

วารสาร



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 59 ฉบับที่ 3 กรกฎาคม - กันยายน 2560 Vol. 59 No. 3 July - September 2017

ISSN 0125-684X

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จัดทำโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เพื่อเผยแพร่ผลงานวิชาการด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ทุกสาขา

เจ้าของ	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข	
ที่ปรึกษาด้านบริหาร	นพ.สุขุม กาญจนพิมาย ภก.ดร.วรวิทย์ กิตติวงศ์สุนทร	นพ.พิเชฐ บัญญัติ นพ.สมฤกษ์ จึงสมาน
ที่ปรึกษาด้านวิชาการ	ศ.เกียรติคุณ นพ.ประเสริฐ ทองเจริญ ภญ.อมรา วงศ์พุทธพิทักษ์ ภญ.ดร.จงดี ว่องพินัยรัตน์ ภญ.สุภัทรา อัมเอิบ	ดร.ปนัดดา ชิลวา พญ.มยุรา กุสุมภ์ นางพิมพ์ใจ นัยโกวิท ภญ.ดร.สุมล ปวีตรานนท์
บรรณาธิการ	นางธีรนาถ จิระไพศาลพงศ์	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
ผู้ช่วยบรรณาธิการ	ดร.เลาจนา เขาวนาดีชัย	นักวิชาการอิสระ
คณะบรรณาธิการ	ศ.ดร. นพ.ประเสริฐ เอื้อวรากุล ศ.ดร.อรษา สุตเธียรกุล ศ.ดร.พิไลพันธ์ พุฒินะ ศ.พญ.พรรณิ ปิติสุทธิธรรม รศ.ดร. ภญ.พิณทิพย์ พงษ์เพชร ผศ.สุชาดา ไชยสวัสดิ์ ดร.दनัย ทิวาเวช ภญ.สุวรรณา จารุณข นางพรรษา ไชยวานิช ดร.นพ.ปฐม สวรรค์ปัญญาเลิศ ดร.อุษาวดี ถาวร ดร.สลักจิต ชูติพงษ์วิเวท ดร.เดือนถนนอม พรหมชาติแก้ว นางสาวพรรณทิพย์ ตียพันธ์ ดร.บุษราวรรณ ศรีวรรณะ นางกนกพร อธิสุข นายศิริ ศรีมนโรถ นางวิชชุดา จริยะพันธุ์ ภญ.ดร.สุภาณี ดวงธีรปรีชา	ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยมหิดล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี มหาวิทยาลัยนเรศวร มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ นักวิชาการอิสระ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข นักวิชาการอิสระ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 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 59 ฉบับที่ 3 กรกฎาคม - กันยายน 2560

Vol. 59 No. 3 July- September 2017

สารบัญ

หน้า

นิพนธ์ต้นฉบับ

- สายพันธุ์เชื้อไวรัสตับอักเสบ เอ ที่ระบาดในศูนย์การฝึกอบรมทหารเรือ จังหวัดชลบุรี 143
โดยสาเหตุจากแหล่งน้ำดื่ม
เกรียงศักดิ์ ฤทธาศวัต ชลธิชา กาวิดำ ลัดดาวัลย์ เทียมสิงห์ สมชาย แสงกิจพร
นาโอคัชชี ทาเคตะ มาซาชิ ทซึชิมิ โคจิ อิชิ สึ เทง ชัง และจงกลนี วงศ์ปิยะบรร
การใช้ Accuracy profile ตรวจสอบความถูกต้องของแผ่นทดสอบ Petrifilm™ Rapid 152
Yeast and Mold Count Plate สำหรับตรวจหาปริมาณยีสต์และราในเครื่องดื่ม
กรุณา ตีรสมิทธิ์ ลดาพรรณ แสงคล้าย และนลินี อยู่เพชร
การศึกษา Charge Variants ในยาชีววัตถุเพื่อการรักษาชนิดโมโนโคลนอลแอนติบอดี 171
ด้วย Capillary Isoelectric Focusing
วิชชุดา จริยะพันธุ์ จิตาภรณ์ ภูติภินโยวัฒน์ และสายวรุฬ จตุรกิตตินันท์
การประเมินความเสี่ยงแคดเมียมจากการบริโภคประจำวันของคนไทย 181
พนาวัลย์ กลิ่งกลางดอน ลัดดาวัลย์ โรจนพรหมทิพย์ กรรณิกา จิตติยศรา
นนทรรัตน์ พรทรัพย์มณี ปิ่นนรี ชินวรรณวงศ์ และเขมิกา เหมโลหะ

