540;39(2): 67-74.

2. การอ้างหนังสือหรือตำรา (Text/Guideline)

ตัวอย่าง : ธีระพร วุฒยวนิช. บรรณาธิการ. เทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์. เชียงใหม่ : คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2546.

3. การอ้างเฉพาะบทในตำรา (Chapter in the text)

ตัวอย่าง : ทวีศักดิ์ แทนวันดี. การวินิจฉัยโรคตับจากไวรัสทางคลินิก. ใน : สิริฤกษ์ ทรงศิริโล. บรรณาธิการ. ดัชนีอักเสบทับจากไวรัส. กรุงเทพฯ : บางกอกบลิ๊ก; 2543. เล่ม 1. หน้า 281-309.

4. การอ้างกฎหมาย (Legal material)

ตัวอย่าง : พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 61 (พ.ศ. 2524) ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 98 ตอนที่ 157 (วันที่ 7 กันยายน 2524)

5. การอ้างสิ่งพิมพ์ขององค์กรหรือหน่วยงาน (Organization as author and publisher)

ตัวอย่าง : กรมสนับสนุนบริการสุขภาพ กระทรวงสาธารณสุข. แผนยุทธศาสตร์การดำเนินงานสุขภาพภาคประชาชน. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร : ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย; 2546.

6. การอ้างรายงานการสัมมนา/ประชุมวิชาการ (Conference paper)

ตัวอย่าง : วิยะดา เจริญศิริวัฒน์. เอกสารการประชุมสัมมนาเฉลิมพระเกียรติเรื่อง การคัดกรองภาวะพร่องไทรอยด์ฮอร์โมนในทารกแรกเกิดเพื่อป้องกันปัญญาอ่อน. วันที่ 25 พฤศจิกายน 2542. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2542.

7. การอ้างวิทยานิพนธ์ (Dissertation)

ตัวอย่าง : มณี เขม้นเขตรการ. ผลของ N-acetylcysteine ต่อการป้องกันพิษของพาราควอตในหนูขาว [วิทยานิพนธ์]. ภาควิชาพิษวิทยา, คณะวิทยาศาสตร์. เชียงใหม่ : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2547.

8. การอ้างสื่ออิเล็กทรอนิกส์ (Electronic material)

8.1 วารสารออนไลน์ (Journal on Internet)

ตัวอย่าง : ชวนพิศ ยิ้มสมบัติ. การประเมินคุณภาพการตรวจหาเชื้อมาลาเรียบนฟิล์มโลหิตบางด้วยกล้องจุลทรรศน์. ว กรมวิทย พ [วารสารออนไลน์]. 2548; [สืบค้น 29 ก.ย. 2548]; 47(2):[8 หน้า]. เข้าถึงได้จาก : URL: <http://www.dmsh.moph.go.th/net/jms/>

8.2 เว็บไซต์ (WWW site)

ตัวอย่าง : กรมควบคุมโรค. การป้องกันควบคุมโรคไข้หวัดนก Avian Influenza (Bird Flu). [ออนไลน์]. 2548; [สืบค้น 28 ก.ย. 2548];[1 หน้า]. เข้าถึงได้ที่ : URL: http://www-ddc.moph.go.th/Bird_Flu_main.html.

นิพนธ์ต้นฉบับ รายงานจากห้องปฏิบัติการและบทความปริทัศน์ จะต้องมีย่อหน้า รวมทั้งตาราง กราฟ และรูปภาพ รวมทั้งหมดไม่เกิน 25 หน้า สำหรับเนื้อหาของบทความประเภทอื่น ๆ ต้องไม่เกิน 15 หน้า

การส่งต้นฉบับ

การส่งต้นฉบับอาจทำได้ 2 ช่องทางดังนี้

1. แนบบจดหมายนำส่งที่ผู้นิพนธ์และผู้ร่วมนิพนธ์ลงชื่อไว้ทุกคน พร้อมระบุไว้ด้วยว่าทุกคนอ่าน และยอมรับในบทความนั้น ให้ส่งต้นฉบับจริง 1 ชุด สำเนา 2 ชุด พร้อมแผ่นบันทึกข้อมูล ถึงบรรณาธิการวารสาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000 โทร. 0-2589-0022 ต่อ 99662, บรรณาธิการ ต่อ 98306

2. ส่งบทความผ่านทางระบบออนไลน์ ได้ทาง <http://www.presston.net/journals/index.php> หรือผ่านทางเว็บไซต์ของวารสาร <http://thailand.digitaljournals.org/index.php/BDMS> โดยผู้นิพนธ์จะต้องสมัครเข้าเป็นสมาชิกในระบบก่อน และ scan จดหมายนำส่งตามข้อ 1 upload แนบมาด้วย

การรับบทความ

บทความที่กองบรรณาธิการได้รับ จะแจ้งให้ผู้นิพนธ์ทราบทุกเรื่องและจะไม่คืนต้นฉบับยกเว้น บทความที่ไม่ได้รับการตีพิมพ์ จะแจ้งให้ทราบพร้อมส่งต้นฉบับส่งคืน บทความที่ได้รับการตีพิมพ์ กองบรรณาธิการจะมอบสำเนาพิมพ์ (reprint) 10 ชุด แก่ผู้นิพนธ์ชื่อแรก

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

The Bulletin of the Department of Medical Sciences welcomes the articles related to the Medical Sciences researches and studies in the area of biological products, medical devices, cosmetics, pharmaceutical products, food and beverage, medicinal plants, narcotic drugs, hazardous materials, radioactive materials, communicable diseases, non-communicable diseases, disease carriers/vectors, risk analyses, technology developments, clinical researches, quality management systems, etc.

The Bulletin is published in every three months as following: 1) January–March, 2) April–June, 3) July–September, and 4) October– December.

The articles can be submitted in either Thai or English. The different kinds of articles are accepted including original articles, laboratory findings, case studies, review articles, general articles, letters to the editor, short communications and special articles.

Every article must not have been accepted or published elsewhere.

Articles published in this bulletin represent the research activities or opinions of the authors, not the opinion of editor or Department of Medical Sciences. The authors are responsible for its contents.

Contributions in every article will be peer-reviewed by at least two selected experts.

The clinical research and research involves human specimens must be prior approved by the Ethics Committee. The research that involves animals must be prior approved by the Animal Ethics Committee.

Type or print out of the manuscripts shall be on A4 white paper using Angsana New font, size 16. Use double spacing throughout the paper, and on only one side of paper with left and top margins of 3.5 cm., and right and bottom margins of 2.5 cm.

The first page shall carry the title of the article, full names of authors, affiliation of the author and a running title.

The second page shall carry an abstract both in Thai and English of no more than 250 words. The abstract should cover the rationale, objective(s), scope, main methodology, and new major findings/results of the study. Identify limited to 5 key words at the bottom of the abstract.

The third page and next shall carry the body of the article. The structure of original articles and laboratory findings should be in the order as following:

Introduction: The introduction should provide the hypothesis or the rationale for the study as well as the objective(s) of the study. Give only pertinent references.

Materials and Methods: Give the full technical information so that the experiments can be repeated such as group of sample/study, sampling methodology, analysis methodology, statistical analysis, if used, etc. The sources of all materials and apparatus or stain or strains of microorganisms must be provided if they have the potential impact to the study results.

For the clinical research, or research involves human specimens or animals, name of the ethics committee(s) or institutional review board(s) as well as the number/ID of the approval(s) must be stated.

Results: Present the results as concisely as possible in logical sequence. Avoid unnecessary graphs and figures. The tabular data, graphs, or figures, if needed, should be provided with clear description.

Discussion: Discuss findings. Provide and interpretation of the results. The results may be provided and interpreted in relation to other relevant studies. It should not contain extensive repetition of the results sections. The impact or benefit from the this study may be elaborated.

Conclusion: Emphasize the new and important aspects of the study. Link the conclusions with the goals of the study.

Each table of or figure should be prepared on a separate sheet. Photographic prints must be in black and white, shape or shaded with high contrast and not smaller than the postcard size. Drawings shall be clearly prepared with black drawing ink on white paper. In the text, an appropriate space should be provided for each table or figure as indicated below:

For Table 1

or

For Figure 1

Acknowledgement (If any):

References: appeared in the text, should be cited according to “the Uniform Requirements style” (the Vancouver Citation style). The references should be listed numerically and in the same order that they have been cited in the text. Only the original documents should be used as references.

List all authors up to six authors. If there are more than six authors, list the first six authors and then follow by et al (et al means “and others”). Use the title of the article or book as author when no author is given. Only the first word of journal articles or book titles (and words that normally begin with a capital letter) are capitalized, and do not use italics or underlining.

Each reference should be in the order, according to the following samples:

1. Citing a Journal Article

Examples:

Hoorfar J, Cook N, Malorny B, Wagner M, Medici D, Abdulmawjood A, et al. Making internal amplification control mandatory for diagnostic PCR. *J Clin Microbiol* 2003; 41(12): 5835-7

Russell FD, Coppel AL, Davenport AP. In vitro enzymatic processing of radiolabelled big ET-1 in human kidney as a food ingredient. *Biochem Pharmacol* 1998; 55: 679-701.

Coffee drinking and cancer of the pancreas [editorial]. *BMJ* 1981; 283: 628

2. Citing a Text/Guideline

Examples:

Greenberg AE, Clesceri LS, Eaton AD, editors. Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th ed. Washington DC: American Public Health Association; 1992. P 9-94.

The United States Pharmacopoeia. The National Formulary. 23rd ed Rockville: United States Pharmacopoeia Convention, Inc.; 1995. P. 373-5.

Thai Pharmacopoeia Vol. 1 (Pt 2). Appendix 1.1 Reagents. Bangkok: Department of Medical Sciences; 1993. P. 1472-5.

International Organization for Standardization. ISO/IEC Guide 25. General requirements for the Competence of calibration and testing laboratories. 3rd ed Geneva: International Organization for Standardization (ISO); 1990

Stedman's medical dictionary. 26th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1995 Apraxia; p.119.

3. Chapter in the Text

Examples:

Phillip SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors.

Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management. 2nd ed. New York (NY): Raven Press; 1995. P. 465-78.

Bennett GL, Horuk R. Iodination of chemokines for use in receptor binding analysis. In: Horuk R, editor. Chemokine receptor. New York (NY): Academic Press; 1997. P. 134-48 (Methods in enzymology; vol. 288).

4. Legal Material

Examples:

Airlines Equipment Amendment Act 1981 (Cwlth), s.19(1) (a) (ii)

Public Service Regulations (Cwlth), r.83(2) (a) (ii)

Preventive Health Amendments of 1993, Pub.L. No. 103-183, 107 Stat. 2226
(Dec. 14, 1993)

5. Organization as Author and Publisher (Including pamphlet & Package Insert)

Examples:

Department of Medical Sciences. Guideline of method validation used in pharmaceutical analysis. Nonthaburi: Department of Medical Sciences; 1995

Pharmaceutical Society of Australia. Medicines and drowsing [pamphlet].
Pharmaceutical Society of Australia; 1998. DR-7.

Lamasil [package insert]. East Hanover (NJ): Sandoz Pharmaceuticals Corp; 1993.

6. Citing Conference Papers/Conference Proceedings

Examples:

Bengtsson S, Solheim BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun KC, Degoulet P, Piemme TE, Reinhoff O, editors. MDINFO 92. Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics; 1992 Sep 6-10; Geneva, Switzerland. Amsterdam: North-Holland; 1992 p. 1561-5.

7. Dissertation

Examples:

Kaplan SJ. Post-hospital home health care: the elderly's access and utilization [dissertation]. St. Louis, (MO): Washington Univ.; 1995

8. Citing Electronic material

8.1 Journal on Internet

Examples:

Morse SS. Factors in emergence of infectious disease. Emerg Infect Dis [serial online] 1995

Jan-Mar [cited 1996 Jun 5]; 1(1): {24 screens}. Available from: URL:
<http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>

Garfinkel PE, Lin E, Goering P. Should amenorrhoea be necessary of the diagnosis of anorexia nervosa? Br Psych [serial online] 1996 [cited 1999 Aug 17]; 168(4): 500-6. Available from: [URL:http://biomed.niss.ac.uk](http://biomed.niss.ac.uk)

8.2 Websites (WWW site)

Examples:

Hoffman DL. St John's Wort. [Online]. [cited 1998 Jul 16]; [4 screens]. Available from: [URL: http://www.healthy.net/library/books/hoffman/materiamedica/stjohns.htm](http://www.healthy.net/library/books/hoffman/materiamedica/stjohns.htm)

The body including tables, graph, and figures of original, laboratory finding, and review articles should not exceed 25 pages, and for other kinds of articles should not exceed 15 pages.

How to Submit Manuscripts

There are two channels to submit articles:

1. Two copies of the manuscript including the original one and a diskette should be sent to the editor at the below address. Papers which tend to have legal or ethical impact must be submitted accompanied by the guarantee letters from the authorized organizations.

2. Online submission via <http://www.presston.net/journals/index.php> or via the website of Bulletin of the Department of Medical Sciences: <http://thailand.digitaljournals.org/index.php/BDMS>. The papers which tend to have legal or ethical impact accompanied by the guarantee letters from the authorized organizations must be scanned and uploaded as attachments in the online submission system.

All submissions will be acknowledged by the Editorial Board. Those unaccepted will also be notified. The Editorial Board reserves the right to edit any manuscripts for proper publication.

Following publication of an article, ten reprints will be supplied to the first author free of charge.

Editor, Bulletin of the Department of Medical Sciences
Department of Medical Sciences Library
88/7 Soi Bamrasnaradura Hospital, Tiwanond Rd.
Nonthaburi 11000, Thailand
Tel. 0-2589-0022 ext. 98306, 99662

การตรวจสอบสายพันธุ์ย่อยของเชื้อ BCG Tokyo 172-1 ในวัคซีนป้องกันวัณโรค ที่ผลิตในประเทศไทย โดยวิธี Real-Time PCR

วิริยามาศย์ เจริญคุณธรรม* สมปอง ทรัพย์สุทธิภาสน์* นวลจันทร์ วิจักขณ์จินดา** และสุภาพร ภูมิอมร*
*สถาบันชีววัตถุ **สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การตรวจสอบสายพันธุ์ย่อยของเชื้อ BCG Tokyo 172-1 ในวัคซีนป้องกันวัณโรคที่ผลิตในประเทศไทย ยังไม่มีการดำเนินการ จึงได้พัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-Time Polymerase Chain Reaction (Real-Time PCR) เพื่อตรวจหาปริมาณสายพันธุ์ย่อยของเชื้อในวัคซีนที่ผลิตจากสถานเสาวภา สภากาชาดไทยใน ปี พ.ศ. 2555 2557 และ 2558 จำนวน 15 รุ่นการผลิต จากการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสนใจ >0.99 ค่าความเที่ยงตรงมีสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน $<10\%$ และความถูกต้องมีค่าการคืนกลับอยู่ระหว่าง $105-130\%$ โดยการตรวจหาเชื้อสายพันธุ์ย่อยในวัคซีน พบว่ามี subtype II น้อยกว่า 10% ในวัคซีน 12 รุ่น และมีค่ามากกว่า 10% ในวัคซีน 3 รุ่นที่ผลิตในปี 2555 จากการศึกษาี้แสดงว่าวิธี Real-Time PCR ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอของสายพันธุ์ย่อยของเชื้อ BCG Tokyo 172-1 ในวัคซีน และวัคซีน BCG ของไทยมีเชื้อ BCG ทั้งสองสายพันธุ์ย่อย

Corresponding author E-mail: wiriya.c@dmsc.mail.go.th

Received: 15 August 2018

Revised: 20 December 2018

Accepted: 28 March 2019

บทนำ

วัคซีน BCG เป็นวัคซีนป้องกันวัณโรคชนิดเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ ที่ใช้ในแผนงานสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคของประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2520^(1,2,3) ใช้ฉีดเข้าทางชั้นผิวหนังให้กับเด็กแรกเกิด ปัจจุบันวัคซีนที่ผลิตในประเทศไทยโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ผลิตจากเชื้อ *Mycobacterium bovis* BCG สายพันธุ์ Tokyo 172-1 ที่ได้รับมาจากประเทศญี่ปุ่นตั้งแต่ปี พ.ศ. 2531⁽⁴⁾ ซึ่งเป็นหนึ่งในสามสายพันธุ์หลักที่มีการใช้กันทั่วโลกมากที่สุดผ่านการจัดหาสนับสนุนโดย UNICEF อีกสองสายพันธุ์ ได้แก่ Danish 1331 และ Russian BCG-I ทั้งนี้มีรายงานว่าสายพันธุ์ที่ใช้ผลิตวัคซีนในปัจจุบันมีไม่ต่ำกว่า 14 สายพันธุ์ ซึ่งมีที่มาจากเชื้อตั้งต้นที่เดียวกันคือ Pasteur Institute of Paris และนำไปเพาะเลี้ยงผลิตต่อ จนเกิดการเปลี่ยนแปลงทางยีนที่ต่างกัน^(5,6,7,8) ในปี พ.ศ. 2544 มีรายงานว่าเชื้อ BCG สายพันธุ์ Tokyo 172 ที่ใช้ผลิตวัคซีนของประเทศไทยประกอบด้วยสายพันธุ์ย่อย 2 ชนิดคือ subtype I และ subtype II⁽⁹⁾ ที่สามารถจำแนกความต่างกันทาง phenotype และ genotype โดย subtype I มีลักษณะโคโลนีแบบเรียบ เมื่อเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 7H10 agar และมีการขาดหายไปของดีเอ็นเอ 22 คู่เบส (base pairs: bp) ในบริเวณ Rv3405c (transcriptional regulatory protein) ของ Region of difference (RD)16 ขณะที่ subtype II มีลักษณะโคโลนีแบบหยาบ และไม่มีการขาดหายไปของดีเอ็นเอในตำแหน่งดังกล่าว subtype I มีความสามารถในการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและในอวัยวะหนูทดลอง สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีกว่า subtype II อีกทั้งมีปริมาณสัดส่วนเชื้อในวัคซีนมากกว่า 90% ซึ่งเป็นไปได้ว่าคุณสมบัติ high viability และทนต่อความร้อนของเชื้อ BCG Tokyo 172 นั้นจะเป็นคุณสมบัติของ subtype I^(10, 11) การเพิ่มขึ้นของ subtype I อาจเกิดจาก subtype II มีการกลายพันธุ์ภายหลังจากที่มีการนำเชื้อ BCG เข้าประเทศญี่ปุ่นเมื่อปี พ.ศ. 2467 ซึ่งการขาดหายไปของดีเอ็นเอที่บริเวณ RD16 นี้ไม่พบใน BCG substrains อื่นๆ⁽¹²⁾

ข้อมูลการเกิดอาการไม่พึงประสงค์ภายหลังได้รับวัคซีน จากคณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล ที่ได้ติดตามในช่วง 10 ปี ระหว่าง พ.ศ. 2550–2559 พบว่ามีอาการต่อมน้ำเหลืองอักเสบ (Lymphadenitis) รวมทั้ง BCG osteitis และ Disseminated BCG disease โดยมีข้อสังเกตว่าปี 2553 และ 2554 มีจำนวนผู้ป่วยเกิดอาการไม่พึงประสงค์สูงกว่าช่วงที่ผ่านมาอย่างชัดเจน ซึ่งหน่วยงานที่เกี่ยวข้องและผู้ผลิตได้ร่วมกันสอบสวนหาสาเหตุที่ทำให้เกิดอาการข้างเคียงโดยมีสมมติฐานว่าสาเหตุอาจเกิดได้จากหลายปัจจัย เช่น เทคนิคการฉีดที่ไม่ถูกต้องอาจฉีดลึกเกินหรือฉีดในตำแหน่งที่ไม่เหมาะสม ปริมาตรของวัคซีนที่ฉีดต่อครั้ง 0.1 มิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าวัคซีนบริษัทอื่นที่ใช้เพียง 0.05 มิลลิลิตร คุณภาพวัคซีนมีการเปลี่ยนแปลงไป รวมทั้งอาจเกิดจากภาวะสุขภาพภูมิคุ้มกันของผู้ที่ได้รับวัคซีนแต่ละคน ในส่วนของคุณภาพวัคซีนนั้นมีการตรวจสอบและยืนยันแล้วว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงในกระบวนการผลิตและผลการควบคุมคุณภาพยังสม่ำเสมอคงเดิม⁽¹³⁾ และในปลายปี พ.ศ. 2558 มีรายงานการศึกษาของ Wada T. และคณะเกี่ยวกับปริมาณของ subtype I และ subtype II ของวัคซีน BCG รายงานว่า วัคซีนจากประเทศไทยตรวจแล้วพบเป็นเชื้อ BCG subtype II ทั้งหมด โดยไม่พบ subtype I ขณะที่วัคซีน BCG ของประเทศญี่ปุ่นตรวจพบ subtype II ไม่เกิน 5% และวัคซีนของประเทศไทยได้พบมี subtype II ประมาณ 40%⁽¹⁴⁾ จึงทำให้เกิดข้อสงสัยในคุณภาพวัคซีนเกี่ยวกับปริมาณของสายพันธุ์ย่อยในวัคซีนของประเทศไทยว่ามี subtype II ที่สูงแตกต่างจากวัคซีนประเทศอื่นหรือไม่ แต่เนื่องจากการตรวจสอบคุณภาพของวัคซีน BCG ตามมาตรฐานขององค์การอนามัยโลกไม่ได้กำหนดให้ตรวจหาปริมาณของสายพันธุ์ย่อยของเชื้อในการผลิตและการควบคุมคุณภาพของวัคซีน BCG⁽⁵⁾ จึงยังไม่มีวิธีในการตรวจสอบสายพันธุ์ย่อยในห้องปฏิบัติการภาครัฐและผู้ผลิตของประเทศไทย

การศึกษานี้ได้พัฒนาและประเมินความถูกต้องเหมาะสมของวิธี Real-Time Polymerase Chain Reaction (Real time-PCR) ที่ใช้ตรวจหาสายพันธุ์ย่อยของเชื้อ BCG Tokyo 172-1 ในวัคซีน และทำการตรวจสอบสายพันธุ์ย่อยของเชื้อในวัคซีน BCG ที่ผลิตในประเทศ ในปี พ.ศ. 2555, 2557 และ 2558