รายงานจากห้องปฏิบัติการ

- สายพันธุ์ของไวรัสเดงกีในเขตสุขภาพที่ 2 ระหว่างปี พ.ศ. 2555 ถึง พ.ศ. 2559 199
ชวลิต เกียรติวิชกุล วัชรินทร์ ศรีสกุล และจิราพร ศรีสกุล

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 59 ฉบับที่ 3 กรกฎาคม - กันยายน 2560

Vol. 59 No. 3 July- September 2017

CONTENTS

Page

Original Articles

- Genetic Analysis of Hepatitis A Viruses Detected in an Outbreak at a Military Training Center, Chonburi Province: Plausibility of Contaminated Drinking Water** 143

Kriangsak Ruchusatsawat Chonthicha Kawidam Laddawan Thiemsing

Somchai Sangkitporn Naokazu Takeda Masashi Tatsumi

Koji Ishii Li Tiang Chang and Jongkonnee Wongpiyabovorn

- Validation of 3M Petrifilm™ Rapid Yeast and Mold Count Plate for the Enumeration of Yeast and Mold in Beverages using Accuracy Profile Procedure** 152

Karuna Teerasamit Ladapan Saengklai and Nalinee Yoophet

- Charge Variants Analysis of Biotherapeutic Monoclonal Antibody by Capillary Isoelectric Focusing** 171

Wichuda Jariyapan Titaporn Pootipinyowat and Saywarul Jadoonkittinan

- Risk Assessment of Dietary Exposure to Cadmium in the Thai Population** 181

Panawan Kluengklangdon Laddawan Rojanapantip Kannika Jittiyossara

Nontarat Pornsapmanee Pinnaree Chinwattanawong and Khemikar Hemloha

Laboratory Findings

- Dengue Virus Serotypes in Health Region 2 in BE 2555-2559** 199

Chavalit Kiatvitchukul Vatcharin Srisakul and Jiraporn Srisakul



บทบรรณาธิการ



ในช่วงหน้าฝน ตั้งแต่ประมาณเดือนมิถุนายน ไปจนถึงเดือนตุลาคมของทุกปีจะมีฝนตกชุกในเขตภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมทั้งประเทศไทย โรคระบาดยอดนิยมที่มากับสายฝนคือไข้หวัดใหญ่ และบางครั้งอาจรุนแรงถึงกับทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิต ถึงแม้ว่าโรคนี้สามารถป้องกันได้ด้วยวัคซีน แต่สายพันธุ์ไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่ระบาดจะมีการเปลี่ยนแปลงพันธุ์กรรมไปเรื่อยๆ และบ่อยครั้งที่การเปลี่ยนแปลงนี้ส่งผลให้ผู้ที่เคยได้รับวัคซีนในปีก่อนๆ อาจไม่มีภูมิคุ้มกันต่อไวรัสที่กำลังระบาดอยู่ ดังนั้นการผลิตวัคซีนไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาลเพื่อให้มีประสิทธิภาพป้องกันโรคไข้หวัดใหญ่ที่ระบาดในแต่ละปี ต้องใช้สายพันธุ์ที่องค์การอนามัยโลกได้คัดเลือกไว้โดยใช้การวิเคราะห์ข้อมูลการเฝ้าระวังไวรัสไข้หวัดใหญ่จากศูนย์ไข้หวัดใหญ่ทั่วโลก โดยในแต่ละปีองค์การอนามัยโลกจะประกาศสายพันธุ์วัคซีนปีละ 2 ครั้ง คือในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ สำหรับประเทศในซีกโลกเหนือ (Northern hemisphere) และเดือนตุลาคมสำหรับประเทศในซีกโลกใต้ (Southern hemisphere)

วัคซีนไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาลที่มีจำหน่ายในขณะนี้มียู 2 สูตร ได้แก่ 1) วัคซีนไข้หวัดใหญ่ชนิด 3 สายพันธุ์ (Trivalent Influenza Vaccine) ซึ่งประกอบด้วย Influenza virus type A 2 สายพันธุ์ (H1N1 และ H3N2) และ Type B 1 สายพันธุ์ และ 2) วัคซีนไข้หวัดใหญ่ชนิด 4 สายพันธุ์ (Quadrivalent Influenza Vaccine) ซึ่งประกอบด้วย Type A 2 สายพันธุ์เช่นเดียวกับ Trivalent Influenza Vaccine และ Type B 2 สายพันธุ์