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างและเชื้อมาตรฐาน

วัคซีน BCG สายพันธุ์ Tokyo 172-1 ผลิตโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทย จำนวน 15 รุ่นการผลิตที่ผลิตปี พ.ศ. 2555, 2557 และ 2558 โดยแต่ละปีทดสอบตัวอย่างวัคซีน จำนวน 5 รุ่นการผลิต

เชื้อ BCG Tokyo 172 subtype II สายพันธุ์ BCG/pSO246 lot 29092000 จากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งมี pSO246 plasmid ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ Kanamycin ใช้ในการเตรียมดีเอ็นเอมาตรฐาน subtype II

ดีเอ็นเอของ BCG Tokyo 172 subtype I และ subtype II จากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ใช้เป็นดีเอ็นเอควบคุมในการตรวจสอบ subtype ด้วยวิธี PCR

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมรุ่น ProFlex™ PCR System และเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริงรุ่น QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System ของ Applied Biosystems ประเทศสหรัฐอเมริกา เครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ (Spectrophotometer) รุ่น Nanodrop 2000/2000c ของ Thermo Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา เครื่องถ่ายภาพเจล (Gel documentation system) รุ่น GeneSnap ของ Syngene ประเทศสหรัฐอเมริกา เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Electrophoresis) รุ่น MUPID-eXU ของ Advance ประเทศสหรัฐอเมริกา

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

Agarose, Ethidium bromide, 10x TE buffer, Phosphate buffer saline, TE buffer pH 8.0 low EDTA (molecular biology grade), Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) และ Proteinase K (recombinant, PCR grade) ผลิตภัณฑ์ของ Thermo Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) และ RNase A solution (Cat.No. A7973) ผลิตภัณฑ์ของ Promega ประเทศสหรัฐอเมริกา TBE Buffer และชุดน้ำยาสำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR) KAPA 2G Fast Multiplex PCR Kit (Cat.No. KK5801) ผลิตภัณฑ์ของ Kapabiosystems ประเทศสหรัฐอเมริกา ชุดน้ำยาสำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา Real-Time PCR, QPCR Probe Master Mix LRox (Cat. No. BR0500502) และ 50 bp DNA Ladder (Cat. No. BR0800400) ผลิตภัณฑ์ของ Biotechrabbit ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี

อาหารเลี้ยงเชื้อ Middlebrook 7H9 broth (Cat.No. 271310) และอาหารเลี้ยงเชื้อ Mycobacteria 7H11 agar (Cat.No. 283810) ของ Difco TM, BD ประเทศสหรัฐอเมริกา เตรียมตามวิธีที่ระบุในเอกสารกำกับของผู้ผลิต^(15,16) ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ BCG subtype I สำหรับ subtype II เติมนานามัยซิน ในอาหารให้มีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารละลาย Sauton เตรียมตามวิธีที่ระบุในวิธีมาตรฐานการตรวจสอบความแรงและความคงตัวของวัคซีน BCG⁽¹⁷⁾

การออกแบบ Primer และ Probe สำหรับการตรวจด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) และ Real-Time PCR

Primer สำหรับตรวจสอบสายพันธุ์ของเชื้อบีซีจีด้วยวิธี PCR และ Real-Time PCR ออกแบบโดยอาศัยความต่างระหว่าง 2 subtypes ในตำแหน่ง RV3405c ของ RD16 region ซึ่ง Primer สำหรับตรวจสอบด้วยวิธี PCR อ้างอิงตำแหน่งจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Mycobacterium bovis* BCG strain Tokyo 172 substrain TRCS, complete genome, Query ID: CP014566.1⁽¹⁸⁾ แสดงในตารางที่ 1 และ murB-Fw และ murB-Rv เป็น primer สำหรับตรวจสอบ *murB* ซึ่งเป็น housekeeping gene ของเชื้อ BCG

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ ตำแหน่ง และคุณสมบัติของ Primer โดยวิธี PCR

Primer	Sequence 5' to 3'	Position*	Tm (°C)	%GC
BCG-RD16-Fw	CGTTCGATGATGTCAGCGG	3809348-3809366	60.3	57.89
BCG-RD16-Rv	CAAGGACCAACTGGTTGGGG	3809399-3809418	62.7	60.00
murB-Fw	GATAGTGCCGCTCGCTTTTC	3799061-3799080	56.92	55.00
murB-Rv	GTAGTTGGAGGACGGCATGAC	3799169-3799189	58.37	57.14

*อ้างอิง *Mycobacterium bovis* BCG strain Tokyo 172 substrain TRCS, complete genome, Query ID: CP014566.1

สำหรับการตรวจด้วยวิธี Real-Time PCR ออกแบบ primer และ probe 2 ชุด คือ ชุดที่ใช้ตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอของ subtype II ประกอบด้วย BCG I/II-Fw primer และ BCG II-Rv primer และตรวจวัดโดยใช้ RD16-probe ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง FAM และชุดที่ใช้ตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ BCG ทั้งหมดประกอบด้วย subtype I และ subtype II โดยออกแบบให้ primer และ probe จับอยู่ในตำแหน่งของ *murB* gene ซึ่งเป็นยีนที่จำเป็นเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ peptidoglycan ของผนังเซลล์ของเชื้อ *Mycobacterium*⁽¹⁹⁾ ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ห่างจากส่วน RD16 มา 10 kb ใช้ murB-Fw และ murB-Rv primer และใช้ murB-probe ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง NED ตำแหน่งของ primers และ probes ของวิธี Real-Time PCR อ้างอิงมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Mycobacterium bovis* subsp. *bovis* AF2122/97 complete genome, Query ID: BX248333.1⁽²⁰⁾ ซึ่งได้แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ในตารางที่ 2 และ 3

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ ตำแหน่ง และคุณสมบัติของ Primer โดยวิธี Real-Time PCR

Primer	Sequence 5' to 3'	Position*	Tm (°C)	%GC
BCG I/II -Fw	CGGGATATCCGTCCAGCAGTGCC	3777567-3777589	65.48	65.22
BCG II -Rv	CGAAGCTGACCAGACTGTTGCACTCC	3777648-3777673	64.40	57.69
murB-Fw	GATAGTGCCGCTCGCTTTTC	3767223-3767242	56.92	55.00
murB-Rv	GTAGTTGGAGGACGGCATGAC	3767331-3767351	58.37	57.14

*อ้างอิง *Mycobacterium bovis* subsp. *bovis* AF2122/97 complete genome, Query ID: BX248333.1

ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ และตำแหน่งของ Probe โดยวิธี Real-Time PCR

Probe	Sequence 5' to 3'	Position*
RD16-Probe	VICGGCTAAGACCCGCCCATGTCGGTCMGBNFQ	3777591-3777614
murB-Probe	NEDCGGCAAGAGTCGGATGCCGTAGTAGAAGMGBNFQ	3767246-3767273

*อ้างอิง *Mycobacterium bovis subsp.bovis* AF2122/97 complete genome, Query ID: BX248333.1

การเพาะเลี้ยงเชื้อจากวัคซีนเพื่อแยกโคโลนีเดี่ยวของ BCG Tokyo 172 subtype I และ subtype II

ละลายวัคซีน BCG ด้วยสารละลาย Sauton แล้วเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mycobacteria 7H11 agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 สัปดาห์ ตรวจสอบและเลือกโคโลนีเดี่ยวแยกแต่ละโคโลนีละลายในสารละลาย Sauton แล้ว subculture ต่อไปจนเห็นลักษณะโคโลนีของเชื้อมีลักษณะเดี่ยว จึงนำมาตรวจยืนยัน subtype I และ subtype II ด้วยวิธี PCR จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวโดยนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Middlebrook 7H9 broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 สัปดาห์ เติมน้ำ glycerol ให้มีความเข้มข้น 25% (v/v) แล้วเก็บเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

การเตรียมดีเอ็นเอ BCG subtype I และ BCG subtype II

ทำการสกัด Genomic DNA⁽²¹⁾ โดยนำเชื้อ subtype I และ subtype II ที่เพาะข้างต้นปั่นตกตะกอนและล้างตะกอนด้วย 0.1x TE buffer จากนั้นละลายเชื้อด้วย 0.1x TE buffer นำไปต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แยกเซลล์ด้วย lysozyme ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นย่อยโปรตีนด้วย 10% SDS/proteinase K แล้วเติม 5M NaCl และสารละลาย CTAB/NaCl เพื่อกำจัดสารอื่น แล้วเติม chloroform/isoamyl alcohol อัตราส่วน 24:1 นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ตูดส่วนใสด้านบนนำมากำจัด RNA ด้วย RNase A ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย absolute ethanol ปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ตูดส่วนใสด้านบนทิ้งแล้วเติมน้ำ cold 70% ethanol ปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ตูดส่วนใสด้านบนทิ้ง ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วละลายตะกอนด้วย 0.1x TE buffer วัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ แล้วเก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมการตรวจสอบสายพันธุ์และเป็นดีเอ็นเอมาตรฐานของวิธี Real-Time PCR

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างวัคซีน BCG เพื่อตรวจหาสายพันธุ์ย่อยด้วยวิธี Real-Time PCR

ละลายวัคซีน BCG ด้วย TE buffer นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ตูดส่วนใสด้านบนทิ้ง ปั่นล้างซ้ำ 5 ครั้ง แล้วเติม TE ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วปั่นที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ตูดส่วนใสด้านบนนำมาตรวจวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของสายพันธุ์ย่อยด้วยเครื่อง QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System วิเคราะห์ผลโดยโปรแกรม QuantStudioTM Software V1.3

การตรวจสอบสายพันธุ์ย่อยของเชื้อโคลนีเดี่ยวด้วยวิธี **Polymerase Chain Reaction (PCR)**

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทดสอบโดยปฏิกิริยา PCR ที่มีปริมาตรรวมทั้งหมด 12 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตร BCG-RD16-Fw 0.5 μ M, BCG-RD16-Rv 0.5 μ M, murB-Fw 0.5 μ M และ murB-Rv 0.5 μ M ชนิดละ 0.6 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 1.6 ไมโครลิตร และ 2x master mix 6 ไมโครลิตร แล้วทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง PCR โดยตั้งโปรแกรม Pre-PCR ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที ให้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จำนวน 35 รอบ แต่ละรอบประกอบด้วย denaturation step ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที annealing step ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 15 วินาที และ chain elongation step ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที เมื่อครบ 35 รอบ แล้วตามด้วย post-PCR ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้มาแยกขนาดด้วย gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 2% (w/v) ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ย้อมแผ่นเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ถ่ายภาพภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel documentation โดย BCG subtype I และ subtype II ตรวจพบ band ที่ขนาด 71 และ 93 bp ตามลำดับ ขณะที่ *murB* gene ซึ่งเป็น house keeping gene ตรวจพบที่ขนาด 128 bp เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 bp

การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของสายพันธุ์ย่อย BCG Tokyo 172-1 ด้วยวิธี **Real-Time PCR**

ตรวจด้วยหลักการ TaqMan hydrolysis probe Real-Time PCR โดยใช้ primer และ probe 2 ชุด ตามที่แสดงไว้ในตารางที่ 2 และ 3

การศึกษาสภาวะเหมาะสมของการทำปฏิกิริยาโดยดูความจำเพาะของการเพิ่มขยายสายพันธุ์ย่อยเป้าหมายเตรียมดีเอ็นเอ BCG subtype II โดยเจือจางดีเอ็นเอของ BCG subtype II ด้วย TE buffer pH 8.0 ให้มีความเข้มข้น 1,000, 100, 10, 1, 0.1 และ 0.01 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร เพื่อใช้สร้างกราฟมาตรฐาน ส่วนการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีใช้ดีเอ็นเอของ BCG subtype I และ subtype II ที่เจือจางให้มีสัดส่วน % ดีเอ็นเอของ BCG subtype I: BCG subtype II เป็น 95:5, 60:40 และ 5:95 ตามลำดับ แล้วนำไปทำปฏิกิริยาในปริมาตรรวมแต่ละหลอด 15.85 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย DNA template ของสารมาตรฐาน (DNA subtype II) และวุ้นขึ้นตัวอย่างแยกหลอด หลอดละ 2 ไมโครลิตร โดยใส่สารในแต่ละหลอดประกอบด้วย 10 μ M BCG I/II-Fw และ 10 μ M BCG II-Rv อย่างละ 1.2 ไมโครลิตร 10 μ M murB-Fw 0.6 ไมโครลิตร 10 μ M murB-Rv 0.6 ไมโครลิตร 2 μ M RD16-Probe 1.5 ไมโครลิตร 2 μ M murB-Probe 0.75 ไมโครลิตร 2x qPCR master mix 7.5 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 0.5 ไมโครลิตร ตรวจปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System โดยโปรแกรม Pre-PCR ตั้งค่าที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จำนวน 40 รอบ แต่ละรอบประกอบด้วย denaturation step ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 10 วินาที annealing/chain elongation step ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที

คำนวณ % BCG subtype II = [ปริมาณดีเอ็นเอของ BCG subtype II (พิโคกรัมต่อไมโครลิตร)] / ปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมดของ BCG (พิโคกรัมต่อไมโครลิตร) x 100

โดยปริมาณดีเอ็นเอของ BCG subtype II วิเคราะห์ได้จากการใช้ชุด Primer (BCG I/II-Fw, BCG II-Rv) และ RD16-Probe ที่สามารถจับกับ BCG subtype II ซึ่งส่วน RD16 ไม่มีการขาดหายไปของ 22-bp ได้เท่านั้น ส่วนการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอ BCG ทั้งหมดใช้ชุด Primer (murB-Fw, murB-Rv) และ murB-Probe ที่จำเพาะกับส่วน *murB* gene เป้าหมาย

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

ทำการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ ความเที่ยงตรง และความถูกต้อง

ความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (*Linearity and Range*) ตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของ BCG subtype II ความเข้มข้น 1,000, 100, 10, 1, 0.1 และ 0.01 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร ด้วยเครื่อง QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่า cycle threshold (C_T) กับความเข้มข้นของ DNA วิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (*Coefficient of determination, r^2*)

ความเที่ยงตรง (*Precision*) ตรวจสอบใน 2 หัวข้อ ได้แก่ การทำซ้ำในวันเดียวกัน (*repeatability*) โดยทำการวิเคราะห์หา % BCG subtype II ในตัวอย่างวัคซีน BCG รุ่นการผลิตเดียวกันจำนวน 6 ขวด แต่ละขวดทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ทำการวิเคราะห์ในวันและเวลาเดียวกัน โดยผู้วิเคราะห์คนเดียว วิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% coefficient of variation, %CV) และการทำซ้ำต่างวัน (*Intermediate precision*) โดยทำการวิเคราะห์หา % BCG subtype II ในตัวอย่างวัคซีน BCG รุ่นการผลิตเดียวกันจำนวน 6 ขวด โดยแต่ละขวดทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ทำการวิเคราะห์ต่างวัน โดยผู้วิเคราะห์คนเดียว วิเคราะห์หา %CV

ความถูกต้อง (*Accuracy*) ตรวจสอบค่าร้อยละการคืนกลับ (%*Recovery*) ของปริมาณดีเอ็นเอ BCG subtype II ในตัวอย่างที่เตรียมให้มีสัดส่วน % ดีเอ็นเอของ BCG subtype I: BCG subtype II ที่ 95:5, 60:40 และ 5:95 ทำการทดสอบ 6 ซ้ำ ที่เป็นอิสระต่อกัน

คำนวณการคืนกลับ (% *Recovery*) ดังนี้

% *Recovery* = (% ดีเอ็นเอของ BCG subtype II ที่วัดได้ / % ดีเอ็นเอของ BCG subtype II ที่ทราบค่า) x 100

การตรวจปริมาณของ % BCG subtype II ในวัคซีน BCG Tokyo 172-1 ด้วยวิธี Real-Time PCR

วิเคราะห์หา % ดีเอ็นเอของ BCG subtype II ในตัวอย่างวัคซีน BCG ด้วยวิธี Real-Time PCR จำนวน 15 รุ่นการผลิต ที่ผลิตในปี พ.ศ. 2555, 2557 และ 2558 โดยทดสอบรุ่นการผลิตตัวอย่างละ 3 ขวด ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

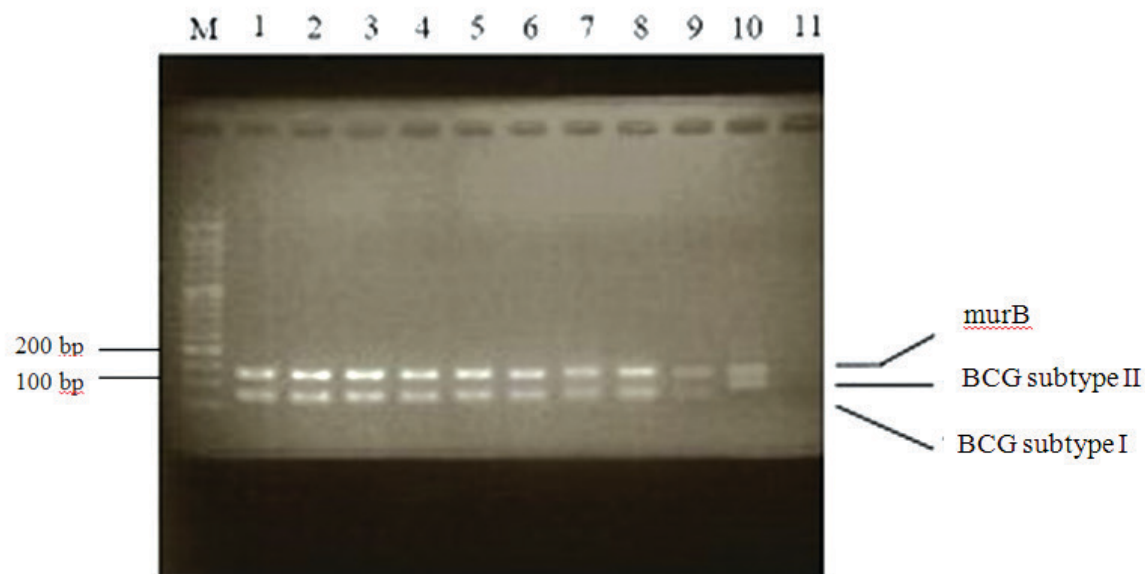
วิเคราะห์และแสดงโดยสถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ ร้อยละ ค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

ผล

การเพาะเลี้ยงเชื้อและการตรวจสอบสายพันธุ์

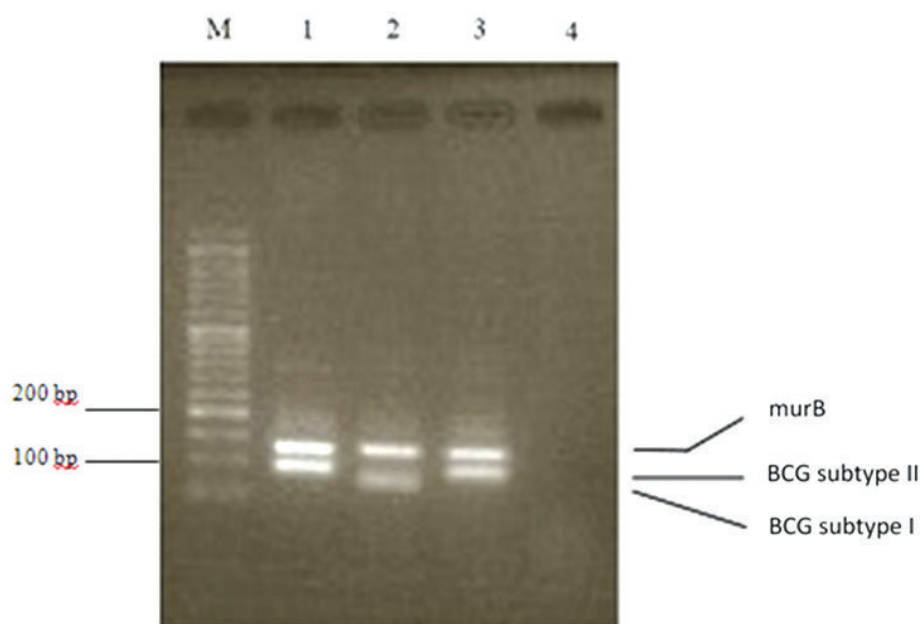
ลักษณะโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ BCG ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวัคซีน BCG บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mycobacteria 7H11 agar พบว่าโคโลนีทั้ง 8 โคโลนีที่เลือกมา มีลักษณะคล้ายคลึงกัน คือมีสีเหลืองอ่อน เรียบ ขอบหยัก นูนตรงกลาง เล็กน้อย ส่วนเชื้อ BCG subtype II สายพันธุ์ BCG/pSO246 เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mycobacteria 7H11 agar ที่มี kanamycin พบว่าโคโลนีมีลักษณะสีเหลืองอ่อน ขอบหยัก ย่นขรุขระทั้งโคโลนี

เมื่อตรวจสอบสายพันธุ์ย่อยของเชื้อที่เพาะเลี้ยงได้ด้วยวิธี PCR (ภาพที่ 1) พบว่าทั้ง 8 โคโลนีที่เลือกมาจากการเพาะเลี้ยงวัคซีนมีขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR เท่ากับ 71 bp แสดงว่าเชื้อที่เพาะเลี้ยงได้ทั้งหมดเป็น BCG subtype I สำหรับดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อสายพันธุ์ BCG/pSO246 พบว่ามีขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR เท่ากับ 93 bp (ภาพที่ 2) แสดงว่าเป็น subtype II จึงนำไปใช้ศึกษาความเป็นเส้นตรง ความแม่นยำและความถูกต้องของวิธี Real-Time PCR



ภาพที่ 1 ผลการตรวจสายพันธุ์เชื้อที่เพาะเลี้ยงจากวัคซีน BCG จากปฏิกิริยา PCR ที่นำมาแยกขนาดโดยใช้ gel electrophoresis บน 2% agarose

Lane M: ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 bp Ladder; Lane 1-8: ดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อที่เพาะเลี้ยงจากวัคซีน 8 โคโลนี Lane 9: ดีเอ็นเอของ BCG subtype I control; Lane 10: ดีเอ็นเอของ BCG subtype II control; Lane 11: negative control (น้ำกลั่น)

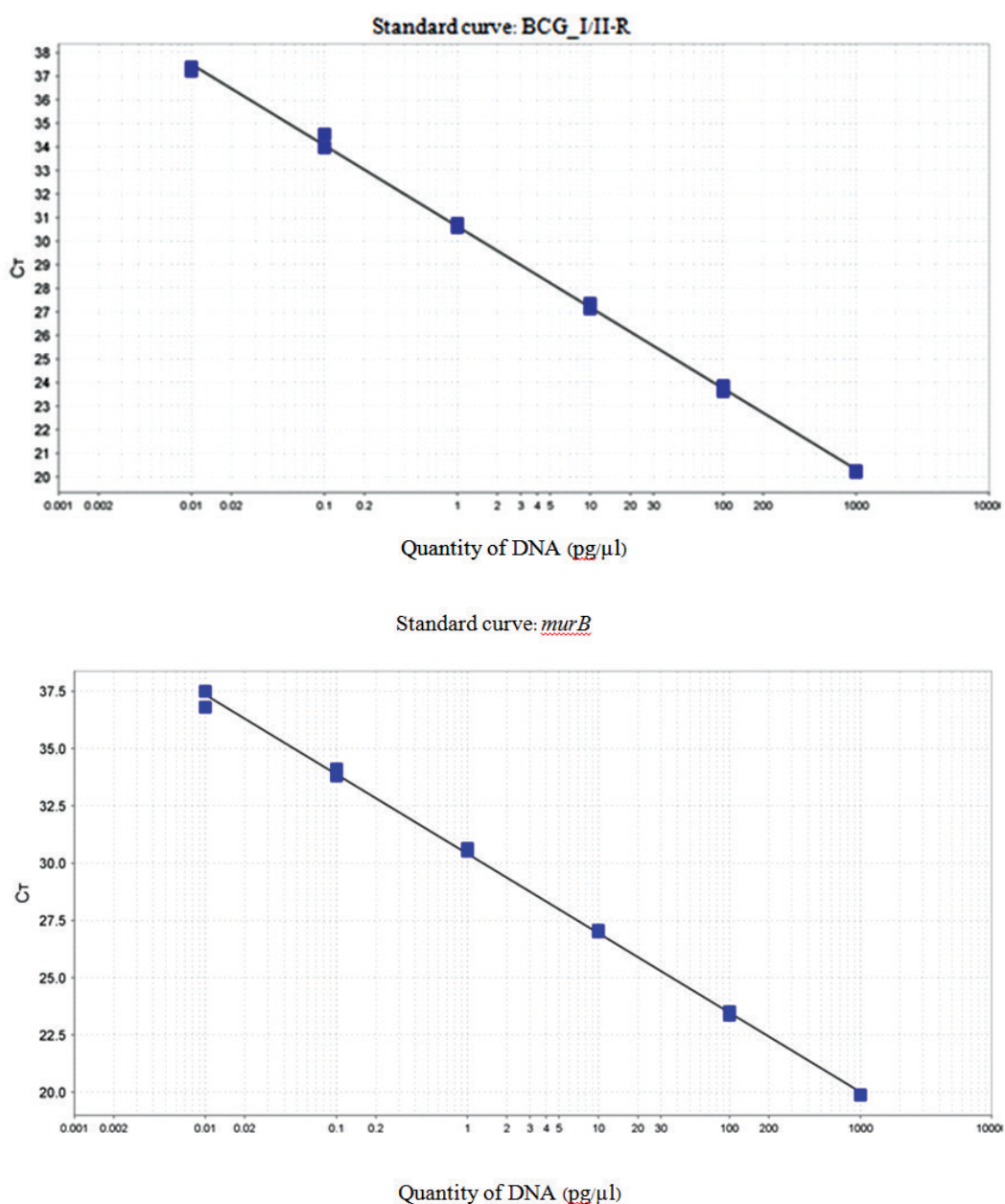


ภาพที่ 2 ผลการตรวจสายพันธุ์เชื้อ BCG /pSO246 จากปฏิกิริยา PCR ที่นำมาแยกขนาดโดยใช้ gel electrophoresis บน 2% agarose

Lane M: ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 bp Ladder; Lane 1: BCG/pSO246; Lane 2: ดีเอ็นเอของ BCG subtype I control; Lane 3: ดีเอ็นเอของ BCG subtype II control; Lane 4: negative control (น้ำกลั่น)

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนา

ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี Real-Time PCR ในการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของสายพันธุ์ย่อยเชื้อ BCG พบว่ากราฟมาตรฐานที่เตรียมจาก BCG subtype II DNA มีความเป็นเส้นตรงในช่วงค่าความเข้มข้นของ DNA ระหว่าง 0.01-1,000 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร ดังแสดงในภาพที่ 3 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานระหว่างค่า cycle threshold (CT) กับความเข้มข้นของดีเอ็นเอของส่วน RD16 target (บน) และ *murB* gene target (ล่าง) ผลวิเคราะห์ค่าของกราฟมาตรฐานจำนวน 6 ครั้ง แสดงในตารางที่ 4 พบว่ากราฟมาตรฐานของชุด RD16 target (BCG_I/II-R) มีค่าเฉลี่ย (mean) $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของ slope เท่ากับ -3.457 ± 0.083 , Y-Intercept เท่ากับ 31.093 ± 0.591 , r^2 เท่ากับ 0.998 ± 0.001 และ % efficiency เท่ากับ 94.741 ± 3.152 สำหรับกราฟมาตรฐานของชุด *murB* gene target มีค่า slope เท่ากับ -3.523 ± 0.069 , Y-Intercept เท่ากับ 30.699 ± 0.423 , r^2 เท่ากับ 0.996 ± 0.003 และ % efficiency เท่ากับ 92.312 ± 2.502 ตามลำดับ



ภาพที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า cycle threshold (CT) กับปริมาณดีเอ็นเอของ BCG subtype II ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.01 - 1,000 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร (pg/μl) ด้วยวิธี Real-Time PCR

ตารางที่ 4 ค่ากราฟมาตรฐานดีเอ็นเอของ BCG subtype II ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.01-1,000 พิโคกรัม ต่อไมโครลิตร โดยวิธี Real-Time PCR

ครั้งที่	r^2		Y-intercept		Slope		%efficiency	
	BCG_I/II-R	<i>murB</i>	BCG_I/II-R	<i>murB</i>	BCG_I/II-R	<i>murB</i>	BCG_I/II-R	<i>murB</i>
1	0.999	0.999	30.624	30.409	-3.438	-3.469	95.389	94.208
2	0.996	0.992	31.791	30.927	-3.324	-3.408	99.918	96.510
3	0.999	0.998	31.194	30.841	-3.520	-3.573	92.367	90.478
4	0.997	0.996	30.467	30.063	-3.541	-3.549	91.615	91.335
5	1.000	0.994	30.696	30.681	-3.410	-3.581	96.448	90.232
6	0.998	0.995	31.784	31.275	-3.510	-3.555	92.708	91.111
mean	0.998	0.996	31.093	30.699	-3.457	-3.523	94.741	92.312
SD	0.001	0.003	0.591	0.423	0.083	0.069	3.152	2.502

จากกราฟมาตรฐานของดีเอ็นเอของ BCG subtype II แสดงให้เห็นว่าวิธีนี้สามารถตรวจดีเอ็นเอของ BCG subtype II ได้ต่ำสุดในระดับ 0.01 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร ผลการศึกษา precision ในหัวข้อ repeatability เมื่อทำการวิเคราะห์หา % ดีเอ็นเอของ BCG subtype II ในตัวอย่างวัคซีนจำนวน 6 ขวด พบว่า % ดีเอ็นเอของ BCG subtype II อยู่ในช่วงค่า 3.07-3.95%, mean±SD เท่ากับ 3.62±0.33% และ %CV เท่ากับ 9.09 (ตารางที่ 5) สำหรับผลการศึกษา intermediate precision พบ % ดีเอ็นเอของ BCG subtype II อยู่ในช่วงค่า 3.31-3.95%, mean±SD เท่ากับ 3.62±0.23 และ %CV เท่ากับ 6.32 (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 5 ความเที่ยงตรงของวิธี Real-time PCR ในการวิเคราะห์ปริมาณ % ดีเอ็นเอของ BCG subtype II ของวัคซีน BCG โดยทดสอบในวันและเวลาเดียวกัน (Repeatability)

ตัวอย่างวัคซีน	ดีเอ็นเอทั้งหมด ของ BCG (pg/μl)	ดีเอ็นเอ ของ subtype II (pg/μl)	% ดีเอ็นเอ ของ BCG subtype II
1	22.407	0.854	3.81
2	26.207	1.000	3.81
3	22.947	0.847	3.69
4	31.550	1.247	3.95
5	35.582	1.092	3.07
6	27.761	0.942	3.39
mean±SD			3.62±0.33
%CV			9.09

ตารางที่ 6 ความเที่ยงตรงของวิธี Real-time PCR ในการวิเคราะห์ปริมาณ % ดีเอ็นเอของ BCG subtype II ของวัคซีน BCG โดยทดสอบต่างวัน (Intermediate precision)

ครั้งที่	ดีเอ็นเอทั้งหมด ของ BCG (pg/μl)	ดีเอ็นเอ ของ subtype II (pg/μl)	% ดีเอ็นเอ BCG subtype II
1	22.583	0.818	3.62
2	33.918	1.339	3.95
3	24.665	0.815	3.31
4	39.578	1.456	3.68
5	40.053	1.543	3.85
6	27.491	0.964	3.51
mean±SD			3.62±0.23
%CV			6.32

ผลการศึกษา accuracy แสดง % recovery ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่เตรียมให้มีสัดส่วนของ subtype I: subtype II จาก 95:5, 60:40 และ 5:95 พบว่าตัวอย่าง subtype II 5% สามารถตรวจ subtype II ได้ค่า mean เท่ากับ 6.49%, recovery เท่ากับ 130% ขณะที่ตัวอย่าง subtype II 40% สามารถตรวจได้ค่า mean เท่ากับ 44.43%, recovery เท่ากับ 111% และเมื่อตัวอย่าง subtype II เป็น 95% สามารถตรวจพบ subtype II ได้ค่า mean เท่ากับ 99.63 และ recovery เท่ากับ 105% แสดงรายละเอียดในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ความถูกต้องของวิธี Real-time PCR ในการวิเคราะห์ปริมาณ % ดีเอ็นเอของ BCG subtype II

% ดีเอ็นเอ BCG subtype I: subtype II	ตัวอย่าง	ดีเอ็นเอทั้งหมด ของ BCG (pg/μl)	ดีเอ็นเอของ subtype II (pg/μl)	% ดีเอ็นเอ ของ BCG subtype II	Mean	% recovery
95:5	1	18.229	1.160	6.37	6.49	130
	2	18.651	1.136	6.09		
	3	19.881	1.246	6.27		
	4	19.585	1.293	6.60		
	5	19.059	1.289	6.76		
	6	20.320	1.397	6.87		
60:40	1	18.738	8.254	44.05	44.43	111
	2	19.840	8.343	42.05		
	3	20.798	8.877	42.68		
	4	19.524	8.538	43.73		
	5	19.493	9.154	46.96		
	6	22.618	10.661	47.13		
5:95	1	17.514	17.262	98.56	99.63	105
	2	19.100	19.003	99.49		
	3	18.933	17.950	94.81		
	4	18.631	19.219	103.15		
	5	18.822	18.947	100.66		
	6	19.997	20.223	101.13		

ปริมาณของ % BCG subtype II ในวัคซีน BCG Tokyo 172-1

จากการนำตัวอย่างวัคซีน BCG ที่ผลิตปี พ.ศ. 2555, 2557 และ 2558 จำนวนปีละ 5 รุ่นการผลิต มาตรวจหาปริมาณ % ดีเอ็นเอของ BCG subtype II ด้วยวิธี Real-Time PCR พบว่าวัคซีนที่ผลิตปี พ.ศ. 2555 มีค่าเฉลี่ย % ดีเอ็นเอของ BCG subtype II อยู่ระหว่าง 7.04–15.25 ขณะที่วัคซีนผลิตปี พ.ศ. 2557 และ 2558 มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 4.98–7.63 และ 4.26–6.59 ตามลำดับ โดยมีค่า %CV ของแต่ละรุ่นการผลิตของทั้งสามปีอยู่ในช่วงค่า 1.46–10.11 ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ปริมาณ % ดีเอ็นเอของ BCG subtype II ในตัวอย่างวัคซีน BCG ที่ผลิตในประเทศ

ปี พ.ศ.	รุ่นการผลิต	ขวดที่	% ดีเอ็นเอของ BCG subtype II	ค่าเฉลี่ย	SD	%CV
2555	A	1	7.19	7.04	0.13	1.89
		2	6.96			
		3	6.96			
	B	1	10.40	10.31	0.15	1.46
		2	10.14			
		3	10.40			
	C	1	15.47	15.25	0.32	2.13
		2	14.88			
		3	15.41			
	D	1	9.12	8.55	0.58	6.73
		2	8.55			
		3	7.97			
	E	1	13.82	12.92	0.80	6.16
		2	12.31			
		3	12.63			
2557	F	1	5.20	5.15	0.18	3.50
		2	5.30			
		3	4.95			
	G	1	4.77	4.99	0.20	3.95
		2	5.15			
		3	5.05			
	H	1	5.22	4.98	0.34	6.80
		2	5.12			
		3	4.59			
	I	1	6.24	6.22	0.10	1.63
		2	6.11			
		3	6.31			
	J	1	7.79	7.63	0.15	1.99
		2	7.60			
		3	7.49			

ตารางที่ 8 ปริมาณ % ดีเอ็นเอของ BCG subtype II ในตัวอย่างวัคซีน BCG ที่ผลิตในประเทศ (ต่อ)

ปี พ.ศ.	รุ่นการผลิต	ขวดที่	% ดีเอ็นเอของ BCG subtype II	ค่าเฉลี่ย	SD	%CV
2558	K	1	6.64	6.05	0.58	9.51
		2	5.49			
		3	6.02			
	L	1	5.04	5.37	0.54	10.11
		2	6.00			
		3	5.08			
	M	1	6.03	6.07	0.14	2.38
		2	5.95			
		3	6.23			
	N	1	6.80	6.59	0.41	6.28
		2	6.85			
		3	6.11			
	O	1	4.25	4.26	0.17	4.00
		2	4.09			
		3	4.43			

วิจารณ์

การเพาะเลี้ยงเชื้อจากวัคซีน BCG เพื่อแยกโคโลนีเดี่ยวของสายพันธุ์ย่อย BCG Tokyo 172 subtype I และ subtype II ที่ใช้เตรียมดีเอ็นเอมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Real-Time PCR พบว่าเป็น BCG subtype I ทั้งหมด ซึ่งมีขนาดของ PCR amplicon น้อยกว่า BCG subtype II สอดคล้องกับการรายงานของ Honda I. และคณะ⁽¹⁰⁾ ที่รายงานลักษณะโคโลนีแบบเรียบและแบบหยาบ และพบการขาดหายของนิวคลีโอไทด์ของ BCG Tokyo 172 subtype I แสดงให้เห็นว่าการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถแยก BCG subtype II ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อจากวัคซีนแม้มีการ subculture ไปไม่ต่ำกว่า 8 ครั้ง ซึ่งอาจเกิดจากการที่สายพันธุ์ย่อยของเชื้อ BCG ในวัคซีนส่วนใหญ่เป็น subtype I ซึ่งเป็น subtype ที่มีลักษณะเป็น “spreading colonies”⁽²²⁾ ทำให้ type I เจริญเติบโตได้ดีกว่า type II และสอดคล้องกับการรายงานของ Shibayama K. และคณะ⁽²³⁾ ที่พบ subtype II 19.5% ใน BCG Tokyo 172-1 และลดลงเหลือเพียง 3.6% เมื่อมีการ subculture ต่อมาเป็น Tokyo 172-2 แสดงว่าจำนวนครั้งของการ subculture ที่เพิ่มขึ้น สามารถส่งผลให้ปริมาณเชื้อ BCG Tokyo 172 subtype II ลดลง ทำให้การเพาะแยกเชื้อ subtype II จากวัคซีนทำได้ยาก นอกจากนี้ลักษณะจำเพาะของเชื้อ BCG ที่ผิวเซลล์มักเกาะกัน การแยกให้เป็นเชื้อเดี่ยวในการ subculture ต้องทำการ subculture มากกว่า 20 ครั้งขึ้นไป จึงจะสามารถแยกสายพันธุ์ที่ปนกันอยู่ได้ในการศึกษานี้จึงได้ใช้เชื้อ BCG Tokyo 172 subtype II สายพันธุ์ BCG/pSO246 ที่ตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพและตรวจยืนยัน subtype ด้วย PCR เพื่อเตรียมดีเอ็นเอมาตรฐานของ subtype II

วิธี Real-Time PCR ที่ใช้ในการศึกษานี้ได้มีการพัฒนาดัดแปลงมาจากวิธีของ Shibayama K. และคณะ⁽²³⁾ ในการตรวจหา subtype I และ subtype II โดยอาศัยความต่างระหว่าง 2 subtypes ในตำแหน่งของ RD16 region จากการใช้ primer และ probe ที่ออกแบบไว้ 2 ชุด คือ ชุดที่ใช้ตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอของ subtype II และชุดที่ใช้ตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ BCG ทั้งหมด ทำให้สามารถคำนวณปริมาณของเชื้อ BCG subtype I ในวัคซีน BCG ได้

ผลการประเมินความถูกต้องเหมาะสมของวิธี Real-Time PCR พบว่ากราฟมาตรฐานของการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ มีความเป็นเส้นตรงในช่วงของการวิเคราะห์ดีเอ็นเอของ BCG subtype II ที่ช่วงความเข้มข้น 0.01–1,000 พิกोगรามต่อไมโครลิตร ซึ่งผลการตรวจสอบความแม่นยำและความเที่ยงตรงของวิธี แสดงให้เห็นว่าวิธี Real-Time PCR สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของ BCG subtype II ในวัคซีนตัวอย่างได้อย่างเที่ยงตรง มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนต่ำ ทั้งการซ้ำในวันเดียวและต่างวันกัน วิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอของ BCG subtype II ได้ใกล้เคียงกับค่าจริง แต่เมื่อปริมาณดีเอ็นเอของ BCG subtype II มีระดับต่ำกว่า 5% ได้ค่าร้อยละการคืนกลับถึง 130 ซึ่งอาจเกิดจาก matrix ที่ใช้ในการเตรียมกราฟมาตรฐานกับ matrix ที่ใช้ในการตรวจความแม่นยำนั้นต่างกัน กล่าวคือกราฟมาตรฐานดีเอ็นเอของ BCG subtype II นั้น *murB* gene target จะถูกเจือจางด้วยดีเอ็นเอของ BCG subtype II เพียงอย่างเดียว ขณะที่การศึกษาความแม่นยำ *murB* gene target จะถูกเจือจางด้วยดีเอ็นเอของ BCG subtype II และ subtype I ประกอบกับกราฟมาตรฐานของ *murB* gene ค่า copy number จะตกอยู่ในช่วง 10–100 พิกोगราม ทำให้ค่าเบี่ยงเบนค่อนข้างสูงในการตรวจวัดปริมาณที่ต่ำ จึงเป็นไปได้ที่จะตรวจพบปริมาณ subtype II ได้ค่าสูงกว่าค่าจริงในวัคซีน ซึ่งส่วนมากจะมี subtype II ต่ำกว่า 10%^(7,23)

จากการตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ subtype II ในวัคซีนที่ผลิตในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2555, 2557 และ 2558 ทั้ง 15 รุ่นการผลิต พบว่าวัคซีน BCG ของประเทศไทยมีเชื้อสายพันธุ์ย่อยทั้งสองสายพันธุ์ไม่แตกต่างจากวัคซีนที่ผลิตจากต่างประเทศ^(7,23) โดยพบว่ามี subtype II น้อยกว่า 10% ในวัคซีน 12 รุ่น และมี subtype II มากกว่า 10% ในวัคซีน 3 รุ่น ที่ผลิตในปี 2555 โดยมีค่าใกล้เคียงกันในรุ่นการผลิตเดียวกันและรุ่นที่ผลิตในปีเดียวกัน ทั้งนี้พบว่าวัคซีนที่ผลิตในปี พ.ศ. 2555 มีปริมาณและความเบี่ยงเบนระหว่างรุ่นการผลิตค่อนข้างสูง เมื่อเทียบกับวัคซีนที่ผลิตในปี พ.ศ. 2557 และ 2558 ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าขั้นตอนการเลือกลักษณะโคโลนีของเชื้อเพื่อนำไปใช้เพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณในกระบวนการผลิตวัคซีนปี พ.ศ. 2557 และ 2558 มีความเข้มงวดมากขึ้น จึงทำให้มีปริมาณ subtype II ในวัคซีนค่อนข้างต่ำคงที่และใกล้เคียงกัน สำหรับปี พ.ศ. 2556 ไม่มีการผลิตวัคซีนจึงไม่มีตัวอย่างนำมาศึกษา

ผลการตรวจสอบสายพันธุ์ย่อยของเชื้อ BCG ในวัคซีนที่ผลิตในประเทศไทย ยืนยันได้ชัดเจนว่าวัคซีน BCG ที่ผลิตในประเทศไทยนั้น ประกอบด้วยเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ย่อย โดยวัคซีนส่วนใหญ่พบเชื้อ subtype II น้อยกว่า 10% จึงเป็นข้อมูลที่ตรงข้ามกับผลการศึกษาของ Wada T. และคณะ⁽¹⁴⁾ ที่รายงานว่าวัคซีน BCG ที่ผลิตจากประเทศไทยเป็น BCG subtype II 100% จากข้อมูลนี้ได้นำไปใช้ยืนยันคุณภาพวัคซีน BCG ที่ผลิตในประเทศไทยว่ามีสัดส่วนของสายพันธุ์ย่อยเชื้อ BCG ที่ไม่แตกต่างจากวัคซีนของต่างประเทศ จึงไม่น่าจะเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์หลังการใช้วัคซีนเพิ่มขึ้นในช่วงเวลาที่ผ่านมา การสอบสวนหาสาเหตุของอาการไม่พึงประสงค์ที่เพิ่มขึ้นนั้นจึงควรพิจารณาปัจจัยอื่นด้วย

สรุป

ข้อมูลจากการตรวจสอบความเหมาะสมของวิธีแสดงให้เห็นว่าวิธี Real-Time PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจวิเคราะห์ BCG subtype II ในวัคซีนได้ถูกต้อง แม่นยำ และเมื่อนำมาใช้ตรวจสอบสายพันธุ์ย่อยในวัคซีน BCG ที่ผลิตปี 2555, 2557 และ 2558 พบว่าวัคซีน BCG ของประเทศไทยมีเชื้อสายพันธุ์ย่อยทั้งสองสายพันธุ์ไม่แตกต่างจากวัคซีนที่ผลิตจากต่างประเทศ โดยวัคซีนส่วนใหญ่มี subtype II น้อยกว่า 10% ข้อมูลที่ได้เป็นประโยชน์ใช้ยืนยันคุณภาพวัคซีน BCG ที่ผลิตในประเทศไทย และอธิบายสัดส่วนของสายพันธุ์ย่อยเชื้อ BCG ในการสอบสวนหาสาเหตุการเกิดอาการไม่พึงประสงค์หลังได้รับวัคซีน ซึ่งวิธี Real-Time PCR ที่พัฒนาขึ้นจะนำไปประยุกต์ใช้เพื่อเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจติดตามสัดส่วนสายพันธุ์ย่อยของเชื้อ BCG ในวัคซีนเพื่อการควบคุมคุณภาพวัคซีนต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ดร.เดือนฉนอม พรหมชาติแก้ว ผู้ทรงคุณวุฒิด้านวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์การแพทย์ (เทคโนโลยีชีวภาพ) ที่อนุเคราะห์เชื้อสายพันธุ์ BCG/pSO246 จากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์ ขอคุณ รศ. สพญ. ดร.ศุภร พงษ์ลัดดา และนางสาวรัตตภา จินลิส ที่ให้ความช่วยเหลือและคำปรึกษาแนะนำทำให้งานสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี และสถาบันวัคซีนแห่งชาติที่สนับสนุนงบประมาณในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. กุลกัญญา โชคไพบูลย์กิจ, เกษวดี ลาภพระ, จุฑารัตน์ เมฆมัลลิกา, จิตติอร นาคบุญนำ, อัจฉรา ตั้งสถาพรพงษ์, บรรณาธิการ. ใน : ตำราวัคซีนและการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคปี 2556. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา; 2556. หน้า 15-6.
2. Bhunbhu T. Expanded programme on immunization in Thailand. Rev Infect Dis 1989; 11(Suppl 3): S514-7.
3. Muangchana C, Thamapornpilas P, Karnkawinpong O. Immunization policy development in Thailand: the role of the Advisory Committee on Immunization Practice. Vaccine 2010; 28 (Suppl 1): A104-9.
4. คณะศึกษาดูงานศึกษาเปรียบเทียบกระบวนการผลิตและควบคุมคุณภาพวัคซีนบีซีจี. เอกสารรายงานการหาสาเหตุและแก้ไขปัญหาการเกิดอาการข้างเคียงหลังได้รับวัคซีนบีซีจีของประเทศ. วันที่ 1-2 มิถุนายน 2560. กรุงเทพฯ : Japan BCG Laboratory; 2560.
5. World Health Organization. WHO expert committee on biological standardization sixty-second report. WHO Technical report series 2013; 979: 137-60.
6. Brosch R, Gordon SV, Garnier T, Eiglmeier K, Frigui W, Valenti P, et al. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. Proc Natl Acad Sci 2007; 104: 5596-601.
7. Seki M, Honda I, Fujita I, Yano I, Yamamoto S, Koyama A. Whole genome sequence analysis of Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin (BCG) Tokyo 172: a comparative study of BCG vaccine substrains. Vaccine 2009; 27: 1710-6.
8. Gomes LH, Otto TD, Vasconcellos EA, Ferrão PM, Maia RM, Moreira AS, et al. Genome sequence of Mycobacterium bovis BCG Moreau, the Brazilian vaccine strain against tuberculosis. J Bacteriol 2011; 193: 5600-1.
9. Bedwell J, Kairo SK, Behr MA, Bygraves JA. Identification of substrains of BCG vaccine using multiplex PCR. Vaccine 2001; 19: 2146-51.
10. Honda I, Seki M, Ikeda N, Yamamoto S, Yano I, Koyama A, et al. Identification of two subpopulations of bacillus Calmette-Guérin (BCG) Tokyo 172 substrain with different RD16 regions. Vaccine 2006; 24: 4969-74.
11. Gheorghiu M, Lagrange PH. Viability, heat stability and immunogenicity of four BCG vaccines prepared from four different BCG strains. Ann Immunol (Inst Pasteur) 1983; 134C: 125-47.
12. Seki M, Sato A, Honda I, Yamazaki T, Yano I, Koyama A, et al. Modified multiplex PCR for identification of Bacillus Calmette-Guérin substrain Tokyo among clinical isolates. Vaccine 2005; 23: 3099-102.

13. เอกสารรายงานการประชุมหรือโครงการวิจัยและพัฒนาเกี่ยวกับวัคซีนบีซีจี. วันที่ 3 พฤษภาคม 2559. นนทบุรี : สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข; 2559.
14. Wada T, Maruyama F, Iwamoto T, Maeda S, Yamamoto T, Nakagawa I, et al. Deep sequencing analysis of the heterogeneity of seed and commercial lots of the bacillus Calmette-Gue'rin (BCG) tuberculosis vaccine substrain Tokyo-172. *Sci Rep* 2015; 5: 18727. (9 p.).
15. Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol. [Online]. [cited 2018 Jun 20]; [2 screens]. Available from: URL: https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/212352.pdf.
16. Seven H11 Agars. [Online]. [cited 2018 Jun 20]; [4 screens]. Available from: URL: https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/283810.pdf.
17. สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. การตรวจสอบความแรงและความคงตัวของวัคซีนบีซีจี. ใน : วิษุตา จริยพันธุ์, สุภาพร ภูมิอมร, สกาสิน ไตรศิริวัฒน์, วิริยามาตย์ เจริญคุณธรรม, พันธวิทย์ นทกุล, สายวรุฬ จตุรกีตตินันท์, คณะบรรณาธิการ. มาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ยาชีววัตถุ เล่ม 1. กรุงเทพฯ : บริษัท Full Force จำกัด; 2558. หน้า 19.
18. *Mycobacterium bovis* BCG strain Tokyo 172 substrain TRCS, complete genome NCBI Reference Sequence: NZ_CP014566.1. [Online]. 2019; [cited 2019 Mar 25]. Available from: URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NZ_CP014566.1?report=fasta.
19. Baulard AR, Gurdyal S, Besra GS, Brennan PJ. The cell-wall core of mycobacterium: structure, biogenesis and genetics. In: Ratledge C, Dale JW, editors. *Mycobacteria: molecular biology and virulence*. London: Blackwell Science Ltd; 1999. P. 244.
20. *Mycobacterium bovis* subsp. *bovis* AF2122/97 complete genome GenBank: BX248333.1. [Online] 2019; [cited 2019 Mar 25]. Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/BX248333.1?report=fasta>.
21. Isolation of Genomic DNA from Mycobacteria. [Online]. [cited 2017 Feb 2]; [2 screens]. Available from: URL: <http://www.molecularartb.org/gb/pdf/protocols/Isolation.pdf>.
22. Osborn TW. BCG vaccine: and investigation of colony morphology from four different strains after their introduction as seed for vaccine preparation in four production laboratories. *J Biol Stand* 1983; 11: 19-27.
23. Shibayama K, Mochida K, Yagi T, Mori S, Arakawa Y, Yamamoto S. Quantification of two variant strains contained in freeze-dried Japanese BCG vaccine preparation by real-time PCR. *Biologicals* 2007; 35: 139-43.

Investigation of BCG Tokyo 172-1 Subpopulations in Tuberculosis Vaccine Produced in Thailand using Real-Time PCR

Wereyarmarst Jaroenkunathum* Sompong Sapsutthipas* Nuanjun Wichukchinda
and Supaporn Phumiamorn***

**Institute of Biological Products, **Medical Life Science Institute, Department of Medical Sciences,
Nonthaburi 11000, Thailand*

Abstract Subpopulations of BCG Tokyo-172-1 in tuberculosis vaccines manufactured in Thailand have not been investigated, therefore, a method using Real-Time Polymerase Chain Reaction (Real-Time PCR) was developed and validated to determine BCG Tokyo-172-1 subpopulations in 15 lots of vaccines manufactured in 2012, 2014 and 2015. Our validation results showed good performance on linearity with coefficient of determination (r^2) was greater than 0.99. The developed method demonstrated its precision and accuracy, as determined by percentages of coefficient of variance (CV) and recovery range, was <10 and 105-130, respectively. In addition, less than 10% of subtype II was found in 12 lots and more than 10% of subtype II was determined in 3 lots that were produced in 2012. Our study suggested that the established Real-Time PCR method was suitable to detect subpopulations of BCG Tokyo-172-1 and BCG vaccine produced in Thailand contained both subtypes.

Keywords: BCG Tokyo 172-1, tuberculosis vaccine, Real-Time PCR

การสร้างเซลล์ลูกผสม Dendritic cells กับเซลล์ มะเร็งเต้านมในหลอดทดลองเพื่อกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกัน

สุภาพร สุภารักษ์* ตะวันฉาย แสงเจริญ* และบุษราวรรณ ศรีวรรณ**

*สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข **สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์
นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ Dendritic cells (DCs) ของผู้ป่วยมะเร็งไม่สามารถตรวจจับและนำเสนอเซลล์มะเร็งเพื่อกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวให้ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้เกิดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง การศึกษานี้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ DCs ในหลอดทดลองและกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T lymphocyte และ Natural Killer (NK) cell ให้ทำลายเซลล์มะเร็งเต้านม โดยคัดแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์จาก Buffy coat ของโลหิตบริจาคจำนวน 6 ราย กระตุ้นให้เป็น DCs ด้วย GM-CSF และ IL-4 เป็นเวลา 6 วัน และตรวจวัดคุณสมบัติของ DCs ด้วยวิธี Flow Cytometry พบว่าเซลล์ดังกล่าวมีการแสดงออกของ CD11c และ HLA-DR และลดการแสดงออกของ CD14 จากนั้นนำ DCs มาสร้างเซลล์ลูกผสมกับเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ตรวจวัดผลสำเร็จการสร้างเซลล์ลูกผสม ด้วยวิธี Flow Cytometry พบว่าสามารถสร้างเซลล์ลูกผสมได้ คิดเป็นร้อยละเฉลี่ย 34.67 จากการทดสอบประสิทธิภาพของเซลล์ลูกผสม พบว่าสามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวน T lymphocyte เฉลี่ยจากร้อยละ 24.55 เป็นร้อยละ 72.00 และเพิ่มประสิทธิภาพ NK cell ในการทำลายเซลล์มะเร็งเต้านมเฉลี่ยจากร้อยละ 22.91 เป็นร้อยละ 65.59 การศึกษานี้สามารถเป็นต้นแบบในการเพาะเลี้ยงเซลล์ลูกผสม DCs และเพื่อใช้พัฒนาเป็นทางเลือกสำหรับรักษาผู้ป่วยมะเร็งเต้านมต่อไป

Corresponding author E-mail: supaporn.su@dmssc.mail.go.th

Received: 23 November 2017

Revised: 31 August 2018

Accepted: 18 March 2019

บทนำ

รายงานอุบัติการณ์มะเร็งรายใหม่ของประเทศไทย พบมะเร็งเต้านมสูงเป็นอันดับหนึ่งในหญิงไทย คิดเป็นร้อยละ 41.96 ของผู้ป่วยมะเร็งทั้งหมด⁽¹⁾ การรักษามะเร็งด้วยการผ่าตัด การฉายแสง และการให้ยาเคมีบำบัดไม่สามารถทำลายเซลล์มะเร็งได้ทั้งหมด ยังมีการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังอวัยวะต่าง ๆ ได้ทั่วร่างกาย เนื่องจากเซลล์มะเร็งของผู้ป่วยสามารถยับยั้งการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันทำให้เกิดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งมากขึ้น⁽²⁾ การวิจัยพัฒนาวิธีการรักษามะเร็งให้มีประสิทธิภาพ ไม่กลับมาเป็นซ้ำหรือแพร่กระจาย จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง ปัจจุบันมีการพัฒนารักษามะเร็งโดยกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านทานในผู้ป่วย โดยใช้วิธีการกระตุ้นเซลล์ของผู้ป่วยเองหรือนำเซลล์ของผู้อื่นมากระตุ้นภูมิคุ้มกันในผู้ป่วย เพื่อทำให้สามารถทำลายและยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้ ปัจจุบันการเพิ่มประสิทธิภาพของ Dendritic cells (DCs) เป็นทางเลือกที่ได้รับความนิยมอย่างมาก เนื่องจาก DCs เป็นเซลล์ที่ตรวจจับนำเสนอเซลล์มะเร็งและกระตุ้นการแบ่งตัวของ T lymphocyte เพื่อเสริมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน และกระตุ้นการทำงานของ NK cell เพื่อทำลายเซลล์มะเร็งอย่างมีประสิทธิภาพ⁽³⁻⁴⁾ โดยมีรายงานว่า การสร้างเซลล์ลูกผสม DCs กับเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ สามารถกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกันให้ตอบสนองและทำลายเซลล์มะเร็งอย่างมีประสิทธิภาพ^(5, 6)

วิธีการสร้างเซลล์ลูกผสม DCs ในระดับห้องปฏิบัติการสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ 1) วิธีทางกายภาพ เช่น การใช้กระแสไฟฟ้าเหนี่ยวนำให้เกิดการเชื่อมกันระหว่างเซลล์⁽⁷⁾ 2) วิธีทางชีวภาพ เช่น การใช้ไวรัสเป็นตัวนำพาให้สร้างเซลล์ลูกผสมในเซลล์เป้าหมาย⁽⁸⁾ และ 3) วิธีการใช้สารเคมีที่มีคุณสมบัติทำให้เกิดการเชื่อมกันระหว่าง DCs และเซลล์มะเร็ง เช่น สารเคมี polyethylene glycol⁽⁹⁾ lysplecithin⁽¹⁰⁾ และ fusogen⁽¹¹⁾ เป็นต้น

การศึกษานี้ได้กระตุ้น DCs โดยสร้างเซลล์ลูกผสม DCs กับเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง โดยใช้ polyethylene glycol และทดสอบประสิทธิภาพของเซลล์ลูกผสม DCs ต่อการแบ่งตัวของ T lymphocyte และกระตุ้นการทำงานของ NK cell

วัสดุและวิธีการ

การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านม

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 (ATCC® HTB-22™, human breast cancer adenocarcinoma cell line) ใน culture flask ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco Modified Eagle Medium (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) 1% Penicillin/Streptomycin (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) และ 10% fetal bovine serum (FBS; Grand Island Biological Company, Grand Island, NY, USA) บ่มเซลล์มะเร็งในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (°C) ในสภาวะที่มี 5% CO₂ ตรวจสอบการเจริญของเซลล์มะเร็งภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อเซลล์มะเร็งแบ่งตัวจนได้เซลล์ประมาณร้อยละ 80-90 ของพื้นที่เพาะเลี้ยง จึงนำมาย่อยด้วยสารละลาย 0.05% Trypsin-EDTA (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) ที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะที่มี 5% CO₂ นาน 2-5 นาที แล้วนำเซลล์ที่ย่อยได้ไปเพาะเลี้ยงต่อ หรือนำไปทดลองในขั้นตอนต่อไป

การเตรียม DCs

นำ Leukocyte-Enriched Buffy coats จากอาสาสมัครจำนวน 6 ราย มาปั่นคัดแยก Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) โดยใช้ IsoPrep (Robbins Scientific, Sunnyvale, CA, USA) แล้วนำมาคัดแยกเซลล์โมโนไซต์ ด้วยวิธี CD14 positive cells purification โดยใช้ Immunomagnetic Microbeads (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) ตรวจสอบความบริสุทธิ์ (purity) และความเหมือน (identity) ของเซลล์โมโนไซต์โดยวิธี Flow cytometry ด้วยเครื่อง FACS Calibur instrument (BD Biosciences,

San Jose, CA, USA) นำเซลล์โมโนซัยท์ ที่ได้มากระตุ้นให้เป็น DCs โดยเฉพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะที่มี 5% CO₂ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 Medium (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) ที่มีไซโตไคน์ 1,000 unit/ml Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF; Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) 500 unit/ml interleukin-4 (IL-4; Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) 10% FBS และ 1% penicillin/streptomycin เป็นเวลา 5-7 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2 วัน เมื่อครบเวลา ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์โมโนซัยท์ไปเป็นเซลล์ DCs โดยย้อมกลุ่มของโปรตีนบนผิวเซลล์ (Cluster of differentiation, CD) ที่ปรากฏขึ้นหรือเปลี่ยนแปลงไปหลังจากการกระตุ้นเซลล์โมโนซัยท์ด้วยไซโตไคน์ GM-CSF และ IL-4 โดยย้อมด้วยสาร antibody ที่จำเพาะกับโปรตีนชนิดต่าง ๆ บนผิวเซลล์ และติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (fluorophore) ได้แก่ anti-CD14-FITC, anti-CD11c-FITC, anti-HLA-DR-PE monoclonal antibody; Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) ตรวจวัดโปรตีนบนผิวเซลล์ที่จับกับ antibody ด้วยเครื่อง FACS Calibur instrument (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

ตัวอย่าง Leukocyte-Enriched Buffy coats จากอาสาสมัคร ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย โดยได้รับการยินยอมตามกระบวนการบริจาคโลหิต และไม่สามารถระบุถึงตัวบุคคลผู้บริจาคได้

การคัดแยก T lymphocyte (CD3⁺) หรือ NK cell (CD3⁻ CD56⁺)

คัดแยก T lymphocyte (CD3⁺) ด้วยชุด EasySep™ Human CD3 Positive Selection Kit (STEM CELL technologies, Vancouver, Canada) และคัดแยก NK cell (CD3⁻ CD56⁺) ด้วยชุด Easy Sep™ Human CD56 Positive Selection Kit (STEM CELL technologies, Vancouver, Canada) โดยนำ PBMCs ปริมาณ 1 x 10⁶ เซลล์ เติมนลงใน EasySep® CD3 Positive selection cocktail ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร สำหรับคัดแยก T lymphocyte หรือ EasySep® CD56 Positive selection cocktail สำหรับคัดแยก NK cell ผสมเบา ๆ แล้ว บ่มที่ 25±5 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วเติม EasySep® magnetic nanoparticles cocktail ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร สำหรับ T lymphocyte หรือ NK cell นำไปบ่มที่ 25±5 °C เป็นเวลา 10 นาที แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 2.5 มิลลิลิตร ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 และ 10% FBS จากนั้นนำไปวางใน EasySep® Magnet เป็นเวลา 5 นาที จึงเท supernatantทิ้ง แล้วเติม RPMI 1640 และ 10% FBS ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ทำซ้ำเช่นเดิม หลังจากนั้นตรวจวัดคุณสมบัติของเซลล์ด้วยเครื่อง FACS Calibur instrument (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)

การสร้างเซลล์ลูกผสม DCs กับเซลล์มะเร็งเต้านม (DCs - MCF-7 fusion cells)

ผสมเซลล์เพาะเลี้ยง DCs จากอาสาสมัครแต่ละราย (มีการแสดงออกของโปรตีน HLA-DR บนผิวเซลล์, HLA-DR⁺) กับเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยง MCF-7 (มีการแสดงออกของโปรตีน MUC1 บนผิวเซลล์, MUC1⁺) ในอัตราส่วน 10:1 แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ด้วย RPMI 1640 และ 10% FBS จากนั้นนำไปปั่นที่ 1,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติม 50% polyethylene glycol (Sigma, St. Louis, MO, USA) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 37°C ในสภาวะที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาเติม RPMI 1640 และ 10%FBS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นที่ 1,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม RPMI 1640 และ 10%FBS ที่มี 1,000 unit/ml GM-CSF และ 500 unit/ml IL-4 และนำไปเลี้ยงที่ 37°C ในสภาวะที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาตรวจวัดคุณสมบัติของเซลล์ลูกผสมที่ได้ด้วยเครื่อง FACS Calibur instrument (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) โดยเซลล์ลูกผสม DCs (DCs - MCF-7 fusion cells) ต้องมีการแสดงออกของโปรตีนทั้ง HLA-DR และ MUC1 บนผิวเซลล์ นำเซลล์ลูกผสมไปปั่นที่ 1,200 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปทดสอบประสิทธิภาพต่อไป

การทดสอบประสิทธิภาพเซลล์ลูกผสม DCs

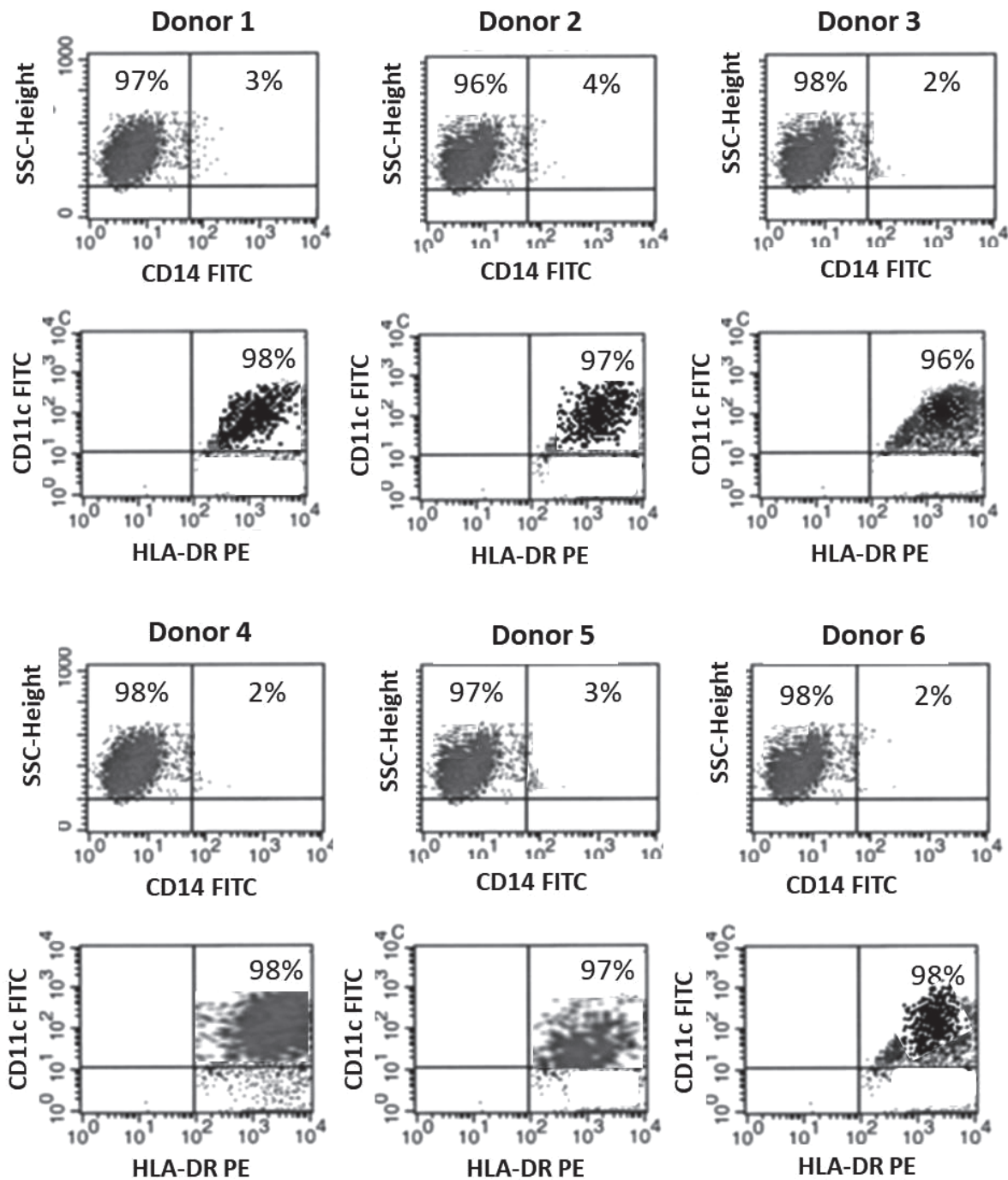
การเพิ่มจำนวน *T lymphocytes* นำเซลล์ลูกผสม DCs กับเซลล์มะเร็งเต้านม (DCs – MCF-7 fusion cells) ที่เตรียมได้มาทดสอบประสิทธิภาพ ด้วยการวัดผลกระตุ้นการเพิ่มจำนวน *T lymphocyte* โดยนำ *T lymphocyte* ที่แยกไว้มาย้อมด้วยสารเรืองแสง Carboxyfluorescein succinimidylester (CFSE; Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์ลูกผสม โดยนำไปบ่มที่ 37°C ในสภาวะที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำเซลล์มาย้อมด้วยสารเรืองแสง Propidium iodide (PI; Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) ตรวจวัด *T lymphocyte* ที่เพิ่มจำนวนด้วยเครื่อง Guava® easyCyte Flow Cytometer (Millipore Corp, Hayward, CA, USA) โดยที่ negative control คือ *T lymphocyte* ที่ถูกกระตุ้นด้วย DCs ที่ไม่สร้างเซลล์ลูกผสม (DCs non-fusion cells) และ positive control คือ *T lymphocyte* ที่ถูกกระตุ้นด้วย Phytohemagglutinin (PHA; Sigma, St. Louis, MO, USA) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดย *T lymphocyte* ที่ถูกกระตุ้น (แสดงผลเป็น %) มีการติดสี CFSE และย้อมไม่ติดสี PI

การเพิ่มความสามารถ *NK cell* ในการทำลายเซลล์มะเร็งเต้านม นำ *NK cell* ที่คัดแยกไว้มากกระตุ้นด้วยเซลล์ลูกผสม (DCs – MCF-7 fusion cells) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำ *NK cell* ที่ถูกกระตุ้นมาเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยง MCF-7 ที่ย้อมด้วยสารเรืองแสง CFSE ที่ขนาดความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 15 นาที หลังจากบ่มที่ 37°C ในสภาวะที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 4 – 6 ชั่วโมง จึงนำมาย้อมสารเรืองแสง PI และตรวจวัดการทำลายเซลล์มะเร็งเต้านม ด้วยเครื่อง Guava® easyCyte Flow Cytometers (Millipore Corp, Hayward, CA, USA) โดยที่ negative control คือ *NK cell* ที่ถูกกระตุ้นด้วย DCs ที่ไม่สร้างเซลล์ลูกผสม (DCs non-fusion cells) และ positive control คือ *NK cell* ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยเซลล์มะเร็งเต้านมที่ถูกทำลาย (แสดงผลเป็น %) ย้อมติดสี CFSE และสี PI

ผล

การเพาะเลี้ยง DCs

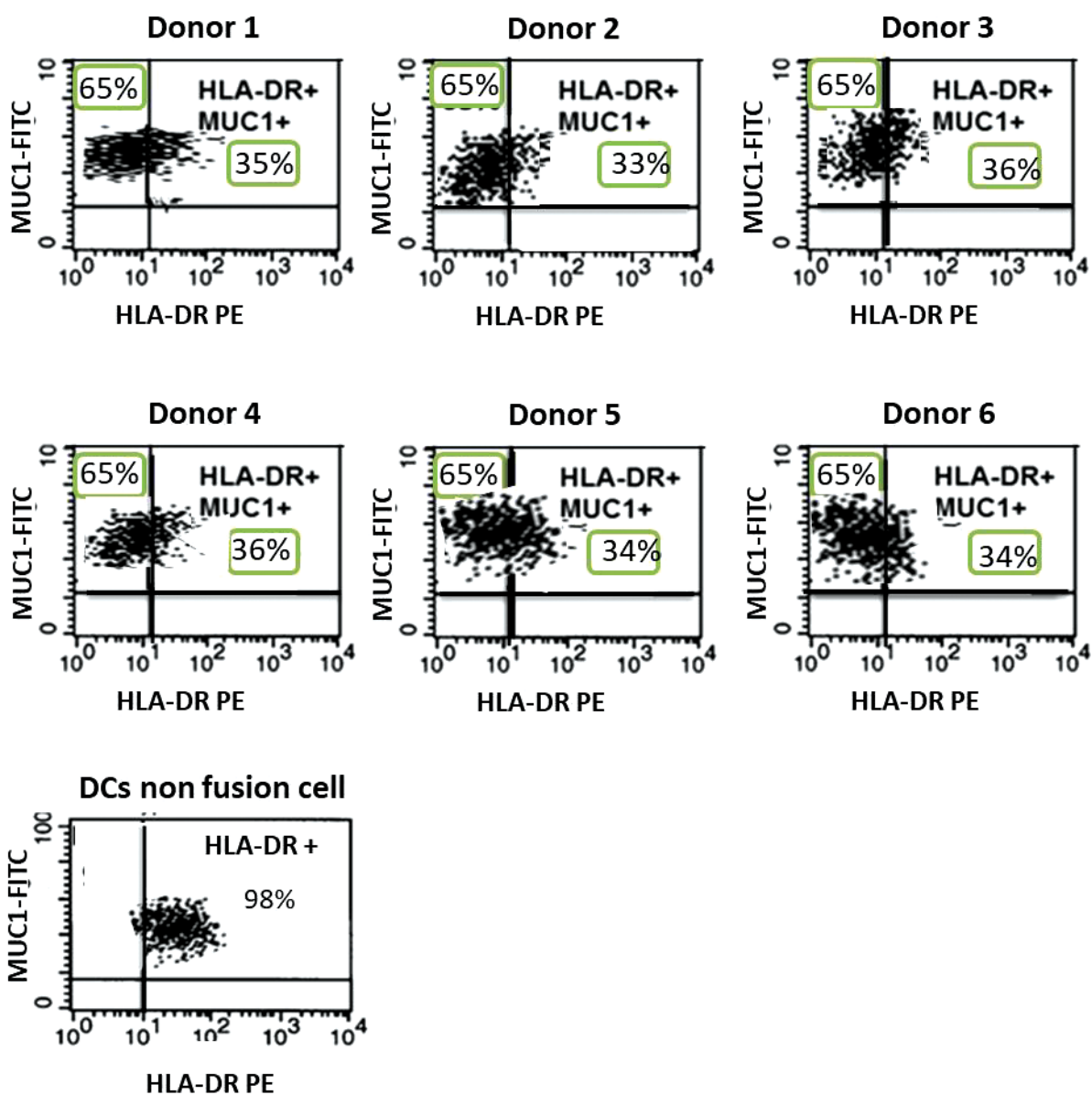
ผลการคัดแยกเซลล์โมโนซัยท์และนำมาเพาะเลี้ยงกระตุ้นด้วยไซโตไคน์ GM-CSF และ IL-4 เพื่อให้เปลี่ยนคุณสมบัติจากเซลล์โมโนซัยท์ไปเป็น DCs จากการตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์โมโนซัยท์หลังกระตุ้น พบว่าบนผิวเซลล์โมโนซัยท์ที่เปลี่ยนเป็น DCs ของอาสาสมัครแต่ละราย มีการแสดงออกของโปรตีน CD14 บนผิวเซลล์ลดลง ขณะที่ CD11c และ HLA-DR มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น ได้เซลล์เพาะเลี้ยง DCs (DCs generation) สำเร็จเฉลี่ย ร้อยละ 97.33 (ตารางที่ 1) ผลตรวจวัดคุณสมบัติของ DCs จากอาสาสมัคร 6 ราย ด้วยเครื่อง flow cytometer (ภาพที่ 1) โดยเซลล์เพาะเลี้ยง DCs ลดการแสดงออกของโปรตีน CD 14 และมีการแสดงออกของโปรตีนทั้ง CD11c และ HLA-DR (CD11c⁺ HLA-DR⁺) บนผิวเซลล์



ภาพที่ 1 คุณสมบัติเซลล์เพาะเลี้ยง DCs จากอาสาสมัคร (Donor) ทั้งหมด 6 ราย หลังจากคัดแยกเซลล์โมโนซัยท์และกระตุ้นด้วย GM-CSF และ IL-4 เพื่อเปลี่ยนเป็นเซลล์ DCs ตรวจวัดด้วยเครื่อง Flow cytometer โดยคัดแยกตามขนาด ส่วนประกอบโครงสร้างภายในเซลล์ (side scatter, SSC-Height) และการแสดงออกของโปรตีน CD14 CD11c และ HLA-DR บนผิวเซลล์

การสร้างเซลล์ลูกผสม DCs กับเซลล์มะเร็งเต้านม (DCs - MCF-7 fusion cells)

สร้างเซลล์ลูกผสม DCs กับเซลล์มะเร็งเต้านม (DCs - MCF-7 fusion cells) โดยนำเซลล์เพาะเลี้ยง DCs ของอาสาสมัครแต่ละราย ที่มีคุณสมบัติแสดงออกโปรตีน HLA-DR บนผิวเซลล์ (HLA-DR⁺) มาผสมกับเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยง ที่มีคุณสมบัติแสดงออกโปรตีน MUC1 บนผิวเซลล์ (MUC1⁺) โดยใช้สารเคมี polyethylene glycol เพื่อให้เซลล์รวมกันได้เซลล์ลูกผสม พบว่า DCs ของอาสาสมัครทั้ง 6 ราย สามารถรวมกับ MCF-7 ได้ผลอัตราการสร้างเซลล์ลูกผสมสำเร็จ เฉลี่ยร้อยละ 34.67 (ตารางที่ 1) ผลตรวจวัดคุณสมบัติของเซลล์ลูกผสมจากเซลล์เพาะเลี้ยง DCs จากอาสาสมัคร 6 ราย ด้วยเครื่อง flow cytometer (ภาพที่ 2) โดยเซลล์ลูกผสมมีการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์ทั้ง HLA-DR และ MUC1 (HLA-DR⁺ MUC1⁺) ขณะที่เซลล์เพาะเลี้ยง DCs ที่ไม่สร้างเซลล์ลูกผสมมีการแสดงออกเฉพาะโปรตีน HLA-DR บนผิวเท่านั้น (HLA-DR⁺)

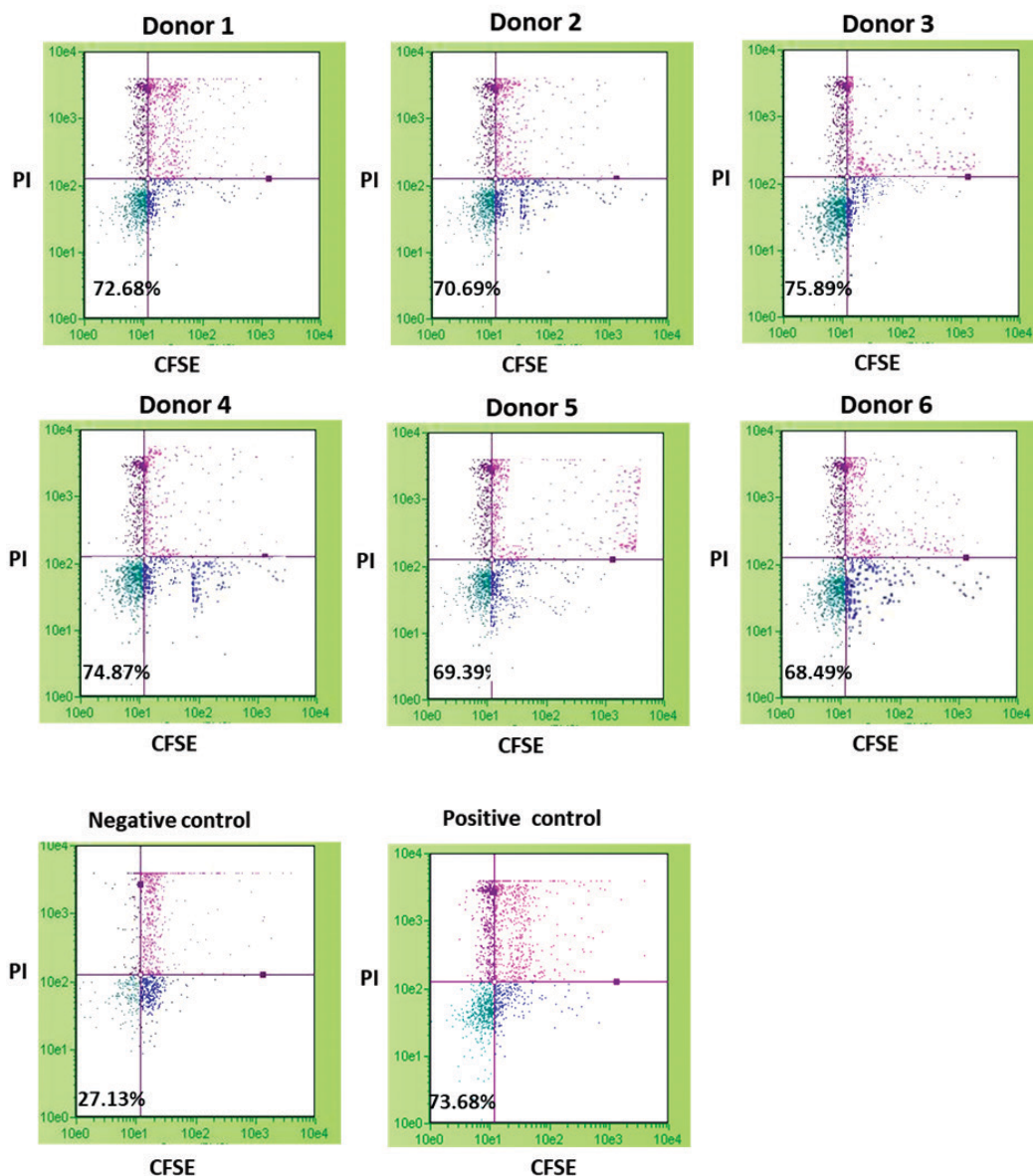


ภาพที่ 2 คุณสมบัติเซลล์ลูกผสม DCs กับเซลล์มะเร็งเต้านม (DCs - MCF-7 fusion cells) จากอาสาสมัคร (Donor) ทั้งหมด 6 ราย ตรวจวัดโปรตีน HLA-DR และ MUC1 บนผิวเซลล์ ด้วยเครื่อง Flow cytometer

การทดสอบประสิทธิภาพเซลล์ลูกผสม DCs กับเซลล์มะเร็งเต้านม (DCs - MCF-7 fusion cells)

การกระตุ้นเพิ่มจำนวนของ T lymphocyte

นำเซลล์ลูกผสม DCs (DCs - MCF-7 fusion cells) มาทดสอบประสิทธิภาพกระตุ้นการเพิ่มจำนวน T lymphocyte พบว่าเซลล์ลูกผสมของอาสาสมัครทั้ง 6 ราย สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวน T lymphocyte ได้เฉลี่ยร้อยละ 75.89 ขณะที่เซลล์เพาะเลี้ยง DCs ที่ไม่สร้างเซลล์ลูกผสม (DCs non-fusion cells) กระตุ้น T lymphocyte เฉลี่ยร้อยละ 24.55 (ตารางที่ 1) ผลทดสอบกระตุ้น T lymphocyte ด้วยเซลล์ลูกผสม DCs - MCF-7 fusion cells จากอาสาสมัคร 6 ราย (ภาพที่ 3) โดย T lymphocyte ที่ถูกกระตุ้นและเพิ่มจำนวนมีการติดสี CFSE ลดลงและไม่ติดสี PI



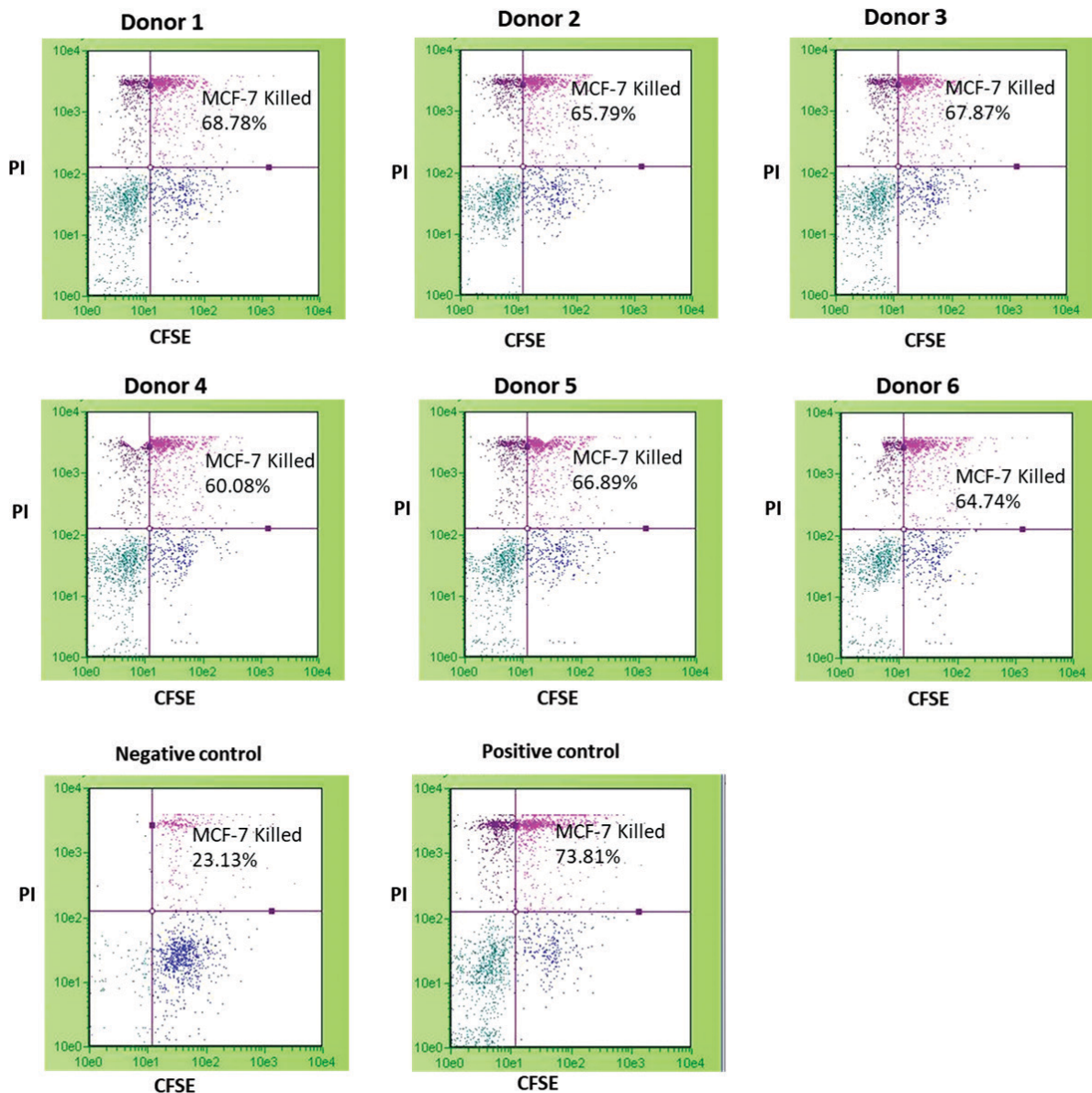
ภาพที่ 3 ผลทดสอบประสิทธิภาพเซลล์ลูกผสมกระตุ้นการเพิ่มจำนวน T lymphocytes จากอาสาสมัคร (Donor) ทั้งหมด 6 ราย ตรวจวัดด้วยเครื่อง Flow cytometer

Negative control: T lymphocytes ถูกกระตุ้นด้วย DCs ที่ไม่ได้สร้างเซลล์ลูกผสม (แสดงเฉพาะ Donor 1)

Positive control: T lymphocytes ถูกกระตุ้นด้วย PHA (แสดงเฉพาะ Donor 1)

การทำลายเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงโดย NK cell

ผลทดสอบประสิทธิภาพเซลล์ลูกผสม DCs (DCs - MCF-7 fusion cells) ต่อการกระตุ้น NK cell ให้ทำลายเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยง MCF-7 พบว่าเซลล์ลูกผสม DCs สามารถเพิ่มประสิทธิภาพ NK cell ให้ทำลายเซลล์มะเร็งเต้านมได้สูงสุดถึง ร้อยละ 68.89 ขณะที่เซลล์เพาะเลี้ยง DCs ที่ไม่สร้างเซลล์ลูกผสม (DCs non-fusion cells) กระตุ้น NK cell ทำลายเซลล์มะเร็งเต้านม เฉลี่ยร้อยละ 22.91 (ตารางที่ 1) ผลทดสอบเซลล์ลูกผสม DCs - MCF-7 fusion cells จากอาสาสมัคร 6 ราย (ภาพที่ 4) โดยเซลล์มะเร็งเต้านมที่ถูกทำลายจะย้อมติดทั้งสี CFSE และสี PI



ภาพที่ 4 ผลทดสอบประสิทธิภาพเซลล์ลูกผสมกระตุ้น NK cells ทำลายเซลล์มะเร็งเต้านม จากอาสาสมัคร (Donor) ทั้งหมด 6 ราย ตรวจวัดด้วยเครื่อง Flow cytometer

Negative control: NK cells ถูกกระตุ้นด้วย DCs ที่ไม่ได้สร้างเซลล์ลูกผสม (แสดงเฉพาะ Donor 1)

Positive control: NK cells ถูกกระตุ้นด้วย PHA (แสดงเฉพาะ Donor 1)

ตารางที่ 1 ผลการเพาะเลี้ยง DCs (DCs generation) การสร้างเซลล์ลูกผสม (DCs - MCF-7 fusion cells) และประสิทธิภาพของเซลล์ลูกผสมต่อการเพิ่มจำนวนของ T lymphocyte และการทำลายเซลล์มะเร็งเต้านมของ NK cell ของอาสาสมัคร (Donor) 6 ราย

DCs features (%)	Donor						Mean (%)
	1	2	3	4	5	6	
DCs generation	98	97	96	98	97	98	97.33
DCs - MCF-7 fusion cells	35	33	36	36	34	34	34.67
DCs - MCF-7 fusion cells induced T cell proliferation	72.68	70.69	75.89	74.87	69.39	68.49	72.00
DCs non - fusion cells induced T cell proliferation	27.13	25.47	26.48	24.15	22.64	21.47	24.55
DCs - MCF-7 fusion cells induced NK cell kill MCF-7 cells	68.78	65.79	67.87	60.08	66.89	64.74	65.69
DCs non - fusion cells induced NK cell kill MCF-7 cells	23.13	24.58	25.34	23.47	23.78	21.89	22.91

วิจารณ์

การสร้างเซลล์ลูกผสมเป็นทางเลือกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของ DCs ในหลอดทดลองเพื่อให้ DCs สามารถตรวจจับ นำเสนอเซลล์มะเร็งและกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน การศึกษานี้ใช้ polyethylene glycol โมลโมเลกุล 1450 ความเข้มข้น 50% ซึ่งสามารถเพิ่มแรงดึงดูด ชักนำให้เกิดความไม่เสถียร ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดการเชื่อมกันระหว่างเซลล์ และไม่เกิดผลเสียต่อเซลล์^(9, 12) เพื่อสร้างเซลล์ลูกผสม DCs จากอาสาสมัครสุขภาพดีกับเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงที่ได้อัตราความสำเร็จเฉลี่ย 34.67% สอดคล้องกับรายงานการสร้างเซลล์ลูกผสม DCs-tumor cells ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม ที่อัตราส่วน DCs ต่อเซลล์มะเร็ง 3:1 ถึง 10:1 ใน 50% polyethylene glycol พบว่าได้ผลความสำเร็จ 18-71% แตกต่างกันผู้ป่วยแต่ละราย⁽¹³⁾ การสร้างเซลล์ลูกผสมในผู้ป่วยเนื้องอกไกลิโอมา (Glioma) ในอัตราส่วน DCs ต่อเซลล์มะเร็ง 3:1 ใน 50% polyethylene glycol พบว่าได้ผลความสำเร็จ 66.2%⁽¹⁴⁾ และการสร้างเซลล์ลูกผสม DCs กับเซลล์มะเร็งลำไส้ ที่อัตราส่วน 10:1 ใน 50% polyethylene glycol พบว่าผลจากเซลล์มะเร็งลำไส้เพาะเลี้ยงได้ความสำเร็จ 34.50% และผลจากเซลล์มะเร็งลำไส้จากตัวผู้ป่วยเองได้ความสำเร็จ 33.28%⁽¹⁵⁾ ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จการสร้างเซลล์ลูกผสม ได้แก่ แหล่งที่มาของ DCs ชนิดของเซลล์มะเร็งที่นำมากระตุ้น และวิธีการสร้างเซลล์ลูกผสม^(16, 17)

ผลทดสอบประสิทธิภาพเซลล์ลูกผสม DCs พบว่าเซลล์ลูกผสม DCs ที่เตรียมจากอาสาสมัครกับเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยง สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวน T lymphocyte และเพิ่มประสิทธิภาพ NK cell ให้ทำลายเซลล์มะเร็งเต้านมเพิ่มมากขึ้น สอดคล้องกับรายงานวิจัยอื่นที่พบว่าเซลล์ลูกผสม DCs สามารถกระตุ้น T lymphocyte เมื่อทดสอบกับมะเร็งหลายชนิด ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการ สัตว์ทดลอง และการวิจัยทางคลินิก ดังเช่นเซลล์ลูกผสม DCs จากผู้ป่วยมะเร็งเต้านมสามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของ T lymphocyte และเมื่อนำไปฉีดกระตุ้นในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม สามารถกระตุ้น CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte ให้สร้างไซโตไคน์ INF- γ เพิ่มมากขึ้น^(18, 19) รวมทั้งรายงานวิจัยทดสอบเซลล์ลูกผสม DCs กับเซลล์มะเร็งเต้านมจากหนูทดลองเพาะเลี้ยงและเซลล์ลูกผสม DCs กับเซลล์มะเร็งลำไส้ พบว่ากระตุ้นการเพิ่มจำนวนของ T lymphocyte และกระตุ้น specific CD8⁺ T lymphocyte ให้สามารถทำลายเซลล์มะเร็งลำไส้ได้เพิ่มมากขึ้น^(20, 21) เช่นเดียวกับการทดสอบเซลล์ลูกผสม DCs กับเซลล์มะเร็งศีรษะและคอ สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวน T lymphocyte และกระตุ้นการสร้าง INF- γ ในระดับสูง และเซลล์ลูกผสมเมื่อนำไปฉีดในหนูทดลองที่ทำให้ป่วยเป็นมะเร็งศีรษะและคอ พบว่าหนูมีอัตราการรอดชีวิตสูงขึ้น⁽²²⁾ ทั้งนี้อาจเกิดจากการที่ DCs สามารถนำเสนอเซลล์มะเร็งได้ทั้งทาง MHC class I และ MHC class II จึงกระตุ้น T lymphocyte ได้ทั้งชนิด T helper cell (CD4⁺) และ T cytotoxicity cell (CD8⁺) ทำให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้มากขึ้น^(15, 23)

การศึกษานี้เป็นการสร้างเซลล์ลูกผสม DCs ที่เตรียมจากอาสาสมัครกับเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ การศึกษาคุณสมบัติในการกระตุ้นในสัตว์ทดลอง และประยุกต์ใช้เซลล์ลูกผสม DCs สำหรับการศึกษาทางคลินิก จะนำไปสู่การประยุกต์ใช้รักษาผู้ป่วยมะเร็งต่อไป

สรุป

การเพาะเลี้ยง DCs จากอาสาสมัครสุขภาพดีโดยกระตุ้นด้วยเซลล์มะเร็งเต้านมเพาะเลี้ยงเพื่อสร้างเซลล์ลูกผสมในหลอดทดลอง สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวน T lymphocyte และเพิ่มประสิทธิภาพ NK Cell ให้ทำลายเซลล์มะเร็งเต้านมเพิ่มมากขึ้น ซึ่งอาจนำไปสู่การศึกษาทางคลินิกเพื่อสร้างเซลล์ลูกผสมสำหรับกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม ที่อาจเป็นประโยชน์ต่อการรักษาผู้ป่วยมะเร็งเต้านมแต่ละรายได้

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ขอขอบคุณนายแพทย์สมชาย แสงกิจพร ที่สนับสนุนการดำเนินการวิจัย นายสมภพ คชหาร และ นางสาวทัศนีย์ ทองดี ที่ช่วยเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านม และขอขอบคุณห้องปฏิบัติการด้านโรคเอดส์และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ ศูนย์ความร่วมมือไทย-สหรัฐฯ ด้านสาธารณสุขที่ให้ความอนุเคราะห์การใช้เครื่อง Guava® easyCyte Flow Cytometer

เอกสารอ้างอิง

1. สถาบันมะเร็งแห่งชาติ, กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. ทะเบียนมะเร็งระดับโรงพยาบาล พ.ศ. 2558. กรุงเทพฯ: บริษัท พรทรัพย์การพิมพ์ จำกัด; 2560.
2. Dalgleish AG, Browning MJ. Tumor immunology: immunotherapy and cancer vaccines. New York: Cambridge University Press; 1996.
3. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245–52.
4. Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 2007; 449: 419–26.
5. Gong J, Chen D, Kashiwaba M, Kufe D. Induction of antitumor activity by immunization with fusions of dendritic and carcinoma cells. *Nat Med* 1997; 3: 558–61.
6. Koido S, Homma S, Hara E, Namiki Y, Takahara A, Komita H, et al. Regulation of tumor immunity by tumor/dendritic cell fusions. *Clin Dev Immunol* 2010; 2010: 516768. (14 p.).
7. Hayashi T, Tanaka H, Tanaka J, Wang R, Averbook BJ, Cohen PA, et al. Immunogenicity and therapeutic efficacy of dendritic–tumor hybrid cells generated by electrofusion. *Clin Immunol* 2002; 104: 14–20.
8. Roos DS, Duchala CS, Stephensen CB, Holmes KV, Choppin PW. Control of virus-induced cell fusion by host cell lipid composition. *Virology* 1990; 175: 345–57.
9. Lentz BR. PEG as a tool to gain insight into membrane fusion. *Eur Biophys J* 2007; 36: 315–26.
10. Turksen K, editor. Embryonic stem cells: methods and protocols. 2nd ed. Totowa, N.J.: Humana Press; 2002.
11. Aguilar PS, Baylies MK, Fleissner A, Helming L, Inoue N, Podbilewicz B, et al. Genetic basis of cell–cell fusion mechanisms. *Trends Genet* 2013; 29: 427–37.
12. Davidson RL, O'Malley KA, Wheeler TB. Polyethylene glycol-induced mammalian cell hybridization: effect of polyethylene glycol molecular weight and concentration. *Somatic Cell Genet* 1976; 2: 271–80.
13. Avigan D, Vasir B, Gong J, Borges V, Wu Z, Uhl L, et al. Fusion cell vaccination of patients with metastatic breast and renal cancer induces immunological and clinical responses. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4699–708.
14. Kikuchi T, Akasaki Y, Abe T, Fukuda T, Saotome H, Ryan JL, et al. Vaccination of glioma patients with fusions of dendritic and glioma cells and recombinant human interleukin 12. *J Immunother* 2004; 27: 452–9.
15. Koido S, Hara E, Homma S, Torii A, Toyama Y, Kawahara H, et al. Dendritic cells fused with allogeneic colorectal cancer cell line present multiple colorectal cancer-specific antigens and induce antitumor immunity against autologous tumor cells. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 7891–900.
16. Koido S, Hara E, Homma S, Namiki Y, Ohkusa T, Gong J, et al. Cancer vaccine by fusions of dendritic and cancer cells. *Clin Dev Immunol* 2009; 2009: 657369. (13 p.).
17. Timmerman JM, Levy R. Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy. *Annu Rev Med* 1999; 50: 507–29.
18. Gelao L, Criscitiello C, Esposito A, De Laurentiis M, Fumagalli L, Locatelli MA, et al. Dendritic cell-based vaccines: clinical applications in breast cancer. *Immunotherapy* 2014; 6: 349–60.

19. Allahverdiyev A, Tari G, Bagirova M, Abamor ES. Current approaches in development of immunotherapeutic vaccines for breast cancer. *J Breast Cancer* 2018; 21: 343-53.
20. Gong J, Apostolopoulos V, Chen D, Chen H, Koido S, Gendler SJ, et al. Selection and characterization of MUC1-specific CD8⁺ T cells from MUC1 transgenic mice immunized with dendritic-carcinoma fusion cells. *Immunology* 2000; 101: 316-24.
21. Koido S, Hara E, Torii A, Homma S, Toyama Y, Kawahara H, et al. Induction of antigen-specific CD4- and CD8-mediated T-cell responses by fusion of autologous dendritic cells and metastatic colorectal cancer cells. *Int J Cancer* 2005; 117: 587-95.
22. Mou Y, Xie H, Huang X, Han W, Ni Y, Su H, et al. Immunological suppression of head and neck carcinoma by dendritic cell tumor fusion vaccine. *Oncol Lett* 2013; 6: 1799-803.
23. Koido S. Dendritic-tumor fusion cell-based cancer vaccines. *Int J Mol Sci* 2016; 17: 828. (16 p.).

***In vitro* Generation of Dendritic Cell – Breast Cancer Cell Hybrids For Induction of Cellular Immunity**

Supaporn Suparak* Tawanchai Sangcharoen* and Busarawan Sriwanthana**

**National Institute of Health ** Medical Sciences Technical Office, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand*

Abstract Dendritic cells (DCs) of cancer patients are unable to effectively process and present tumor associated antigens to immune cells, resulting in a spread of cancer cells. Our study was to enhance *in vitro* efficacy of DCs to further induce activities of T lymphocytes and Natural Killer (NK) cells for inhibition/reduction of a growth of a breast cancer cell line (MCF-7). Human monocytes, derived from buffy coat of six normal blood donors, were positively selected and generated DCs by culturing with recombinant GM-CSF and IL-4 for 6 days. Human monocyte-derived DCs were determined by a decrease in a level of CD14 and an increase in CD11c and HLA-DR levels by flow cytometry. The DCs were further pulsed with breast cancer cell lines (MCF-7) to generate DCs – MCF-7 tumor fusion cells with a mean success rate at 34.67%. The DCs – MCF-7 fusion cells were able to stimulate T cell proliferation as well as to enhance NK cells activities to kill MCF-7 from an average of 22.45% to 72.00% and 22.91% to 65.69%, respectively. Our study demonstrated a model for *in vitro* generation of effective human monocyte derived DCs – tumor fusion cells and a possibility to further develop alternative method to treat cancer patients.

Keywords: Dendritic cells, T lymphocyte, NK cell, MCF-7, breast cancer

Molecular laboratory testing for dengue serotypes at Bamrasnaradura Infectious Diseases Institute

Sumonmal Uttayamakul* Ravee Nitiyanontakij Supatsa Dedsatit

Sarinee Reawrang Patama Suttha and Visal Moolasart

Bamrasnaradura Infectious Diseases Institute, Department of Disease Control, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand

Abstract Dengue virus (DENV) infection is a major serious health problem in many tropical countries including Thailand. DENV comprises of 4 serotypes (DENV-1 to DENV-4) and co-circulation of DENV and Chikungunya virus (CHIKV) has been reported in areas where dengue is common. This study aims to investigate genetic materials of DENV and CHIKV including serotype distribution of DENV in dengue-suspected patients using real-time polymerase chain reaction (real-time PCR). The study was conducted during 2016-2017 at Bamrasnaradura Infectious Diseases Institute and a total of 100 patients (29 children and 71 adults) were enrolled. The laboratory findings in dengue-suspected patients was screened by platelet count of $\leq 100,000$ cells/ μ l, DENV NS1 antigen positive, or anti-DENV IgM positive. From 100 DENV-suspected cases, 37 cases were detected for DENV by real-time PCR. No CHIKV was detected. The results showed that 27 cases (73%) were admitted to the hospital, 18 cases (48.6%) had platelet count $<100,000$ cells/ μ l, 37 cases (100%) had NS1 antigen positive and 17 cases (45.9%) had anti-DENV IgM positive. The distribution of DENV-2, DENV-4, DENV-3 and DENV-1 serotypes was 43.2%, 32.4%, 18.9% and 5.4%, respectively. Rapid screening test results for NS1 antigen were concordant with those by real-time PCR. Serotype distribution using molecular testing could be useful for studies on correlation between viral diversity and host immune response.

Keywords: dengue, serotype, molecular testing

Corresponding author E-mail: sumonmal@health.moph.go.th

Received: 21 August 2018

Revised: 8 March 2019

Accepted: 18 March 2019

Introduction

Dengue virus (DENV) infection has been becoming a serious public health problem in many tropical countries⁽¹⁻³⁾ including Thailand. Dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue shock syndrome (DSS) are characterized by increased vascular permeability and are causes of death⁽⁴⁻⁶⁾. Fever caused by Chikungunya virus (CHIKV) shares some clinical signs with dengue and can be misdiagnosed in areas where dengue is common⁽⁷⁾. DENVs are positive stranded-RNA viruses belonging to genus *Flavivirus*, family *Flaviviridae*. All serotypes of DENV are transmitted by mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. Since *Aedes* mosquitoes can be vectors of both DENV and CHIKV, and endemic areas of these two viruses often overlap, co-circulation of DENV and CHIKV has been reported in various geographic areas^(7, 8). DENVs are classified into 4 serotypes, DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4⁽⁹⁾ with a broad range of symptoms^(5, 6). Factors that are important for a spread of disease vary in each area depending on host immunity, type of virus and vector, population density, and mobility⁽⁵⁾. Awareness on the removal of mosquito breeding sites is essential to prevent and control dengue outbreaks⁽⁵⁾.

The dengue virus has been a major health problem in Thailand since the first outbreak in 1958⁽¹⁰⁻¹¹⁾. There was an epidemic of dengue diseases widespread among the country⁽¹²⁾. Co-circulation of 4 serotypes of DENV was also demonstrated in Bangkok⁽¹¹⁾. A meta-analysis of dengue severity in Southeast Asia region showed that DENV-3 and DENV-4 were strongly associated with dengue hemorrhagic fever (DHF) whereas DENV-2 and DENV-4 were strongly associated with dengue shock syndrome (DSS)⁽¹³⁾.

The objective of the present study was to investigate the distribution of DENV and CHIKV circulating among clinically suspected patients at Bamrasnaradura Infectious Diseases Institute and to identify the serotype of DENV using real-time PCR.

Materials and Methods

Ethical considerations

The study was approved by the Institutional Review Board of Bamrasnaradura Infectious Diseases Institute on August 5, 2016 with the project code S003h/59.

Study site and population

This study was conducted at Bamrasnaradura Infectious Diseases Institute, Department of Disease Control, Ministry of Public Health, Nonthaburi, Thailand. A prospective study with suspected dengue patients was conducted between 2016 and 2017. The study included 100 febrile cases of children aged between 7 and 15 years and adults aged between 15 and 60 years, whose parents or patients themselves gave written informed consent to be enrolled. Dengue suspected symptoms were identified by following laboratory findings; platelet count less than or equal to 100,000 cell/ μ l, dengue NS1 antigen-positive, or anti-dengue IgM-positive. The participants should have at least one DENV-confirmed laboratory finding as inclusion criteria.

Laboratory testing

SD Bioline Dengue NS1 Antigen immuno-chromatography assay (SD Bioline, South Korea) is designed to detect DENV NS1 antigen with one step assay. Panbio Dengue Duo cassette (Panbio, Australia) was used to detect Dengue IgM and IgG in serum.

DENV serotyping and CHIKV detection by real-time PCR were performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, 400 µl of serum specimens were extracted for total nucleic acid [MagnaPure Compact, (Roche Diagnostics GmbH, Germany)] and detected by DENV-CHIKV multiplex real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assay (*abTESTM* DENV/CHIKU5 qPCR I kit, AITbiotech, Singapore) using a CFX96TM real-time PCR cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Five microliter (µl) of extracted nucleic acid was added to 20 µl of PCR mixture which was composed of reaction buffer, reverse transcriptase/*Taq* enzyme mix, primer/probe mix, PCR enhance template and Nuclease-free water. PCR cycling conditions were established and validated on Bio-Rad CFX96 as indicated in the package insert. It was composed of 3 phases in cDNA synthesis for 1 cycle at 53°C for 10 minutes, *Taq* activation for 1 cycle at 95°C for 2 minutes 30 seconds, amplification for 42 cycles at 95°C for 17 seconds, 59°C for 31 seconds, 68°C for 32 seconds. The signal detection of DENV-1 to 4 and CHIKV were determined at Cy5, FAM, Texas Red, Quasar 705 and HEX channels, respectively. Positive and negative controls were included in every run of PCR. Nuclease-free water was used as a negative control. The result was regarded true negative for DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 and CHIKV when the CY5, FAM, Texas Red, Q705 and HEX channels were not detected. An amplification signal detected in the respective fluorescence channel was considered as a positive result.

Data analysis

For descriptive analyses, data were summarized for median and ranges for hematological parameters. The percentage was used for categorical variables and calculated for serotype distribution among 100 dengue suspected patients.

Results

Sample population and testing results

A total of 100 febrile cases of 7 to 58 years old with suspected dengue infection between 2016 and 2017 were enrolled in the present study. There were 29 children (14 boys and 15 girls) and 71 adults (30 males and 41 females) participated in this study. Study population was 65% of in-patient department (IPD) cases and 35% of out-patient department (OPD) cases. Laboratory testing of NS1 antigen-positive, anti-dengue IgM-positive, and platelet count less than 100,000 cells/µl were 59, 67 and 29 cases, respectively. The median of fever duration was 4 days (1-9 days). The median of white blood cell counts on the blood collection date was 4,750 cells/µl (1,600-17,900 cells/µl) and the median of percentage of hematocrit was 42% (27-53%).

For laboratory findings of at least 1 inclusion criteria, there were 37 cases (100%) with NS1 positive, 17 cases (45.9%) with IgM positive and 18 cases (48.6%) with platelet less than 100,000 cells/ μ l. Among negative DENV RNA cases, there were 37 IPD cases (58.7%) and 26 OPD cases (41.2%). There were 22 cases (34.9%) with NS1 positive, 50 cases (79.3%) with IgM positive, and 11 cases (17.5%) with platelet less than 100,000 cells/ μ l. All dengue suspected cases with inclusion criteria of laboratory findings were summarized in Figure 1.

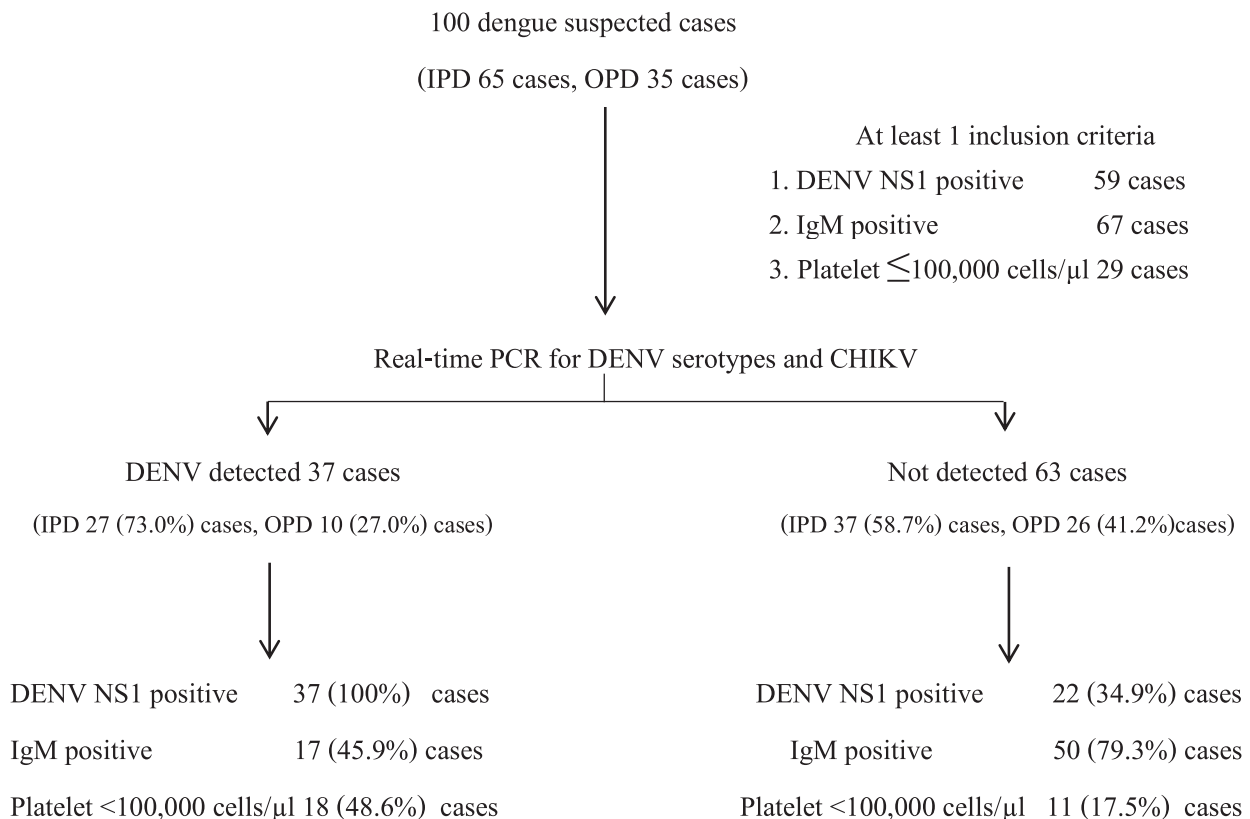


Figure 1. Results of laboratory findings of cases enrolled with at least one inclusion criteria.

The median age of 37 DENV RNA positive cases was 22 years (8–54 years). The median of fever duration was 3 with a range from 1–6 days. The median of white blood cell counts was 3,700 cells/ μ l (1,600–9,600 cells/ μ l) and for hematocrit was 43% (31–59%). The median of platelet count was 108,000 cells/ μ l (21,000–293,000 cells/ μ l). Laboratory testing for DENV NS1 antigen was positive in all 37 cases (100%). DENV IgM and IgG antibody was positive for 17 (45.9%) and 14 (37.8%) cases, respectively. The results were summarized in Table 1.

Table 1. Laboratory findings and real-time PCR of DENV serotypes of 37 DENV detected cases.
[+ : positive result, - : negative result, NA : No Assay]

ID	Gender	Age (Years)	Duration of fever (Days)	Platelet (cells/ μL)	DENV NS1 Ag	Anti- DENV IgM	Anti- DENV IgG	Serotype
DENV001	M	40	3	83,000	+	NA	NA	DENV-4
DENV005	F	40	3	129,000	+	-	-	DENV-2
DENV006	M	22	4	59,000	+	+	+	DENV-4
DENV008	M	32	6	21,000	+	NA	NA	DENV-4
DENV009	F	29	5	56,000	+	NA	NA	DENV-2
DENV010	F	37	4	142,000	+	+	+	DENV-4
DENV011	F	24	3	167,000	+	-	-	DENV-2
DENV012	M	41	3	92,000	+	+	+	DENV-4
DENV014	F	17	5	79,000	+	NA	NA	DENV-2
DENV016	F	54	1	184,000	+	-	-	DENV-3
DENV019	M	22	4	79,000	+	+	+	DENV-3
DENV020	M	18	4	72,000	+	-	-	DENV-4
DENV023	M	22	3	51,000	+	+	+	DENV-2
DENV025	F	8	3	81,000	+	+	+	DENV-3
DENV026	F	22	5	29,000	+	-	-	DENV-2
DENV031	F	33	4	68,000	+	-	-	DENV-1
DENV035	M	37	4	293,000	+	-	-	DENV-2
DENV037	M	22	2	139,000	+	NA	NA	DENV-4
DENV038	F	23	3	119,000	+	NA	NA	DENV-2
DENV044	F	33	5	31,000	+	+	+	DENV-2
DENV046	M	10	5	174,000	+	NA	NA	DENV-4
DENV049	M	17	2	156,000	+	NA	NA	DENV-3
DENV052	F	15	5	29,000	+	NA	NA	DENV-2
DENV055	F	29	3	192,000	+	+	-	DENV-3
DENV056	M	21	3	163,000	+	NA	NA	DENV-2
DENV059	M	13	2	149,000	+	-	-	DENV-3
DENV061	M	20	3	196,000	+	+	+	DENV-2
DENV066	F	26	5	148,000	+	NA	NA	DENV-3
DENV074	M	48	2	162,000	+	+	-	DENV-2
DENV077	M	10	2	210,000	+	+	+	DENV-2
DENV086	F	9	5	131,000	+	+	+	DENV-2
DENV087	F	16	3	99,000	+	-	-	DENV-1
DENV088	M	9	5	23,000	+	+	+	DENV-4
DENV091	M	15	2	91,000	+	+	-	DENV-4
DENV092	M	8	2	50,000	+	+	+	DENV-4
DENV093	F	39	4	150,000	+	+	+	DENV-2
DENV098	F	9	2	108,000	+	+	+	DENV-4

Real-time PCR results

The nucleic acid of dengue virus was detected in 37 serum specimens by real-time PCR while chikungunya virus was not detected. The number of cases of DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4 were 2, 16, 7 and 12, respectively, as shown in Figure 2.

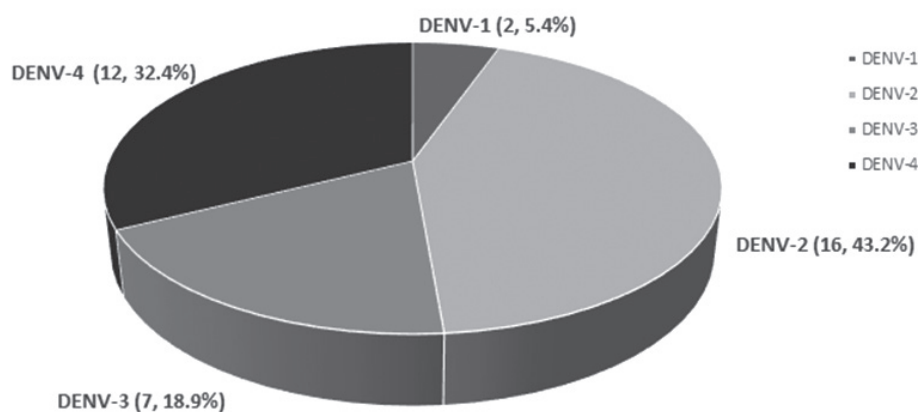


Figure 2. Dengue serotypes found in 37 serum specimens

Discussion

The co-circulation of multiple DENV serotypes occurred in Nonthaburi region, central part of Thailand, during 2016 to 2017, was shown in this study. All serotypes of DENV were found while CHIKV was not detected. DENV-2 was the most prevalence serotype (43.2%) found in our study, which was similar to another study conducted during May – October 2016. DENV-2 was predominantly found in 3 hospitals in the southern part of Thailand⁽¹⁴⁾. In contrast, a previous study showed that all 4 DENV serotypes co-circulated among 5 hospitals in Bangkok during 2015–2016 with DENV-4 as the predominant serotype⁽¹⁵⁾. The majority of serotype distribution was 45% of DENV-4, followed by 29% of DENV-3, 17% of DENV-2 and 8% of DENV-1⁽¹⁵⁾, while DENV-2 was most frequently detected in our study. It indicated that the predominant DENV serotype varied by year with seasonal fluctuation concordance. Therefore, to determine the serotypes that spread in each endemic area where DENV can be repeatedly infected is essential^(16,17).

Dengue infection can be diagnosed by both serological test and molecular method. The dengue RNA can be detected in the acute phase of serum samples when patients developed clinical symptoms such as fever. DENV isolation, dengue antigen detection, and/or dengue antibody detection can be found in dengue-confirmed cases with clinical manifestation⁽⁵⁾. Our present study could demonstrate that all 37 DENV NS1 antigen positive samples, collected within 6 days after the onset of fever were DENV-positive by qPCR kit, suggesting that real-time PCR can be used to detect dengue infection within the period of dengue viremia.

This study indicated that the molecular testing provided more accurate diagnosis of dengue infection. It is also implied that serotype distribution and further genotype analysis could possibly provide information on a correlation of viral diversity and host immune response especially antibody dependent enhancement.

Conclusion

Our study demonstrated all 4 serotypes were circulated throughout the year. Information on serotype distribution would be beneficial for epidemiological studies for disease control and prevention.

Acknowledgement

This work was supported by the grant from Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University. We are grateful to all the patients participated in this study. We thank the staff of Bamrasnaradura Infectious Diseases Institute and those of Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University for their assistance. We would like to acknowledge Drs Emi Nakayama and Tatsuo Shioda for their supervision and valuable comments on this manuscript.

References

1. Gibbons RV, Vaughn DW. Dengue: an escalating problem. *BMJ*. 2002; 324: 1563–6.
2. Gubler DJ. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol*. 2002; 10: 100–3.
3. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 2013; 496: 504–7.
4. World Health Organization. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. WHO/HTM/NTD/DEN/2009.1. Geneva: World Health Organization; 2009.
5. Kalayanaroj S, Vangveerawong M, Vatcharasaev V, editorials. Guidelines for diagnosis and treatment of dengue hemorrhagic fever. Nonthaburi, Thailand: Ministry of Public Health; 2013.
6. Kauntner I, Robinson MJ, Kuhnle U. Dengue virus infection: epidemiology, pathogenesis, clinical presentation, diagnosis and prevention. *J Pediatr* 1997; 131: 516–24.
7. Kim Lien Pham Thi. Epidemiology and dynamic of dengue and chikungunya in several provinces in Vietnam. *Microbiology and Parasitology*. English: Université Montpellier; 2015.
8. Sessions OM, Wilm A, Kamaraj US, Choy MM, Chow A, Chong Y, et al. Analysis of dengue virus diversity during human and mosquito infection reveals genetic constraints. *PLoS Negl Trop Dis* 2015; 9(9): e0004044. (21 p.).
9. Holmes EC, Twiddy SS. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol* 2003; 3: 19–28.

10. Bureau of Epidemiology, Department of Disease Control, Ministry of Public Health. Annual epidemiological surveillance report. Nonthaburi, Thailand: Ministry of Public Health; 1977–1998.
11. Halstead SB, Yamarat C. Recent epidemics of hemorrhagic fever in Thailand, observations related to pathogenesis of a “new” dengue disease. *Am J Public Health Nations Health* 1965; 55: 1386–95.
12. Bureau of Epidemiology, Department of Disease Control, Ministry of Public Health. Annual epidemiological surveillance report 2003. Nonthaburi, Thailand: Ministry of Public Health; 2003.
13. Soo KM, Khalid B, Ching SM, Chee HY. Meta-analysis of dengue severity during infection by different dengue virus serotypes in primary and secondary infections. *Plos One* 2016; 11(5): e0154760. (16 p.).
14. Suwanmanee S, Surasombatpattana P, Soonthornworasiri N, Hamel R, Maneekan P, Missé D, et al. Monitoring arbovirus in Thailand: surveillance of dengue, chikungunya and zika virus, with a focus on coinfections. *Acta Trop* 2018; 188: 244–50.
15. Liulak W, Saichaer P, Waidab W, Pungjitprapai A, Buranakitsin S, Suntorn-opas B, et al. (2017). Prospective study of dengue in Bangkok during 2015–2016. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2017; 48: 33–38.
16. Yung CF, Lee KS, Thein TL, Tan LK, Gan VC, Wong JG, et al. Dengue serotype-specific differences in clinical manifestation, laboratory parameters and risk of severe disease in adults, Singapore. *Am J Trop Med Hyg* 2015; 92(5): 999–1005.
17. Fried JR, Gibbons RV, Kalayanaroj S, Thomas SJ, Srikiatkachorn A, Yoon IK, et al. Serotype-specific differences in the risk of dengue hemorrhagic fever: an analysis of data collected in Bangkok, Thailand from 1994 to 2006. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4(3): e617. (6 p.).

การตรวจสายพันธุ์ของเชื้อเดงกี ด้วยวิธีอณูชีวโมเลกุลที่สถาบันบำราศนราดูร

สุนนมาลย์ อุทัยมกุล วรวิ นิธิยานนทกิจ สุภัทรา เดชสธิตย์ ศาริณี เรียวแรง ปฐมา สุทธา
และวิศัลย์ มุลศาสตร์

สถาบันบำราศนราดูร กรมควบคุมโรค ถนนติวานนท์ ถนนพหลโยธิน นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ โรคไข้เลือดออกที่เกิดจากเชื้อไวรัสเดงกี (Dengue virus: DENV) เป็นปัญหาสำคัญในประเทศแถบเขตร้อน รวมถึงประเทศไทย สายพันธุ์ไวรัสเดงกีประกอบด้วย 4 serotype (DENV-1 ถึง DENV-4) และมีรายงานพบการแพร่กระจายของ DENV และ Chikungunya virus (CHIKV) ในพื้นที่ที่มีการระบาดของไข้เลือดออก การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาสารพันธุกรรมของ DENV และ CHIKV ด้วยวิธี real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) ในผู้มารับการรักษาที่สถาบันบำราศนราดูรที่สงสัยไข้เลือดออก ระหว่างปี พ.ศ. 2559-2560 โดยคัดเลือกผู้ป่วยที่ตรวจพบเกล็ดเลือด $\leq 100,000$ เซลล์/ไมโครลิตร หรือพบผลบวกของ DENV NS1 antigen หรือ anti-DENV IgM จำนวน 100 ราย แบ่งเป็นผู้ใหญ่ 71 ราย และเด็ก 29 ราย ผลตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ DENV และ CHIKV ด้วยวิธี real-time PCR ไม่พบการติดเชื้อ CHIKV แต่พบ DENV 37 ราย ซึ่งเป็นผู้ป่วยที่พักรักษาในโรงพยาบาล 27 ราย (ร้อยละ 73) ผู้ป่วย 18 ราย (ร้อยละ 48.6) มีเกล็ดเลือด $< 100,000$ เซลล์/ไมโครลิตร DENV NS1 antigen ให้ผลบวก 37 ราย (ร้อยละ 100) และพบผลบวก IgM 17 ราย (ร้อยละ 45.9) ผลการตรวจด้วยวิธี real-time PCR พบสายพันธุ์ของ DENV-1 จำนวน 2 ราย (ร้อยละ 5.4) DENV-2 จำนวน 16 ราย (ร้อยละ 43.2) DENV-3 จำนวน 7 ราย (ร้อยละ 18.9) และ DENV-4 จำนวน 12 ราย (ร้อยละ 32.4) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการกระจายของเชื้อไวรัสเดงกีทุกสายพันธุ์และการตรวจหาสายพันธุ์ของเชื้อเดงกีด้วยวิธีอณูชีวโมเลกุลให้ผลวินิจฉัยที่ชัดเจน และสอดคล้องกับผลการตรวจแอนติเจน DENV NS1 การศึกษานี้แสดงว่าการจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธีอณูชีวโมเลกุลมีประโยชน์ต่อการศึกษาความสัมพันธ์ของความหลากหลายของไวรัส และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกี

การวิเคราะห์สิ่งแปลกปลอม ในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทเส้น

ขันทอง เพ็ชรนอก ก่อเกียรติ ศาสตรินทร์ และกนกวรรณ ต้นสกุล

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การพบสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดเล็ก น้ำหนักเบา (light filth) เกินปริมาณที่กำหนดในอาหารประเภทเส้นของไทย ทำให้เกิดการกักกันการนำเข้าประเทศสหรัฐอเมริกา จึงได้ศึกษาหาสิ่งแปลกปลอมดังกล่าวในอาหารประเภทเส้นจำนวน 100 ตัวอย่าง ได้แก่ ก๋วยเตี๋ยว บะหมี่ และวุ้นเส้น จำนวน 85, 12 และ 3 ตัวอย่าง ตามลำดับ โดยเป็นการสุ่มเก็บในเขตกรุงเทพมหานคร และปริมณฑล และ 5 จังหวัดในภาคกลาง ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2558 ถึงเดือนกันยายน 2560 และวิเคราะห์ตามวิธี AOAC 982.32-2016, Light filth in rice flours (powders), extruded in rice products, and rice paper พบสิ่งแปลกปลอม ได้แก่ ชิ้นส่วนแมลง ไร เหงาหนังสือ ขนคน ขนนก ขนแมว/สุนัข และขนหนู จำนวน 100, 52, 42, 79, 27, 26 และ 20 ตัวอย่าง ตามลำดับ ในจำนวนนี้พบสิ่งแปลกปลอมประเภทชิ้นส่วนแมลงเกินเกณฑ์กำหนดของ The United States Food and Drug Administration (US FDA) จำนวน 31 ตัวอย่าง โดยพบในก๋วยเตี๋ยว จำนวน 29 ตัวอย่าง และบะหมี่ จำนวน 2 ตัวอย่าง การตรวจพบดังกล่าวแสดงว่ากระบวนการผลิต สถานที่ และสุขลักษณะการผลิตส่วนบุคคลควรได้รับการปรับปรุง

Corresponding author E-mail: kantong.p@dmsc.mail.go.th

Received: 15 March 2018

Revised: 13 December 2018

Accepted: 22 March 2019

บทนำ

อาหารประเภทเส้นเป็นอาหารที่คนไทยนิยมรับประทานรองจากข้าว แบ่งเป็น 3 กลุ่มคือ เส้นก๋วยเตี๋ยว/เส้นหมี่ บะหมี่/แผ่นก๊วย และวุ้นเส้น ที่สามารถนำไปประกอบอาหารได้หลากหลายชนิดตามความนิยมของผู้บริโภค

ก๋วยเตี๋ยวเป็นผลิตภัณฑ์จากเมล็ดข้าวหักหรือปลายข้าวเจ้า นำข้าวไปแช่น้ำจนเมล็ดข้าวนิ่ม จึงนำไปโม่ให้ละเอียด ทั้งให้แป้งนวลกัน นำแป้งที่ได้นวดเป็นแผ่นๆ แล้วนำไปตากจนแห้ง นำไปต้มให้ละเอียดเป็นผง จะได้แป้งข้าวเจ้า หลังจากนั้นนำไปแปรรูปเป็นเส้นก๋วยเตี๋ยวได้หลากหลายชนิด⁽¹⁾ และอาจผสมด้วยแป้งชนิดอื่น อาทิ แป้งมันสำปะหลัง เพื่อช่วยลดความแข็งและเพิ่มความใส แป้งท้าวยายหม่อม เพื่อช่วยลดความแข็งและทำให้เส้นนุ่มเหนียวขึ้น⁽²⁾ ขณะที่บะหมี่เป็นผลิตภัณฑ์ทำมาจากเมล็ดข้าวสาลีชนิดแข็งและชนิดอ่อนผสมกันในสัดส่วนที่เหมาะสม ซึ่งเมื่อแปรรูปจะได้แป้งสาลีที่มีปริมาณโปรตีนประมาณร้อยละ 10-11⁽³⁾ ส่วนวุ้นเส้นเป็นผลิตภัณฑ์ทำจากเมล็ดถั่วเขียว ซึ่งมีคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนประกอบร้อยละ 56 มีโปรตีน ไขมัน วิตามิน อะไมโลส และอะไมโลเพคติน⁽⁴⁾

ปัจจุบันอุตสาหกรรมอาหารประเภทเส้น เช่น เส้นก๋วยเตี๋ยว ผลิตเพื่อใช้บริโภคในประเทศเป็นหลัก และส่งไปจำหน่ายในต่างประเทศบ้าง ได้แก่ ฮองกง เกาหลี ญี่ปุ่น และสหรัฐอเมริกา มีกำลังผลิตประมาณ 70,000 กิโลกรัมต่อวัน โดยมีผู้ประกอบการกว่า 400 ราย ในระดับครัวเรือน โรงงานอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ และอุตสาหกรรมขนาดกลาง และขนาดย่อม (SMEs) กระจายอยู่ทุกภูมิภาคของประเทศ มีมูลค่าการบริโภคภายในประเทศเฉลี่ยต่อปีนับ 10,000 ล้านบาท และมีมูลค่าการส่งออก 1,400 ล้านบาท⁽⁵⁾ ซึ่งขณะนี้เส้นก๋วยเตี๋ยวถูกควบคุมด้วยประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 193) พ.ศ. 2543 เรื่อง วิธีการผลิต เครื่องมือเครื่องใช้ในการผลิต และการเก็บรักษาอาหาร แต่ยังไม่มีความมาตรฐานคุณภาพ สิ่งแปลกปลอมที่มีน้ำหนักเบา (light filth) ซึ่งสามารถแยกออกจากผลิตภัณฑ์โดยใช้ของเหลวผสมระหว่างสารกลุ่มน้ำมันและน้ำ สิ่งแปลกปลอมประเภทนี้จะลอยตัวอยู่ในน้ำมัน ตัวอย่าง เช่น แมลง ชิ้นส่วนแมลง ขนหนู ขนคน และขนนก เป็นต้น⁽⁶⁾ ทำให้สินค้าที่ส่งไปจำหน่ายยังประเทศสหรัฐอเมริกาถูกกักกันเนื่องจากตรวจพบ light filth เกินเกณฑ์กำหนด⁽⁷⁾ การศึกษานี้เป็นการวิเคราะห์หาสิ่งแปลกปลอมในผลิตภัณฑ์ประเภท ก๋วยเตี๋ยว บะหมี่ และวุ้นเส้น เพื่อเป็นการคุ้มครองและแจ้งเตือนภัยแก่ผู้บริโภค อีกทั้งผู้ประกอบการสามารถนำไปใช้ปรับปรุงและพัฒนากระบวนการผลิต และอาจใช้ประกอบการพิจารณาของหน่วยงานรับผิดชอบเพื่อกำหนดเกณฑ์คุณภาพ

วัตถุประสงค์และวิธีการ

ตัวอย่างศึกษา

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ประเภทเส้นสดที่สุ่มเก็บจากตลาดจังหวัดนนทบุรี ปทุมธานี กรุงเทพฯ สมุทรปราการ พระนครศรีอยุธยา นครนายก สิงห์บุรี อ่างทอง และสระบุรี รวมทั้งตัวอย่างจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2558 ถึง เดือนกันยายน 2560 ประกอบด้วยก๋วยเตี๋ยว บะหมี่ และวุ้นเส้น จำนวน 85, 12 และ 3 ตัวอย่าง ตามลำดับ

การตรวจวิเคราะห์

การตรวจหาสิ่งแปลกปลอมด้วยตาเปล่า⁽⁸⁾

นำตัวอย่างมากระจายลงบนกระดาษสีขาว และดูด้วยตาเปล่า (visual examination) รวบรวมสิ่งแปลกปลอมที่ตรวจพบเพื่อทำการตรวจจำแนกชนิดและจำนวนสิ่งแปลกปลอม

การตรวจหาสิ่งแปลกปลอมที่มีน้ำหนักเบา

วิเคราะห์ตามวิธี AOAC 982.32, Light Filth in Rice Flours (Powders), Extruded Rice Products, and Rice Paper⁽⁶⁾ โดยนำตัวอย่างจำนวน 225 กรัม ต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที จากนั้นเทลงบน sieve no. 230 (Endecotts Limited, อังกฤษ) แล้วใช้น้ำร้อนฉีดพ่นจนน้ำใส จึงถ่ายสิ่งที่ตกค้างบน sieve ลงในปิ๊กเกอร์แล้วปรับปริมาตรด้วย isopropanol 40% ให้ได้ 800 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติม paraffin oil จึงนำไปต้มนาน 3 นาที จากนั้นถ่ายส่วนผสมลงใน percolator ที่มี isopropanol 40% อยู่ 300 มิลลิลิตร แล้วเติม isopropanol 40% ให้ปริมาตรห่างจากขอบด้านบนของ percolator 3 เซนติเมตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ปล่อยให้ชั้นของเหลวออกจนส่วนล่างของชั้นน้ำมันอยู่สูงจากฐาน percolator 5 เซนติเมตร ทำซ้ำโดยใช้ isopropanol 20% นำชั้นน้ำมันไปกรองบนกระดาษกรอง (Whatman No. 8 (Whatman International, อังกฤษ)) แล้วตรวจหาสิ่งแปลกปลอมด้วย widefield zoom stereoscopic microscope (Olympus Optical, ญี่ปุ่น) ที่กำลังขยาย 30 เท่า⁽⁶⁾ และตรวจจำแนกชนิดชิ้นส่วนของแมลงหรือขนสัตว์ด้วย compound microscope (Olympus Optical, ญี่ปุ่น) โดยเปรียบเทียบอ้างอิงจากสมุดภาพ⁽⁹⁾

ผล

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ประเภทเส้นจำนวน 100 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบสิ่งแปลกปลอมที่มองเห็นด้วยตาเปล่า แต่เมื่อนำมาตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 30 เท่า (ตารางที่ 1) พบสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดเล็กน้ำหนักเบา ได้แก่ ชิ้นส่วนแมลง ไร เหาหนังสือ ขนคน ขนนก ขนแมว/สุนัข และขนหนู จำนวน 100, 52, 42, 79, 27, 26 และ 20 ตัวอย่าง ตามลำดับ โดยพบชิ้นส่วนแมลง ไร เหาหนังสือ ขนคน ขนนก ขนแมว/สุนัข และขนหนูในถ้วยเดียว จำนวน 85, 46, 38, 67, 26, 25 และ 18 ตัวอย่าง ในบะหมี่จำนวน 12, 6, 4, 9, 1, 0, 2 ตัวอย่าง ตามลำดับ ขณะที่ตรวจพบเฉพาะชิ้นส่วนแมลงและขนแมว/สุนัข ในวุ้นเส้น จำนวน 3 และ 1 ตัวอย่าง

ตารางที่ 1 สิ่งแปลกปลอมประเภท light filth ที่ตรวจพบในผลิตภัณฑ์ประเภทเส้นตามกลุ่มวัตถุดิบ

ชนิดสิ่งแปลกปลอม	จำนวนตัวอย่าง (%)	
	พบ	ไม่พบ
ชิ้นส่วนแมลง (5 - >800 ชิ้น)		
ถ้วยเดียว	85 (100.00)	0 (0.00)
บะหมี่	12 (100.00)	0 (0.00)
วุ้นเส้น	3 (100.00)	0 (0.00)
รวม	100 (100.00)	0 (0.00)
ไร (1-8 ตัว)		
ถ้วยเดียว	46 (54.12)	39 (45.88)
บะหมี่	6 (50.00)	6 (50.00)
วุ้นเส้น	0 (0.00)	3 (100.00)
รวม	52 (52.00)	48 (48.00)

ตารางที่ 1 สิ่งแปลกปลอมประเภท light filth ที่ตรวจพบในผลิตภัณฑ์ประเภทเส้นตามกลุ่มวัตถุดิบ (ต่อ)

ชนิดสิ่งแปลกปลอม	จำนวนตัวอย่าง (%)	
	พบ	ไม่พบ
เทahnงสือ (1-4 ตัว)		
ก้วยเตี๋ยว	38 (44.71)	47 (55.29)
บะหมี่	4 (33.33)	8 (66.67)
วุ้นเส้น	0 (0.00)	3 (0.00)
รวม	42 (42.00)	58 (58.00)
ขนคน (1-10 เส้น)		
ก้วยเตี๋ยว	67 (78.82)	18 (21.18)
บะหมี่	9 (75.00)	3 (25.00)
วุ้นเส้น	3 (100.00)	0 (0.00)
รวม	79 (79.00)	21 (21.00)
ขนนก (1-6 เส้น)		
ก้วยเตี๋ยว	26 (30.59)	59 (69.41)
บะหมี่	1 (8.33)	11 (91.67)
วุ้นเส้น	0 (0.00)	3 (0.00)
รวม	27 (27.00)	73 (73.00)
ขนแมว/สุนัข (1-4 เส้น)		
ก้วยเตี๋ยว	25 (29.41)	60 (70.59)
บะหมี่	0 (0.00)	12 (100.00)
วุ้นเส้น	1 (33.33)	2 (66.67)
รวม	26 (26.00)	74 (74.00)
ขนหนู (1-3 เส้น)		
ก้วยเตี๋ยว	18 (21.18)	67 (78.82)
บะหมี่	2 (16.67)	10 (83.33)
วุ้นเส้น	0 (0.00)	3 (100.00)
รวม	20 (20.00)	80 (80.00)

สำหรับจำนวนชิ้นส่วนแมลงพบตัวอย่างที่มีจำนวนชิ้นส่วนแมลงมากกว่าข้อกำหนด Defect Action Levels (DAL) ของ The United States Food and Drug Administration (US FDA)⁽¹⁰⁾ กล่าวคือ พบมากกว่า 225 ชิ้น ในก้วยเตี๋ยว และในบะหมี่ จำนวน 29 (ร้อยละ 34.12) และ 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 16.67) ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 จำนวนตัวอย่าง (ร้อยละ) ที่ตรวจพบชิ้นส่วนแมลงในผลิตภัณฑ์ประเภทเส้น

จำนวนชิ้นส่วนแมลง	จำนวนตัวอย่าง (ร้อยละ)		
	ก๋วยเตี๋ยว	บะหมี่	วุ้นเส้น
1-100 ชิ้น	37 (43.53)	8 (66.67)	3 (100.00)
101-200 ชิ้น	15 (17.65)	2 (16.67)	0 (0.00)
201-224 ชิ้น	4 (4.71)	0 (0.00)	0 (0.00)
≥ 225 ชิ้น	29 (34.12)	2 (16.67)	0 (0.00)

สำหรับสิ่งแปลกปลอมประเภทขนสัตว์ ได้แก่ ขนคน ขนนก ขนแมว/สุนัข และขนหนู ที่ตรวจพบในก๋วยเตี๋ยวและบะหมี่ เมื่อนำมาหาความสัมพันธ์ทางสถิติโดยใช้ไคสแควร์ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ตารางที่ 3) พบว่าตัวอย่างก๋วยเตี๋ยวและบะหมี่ตรวจพบสิ่งแปลกปลอมประเภทขนสัตว์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบขนแมว/สุนัขในก๋วยเตี๋ยวมากกว่าบะหมี่ ส่วนขนคน ขนนก และขนหนูไม่มีความสัมพันธ์กับชนิดของตัวอย่าง

ตารางที่ 3 จำนวนตัวอย่าง (ร้อยละ) ที่ตรวจพบเส้นขนในตัวอย่างก๋วยเตี๋ยวและบะหมี่

ชนิดเส้นขน	จำนวนตัวอย่าง (ร้อยละ)		χ^2
	ก๋วยเตี๋ยว	บะหมี่	
ขนคน	67 (78.82)	9 (75.00)	0.09
ขนนก	26 (30.59)	1 (8.33)	1.60
ขนแมว/สุนัข	25 (29.41)	0 (0.00)	8.91*
ขนหนู	18 (21.18)	2 (16.67)	0.00

* $p \leq 0.05$

วิจารณ์

ผลการตรวจอาหารประเภทเส้น ได้แก่ ก๋วยเตี๋ยว 85 ตัวอย่าง บะหมี่ 12 ตัวอย่าง และวุ้นเส้น 3 ตัวอย่าง พบชิ้นส่วนแมลงในทุกตัวอย่าง อาจเนื่องจากแป้งซึ่งเป็นวัตถุดิบในการทำผลิตภัณฑ์ประเภทเส้นนั้นเป็นอาหารของแมลง ทำให้แมลงเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ เมื่อนำวัตถุดิบดังกล่าวมาแปรรูป ทำให้แมลงแตกเป็นชิ้นเล็กกระจายอยู่ในผลิตภัณฑ์ ส่วนการปนเปื้อนของไรและเหาหนังสือ อาจเกิดจากวัตถุดิบที่ไม่สะอาด จากการเก็บรักษาที่ไม่มีการปิดสนิทหรือการเก็บในโรงเรือนที่สกปรกทำให้แมลงกินวัตถุดิบเป็นอาหาร เจริญเติบโตและขยายพันธุ์

การตรวจพบขนคน บ่งชี้ถึงสุขลักษณะการผลิตที่ต้องปรับปรุง กล่าวคือ บุคลากรที่มีหน้าที่สัมผัสอาหารต้องปฏิบัติให้ถูกต้องตามหลักสุขลักษณะ โดยสวมถุงมือที่อยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ สะอาด และมีการล้างฆ่าเชื้อสม่ำเสมอ รวมทั้งมีการสวมหมวก ตาข่าย หรือผ้าคลุมผมเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเส้นผม รังแค และสิ่งสกปรกอื่น ๆ ในส่วนของศีรษะลงในกระบวนการผลิตและผลิตภัณฑ์⁽¹¹⁾ ขณะที่การพบขนนก ขนแมว/ขนสุนัข และขนหนู ชี้ให้เห็นว่า

ในอาคารผลิตควรติดตั้งอุปกรณ์ที่ป้องกันสัตว์และแมลง เช่น มุ้งลวด ม่านพลาสติก ตาข่ายดัก และตะแกรง ดักสัตว์ทางท่อระบายน้ำ เป็นต้น การปิดกั้นผนังรอบอาคารผลิตต้องคำนึงถึงเรื่องของแสงสว่าง การระบายอากาศและความร้อนที่เกิดขึ้นจากกระบวนการผลิต โดยเฉพาะกระบวนการผลิตเส้นก๋วยเตี๋ยวที่ต้องมีการนึ่งแผ่นแป้ง และสภาพเครื่องจักรและบริเวณผลิตโดยรอบต้องสะอาด กรณีโรงงานมีช่องว่างระหว่างหลังคา กับผนังอาคารที่ไม่สามารถเชื่อมติดกัน ควรติดมุ้งลวดหรือตาข่ายรอบช่องว่าง เพื่อป้องกันสัตว์พาหะเข้าไปในอาคาร⁽¹¹⁾

เมื่อเปรียบเทียบคุณภาพอาหารประเภทเส้นตามข้อกำหนด DAL ของ US FDA ที่กำหนดว่า หากตรวจพบชิ้นส่วนแมลงเท่ากับหรือมากกว่า 225 ชิ้น หรือขนหนูเท่ากับหรือมากกว่า 4.5 เส้น ในผลิตภัณฑ์ สินค้าจะถูกกักกัน การพบว่าก๋วยเตี๋ยวมีการปนเปื้อนจากชิ้นส่วนแมลงมากกว่าเกณฑ์กำหนดในสัดส่วนที่สูงกว่าผลิตภัณฑ์อาหารประเภทเส้นอื่น ๆ ที่ทำการศึกษา อาจเกิดจากใช้วัตถุดิบที่คุณภาพต่ำมีการปนเปื้อนจากแมลงและชิ้นส่วนแมลงจำนวนมาก มาตรการควบคุมสุขลักษณะการผลิตในขั้นตอนต่าง ๆ ระบบป้องกันแมลงและสัตว์ยังไม่ดี หรือผู้ผลิตยังผลิตด้วยวิธีดั้งเดิม ไม่มีการจัดการกระบวนการผลิตอาหารตามหลักเกณฑ์วิธีการที่ดีในการผลิต ใช้เทคโนโลยีการผลิตไม่ทันสมัย ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพต่ำ

ข้อมูลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าควรมีการกำหนดเกณฑ์สิ่งแปลกปลอมที่มีน้ำหนักเบา (light filth) ในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทเส้น เพื่อควบคุมคุณภาพการผลิต ซึ่งนอกจากจะเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภคในประเทศแล้วยังจะช่วยส่งเสริมการแข่งขันในเวทีการค้าโลกอีกด้วย

สรุป

การตรวจวิเคราะห์สิ่งแปลกปลอมในอาหารประเภทเส้นพบสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ ได้แก่ ชิ้นส่วนแมลง ไรเหาหนังสือ ขนคน ขนนก ขนแมว/สุนัข และขนหนู โดยพบสิ่งแปลกปลอมประเภทชิ้นส่วนแมลงเกิน 225 ชิ้น ตามข้อกำหนด Defect Action Levels ของ US FDA เป็นสิ่งบ่งชี้ประสิทธิภาพการควบคุมสุขลักษณะการผลิตในขั้นตอนต่าง ๆ รวมทั้งระบบการป้องกันแมลงและสัตว์ ผู้ผลิตควรนำหลักเกณฑ์วิธีการที่ดีในการผลิตอาหารมาใช้ในการผลิต เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่สะอาดเป็นที่ยอมรับสำหรับผู้บริโภคและการส่งออก

เอกสารอ้างอิง

1. เส้นก๋วยเตี๋ยวแปรรูป. [ออนไลน์]. 2560; [สืบค้น 18 ธ.ค. 2560]; [7 หน้า]. เข้าถึงได้ที่ : URL: <https://www.kaset-organic.com/เส้นก๋วยเตี๋ยวแปรรูป.html>.
2. เส้นก๋วยเตี๋ยว และวิธีทำเส้นก๋วยเตี๋ยว. [ออนไลน์]. 2559; [สืบค้น 15 ธ.ค. 2560]; [5 หน้า]. เข้าถึงได้ที่ : URL: <https://puechkaset.com/เส้นก๋วยเตี๋ยว>.
3. Types of Flour แบ่งสำหรับใช้ทำเบเกอรี่ หรือขนมอบ. [ออนไลน์]. 2553; [สืบค้น 19 ธ.ค. 2560]; [2 หน้า]. เข้าถึงได้ที่ : URL: http://www.foodietaste.com/cookingtips_details.asp?id=59.
4. ศูนย์ศึกษาการพัฒนาภูพานอันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดสกลนคร. คู่มือที่ 9 การผลิตวุ้นเส้นจากถั่วเขียว. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : สำนักงานคณะกรรมการพิเศษเพื่อประสานงานโครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริ (สำนักงาน กปร.); 2555.
5. คลินิกภาษีเส้นก๋วยเตี๋ยว. [ออนไลน์]. 2559; [สืบค้น 8 ธ.ค. 2560]; [8 หน้า]. เข้าถึงได้ที่ : URL: http://taxclinic.mof.go.th/pdf/0155882A_2754_8F5E_43D9_385B00B7D70C.pdf.

6. Whitlock LL, chapter editor. Chapter 16: extraneous materials: isolation. In: Latimer GW, editor. Official method of analysis of AOAC International. 20th ed. Rockville, MD.: AOAC International; 2016. P. 1-6, 24.
7. Import refusal report. [online]. 2018; [cited 2018 Jan 9]; [2 screens]. Available from: URL: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/importrefusals>.
8. Chapter V-2: bakery products, cereals, and alimentary pastes. In: FDA technical bulletin number 5, macroanalytical procedures manual. Alameda, CA.: U.S. Food and Drug Administration; 1984. P. V-12.
9. Gentry JW, Harris KL. Microanalytical entomology for food sanitation control. Florida: Litho Graphics Altamonte Springs; 1991.
10. Food and Drug Administration. Food defect action levels. Washington, DC.: Center for Food Safety and Applied Nutrition; 1995. P. 11.
11. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. คู่มือการพัฒนาและการตรวจสอบสถานที่ผลิตก๋วยเตี๋ยวตามหลักเกณฑ์ GMP สุขลักษณะทั่วไป. นนทบุรี : กองควบคุมอาหาร สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา; 2552.

Analysis of Light Filth in Noodle Products

Kuntong Pednog Kokeiat Sarttarin and Kanogwan Toonsakool

Bureau of Quality and Safety of Food Department of Medical Sciences Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand.

Abstract Light filth found in noodle products from Thailand resulted in products quarantine at the United States of America. This study was to determine the presence of light filth in 100 noodle products, including rice noodle, egg noodle and bean vermicelli in the number of 85, 12 and 3 samples, respectively, collected from Bangkok Metropolitan Region and 5 province in central Thailand during November 2015 to September 2017. The light filth test was performed using official methods as described in AOAC 982.32-2016, Light filth in rice flours (powders), extruded in rice products, and rice paper. The results revealed that insect fragments, mite, psocids, human hair, feather, cat/dog hair and rat hair were found in 100, 52, 42, 79, 27, 26 and 20 samples, respectively. A number of insect fragments over a regulation of the United States Food and Drug Administration was found in 31 products of which 29 and 2 were found in rice noodles and egg noodles, respectively. The study suggested that a production process, a location and a personal hygiene should be considered for improvement.

Keywords: Light Filth, Noodle products



ใบสมัครเป็นสมาชิก

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ชื่อ.....

ที่อยู่.....

อาชีพ.....

โทรศัพท์.....

ต้องการรับ วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เวลา 1 ปี (4 ฉบับ) เป็นเงิน 200.- บาท

ตั้งแต่ปี.....

พร้อมนี้ได้ส่ง

☐ ธนาณัติ

☐ ตัวแลกเงินไปรษณีย์

☐ เงินสด

ส่งจ่าย

นางสาวน้ำฝน น้อยประเสริฐ

ห้องสมุดกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ซอยโรงพยาบาลบาราคนราดูล ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

โทร. 0-2589-9850-8 ต่อ 99339

E-mail.....

ส่งจ่าย ปณณ. กระทรวงสาธารณสุข รหัสไปรษณีย์ 11000

THE BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

The bulletin of the Department of Medical Sciences is an official publication of the Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. It is devoted to the dissemination of knowledge concerning medical sciences and the facilitation of co-operation among scientists.

Owner	Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health	
Administrative Advisor	Opart Karnkawinpong Somlerk Jeungsamarn	Phichet Banyati
Technical Advisor	Prasert Thongcharoen Mayura Kusum Jongdee Wongpinairat Sumol Pavittranon Teeranart Jivapaisarnpong	Amara Vongbuddhapitak Pimjai Naigowit Supatra Im-Erb Panadda Silva
Editor	Busarawan Sriwanthana	Department of Medical Sciences
Assistant Editor	Duanthanorm Promkhatkaew Suthon Vongsheree Apiwat Tawatsin	Kanokporn Atisook Wichuda Jariyapan Malinee Chittaganpitch
Editorial Board	Pilaipan Puthavathana Prasert Auewarakul Punnee Pitisuttithum Pintip Pongpech Suchada Chaisawadi Danai Tiwawech Suwanna Charunut Pathom Sawanpanyalert Salakchit Chutipongvivate Hansa Chaivanit Usavadee Thavara Punthip Teeyapant Siri Srimanoroth Supanee Duangteraprecha Piyada Wangroongsarb Wantana Paveenkittiporn Duangpen Pattamadilok Triporn Wattananat	Siriraj Hospital, Mahidol University Siriraj Hospital, Mahidol University Mahidol University Chulalongkorn University King Mongkut's Institute of Technology Thonburi Naresuan University Huachiew Chalermprakiet University Office of the Permanent Secretary, Ministry of Science and Technology The Association of Medical Technologists of Thailand Independent scholar Independent scholar Independent scholar Department of Medical Sciences Department of Medical Sciences Department of Medical Sciences Department of Medical Sciences Department of Medical Sciences Department of Medical Sciences
Administration	Namfon Noiprasert Prasan Julwong	Department of Medical Sciences Department of Medical Sciences
Subscription Rate	The Bulletin of the Department of Medical Sciences is published quarterly. Annual subscription rate is ฿ 200.00 for domestic and US.\$ 50.00 for all other countries.	
Office	Department of Medical Sciences 88/7 Soi Tiwanond 14, Tiwanond Rd., Nonthaburi 11000, Thailand. Tel. 0-2951-0000 Fax: 0-2951-1297	
Printed by	Aroonkarnpim Ltd., Part. 457/6-7 Phra Sumen Road, Bangkok 10200 Tel. 0-2282-6033-4	



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

เปิดใจ ใฝ่รู้ คู่คุณธรรม นำหลักวิชาการ มาตรฐานสากล

www.dmsc.moph.go.th