สายพันธุ์วัคซีนที่องค์การอนามัยโลกได้ประกาศสำหรับซีกโลกเหนือปี พ.ศ. 2560 – 2561 ได้แก่ A/Michigan/45/2015/(H1N1) pdm09-like virus; A/Hong Kong/4801/2014/(H3N2)-like virus; และ B/Brisbane/60/2008-like virus สำหรับ Trivalent influenza vaccine และเพิ่ม B/Phuket/3073/2013-like virus สำหรับ Quadrivalent influenza vaccine

องค์การอนามัยโลกจะจัดประชุมผู้เชี่ยวชาญเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์วัคซีนไข้หวัดใหญ่สำหรับซีกโลกใต้ ในวันที่ 25 – 27 กันยายน 2560 นี้

ถึงแม้ว่าการคัดเลือกสายพันธุ์วัคซีนสำหรับผลิตวัคซีนไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาลขององค์การอนามัยโลกที่ผ่านมาส่วนใหญ่จะตรงกับสายพันธุ์ที่ระบาดตามฤดูกาลแล้วก็ตาม แต่บางครั้งอาจมีการระบาดของสายพันธุ์ใหม่ๆ เพิ่มเติมทำให้วัคซีนอาจไม่มีประสิทธิภาพป้องกันโรคได้ครอบคลุม ดังนั้นการดูแลสุขภาพให้แข็งแรงจึงเป็นเรื่องสำคัญในการป้องกันโรคเช่นกัน

นางธีรนาถ จิระไพศาลพงศ์
บรรณาธิการ

Genetic Analysis of Hepatitis A Viruses Detected in an Outbreak at a Military Training Center, Chonburi Province : Plausibility of Contaminated Drinking Water

Kriangsak Ruchusatsawat* Chonthicha Kawidam* Laddawan Thiemsing*
Somchai Sangkitporn* Naokazu Takeda*** Masashi Tatsumi*** Koji Ishii****
Li Tiang Chang**** and Jongkonnee Wongpiyabovorn*****

* National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

** Thailand-Japan Research Collaboration Center of Emerging and Re-emerging Infections
(RCC-ERI), Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

*** Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Suita, Osaka 565-0781, Japan

**** Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 208-0011, Japan

***** Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Pathumwan,
Bangkok 10330, Thailand

ABSTRACT Hepatitis A virus (HAV) is a causative agent of food- and water - borne acute hepatitis that usually affects young adults. This study was to investigate possible agents of a viral hepatitis outbreak in 2008 at a military training center in Chonburi, Thailand. Of 388 serum samples of cases, 188 (48.8%) were positive for anti - HAV IgM, whereas all were negative for anti - HCV antibodies, anti-HBc IgM and anti HEV IgM. Furthermore, studies on randomly selected samples using RT - PCR at VP1/2A junction of HAV genome found that 30 anti - IgM - positive sera, 42 stool and 1 drinking water samples were positive for HAV RNA. Nucleotide sequence analysis of VP1/2A junction (234 base pairs) was further determined. We found that all 21 samples selected for phylogenetic analysis demonstrated identical sequences and were categorized into genotype IA. Our finding also suggested that the 2008 hepatitis A virus outbreak was possibly occurred from contamination of drinking water. Continuation on control measures for clean drinking water is, therefore, essential.

Keywords: hepatitis A, HAV, molecular epidemiology, phylogenetic analysis, contaminated drinking water

Accepted for publication, 20 June 2017

Introduction

Transmission of hepatitis A virus (HAV) via fecal-oral route as well as person-to-person contact can cause acute viral hepatitis.⁽¹⁾ The symptoms of HAV infection are self-limiting within 1 - 2 months. HAV-infected individuals often require hospitalization and proper therapy.⁽²⁾ Recent reports described a number of outbreaks of hepatitis A in both Asian and European countries.⁽³⁻⁶⁾ HAV usually affects young adults, and their mortality rate is relatively high, that is 0.1% and 2.1% in age groups of <14 years and >40 years, respectively.⁽⁷⁾ Improved hygienic and socioeconomic conditions may be resulted in a decrease in natural HAV immunity.⁽⁸⁾

HAV belongs to the genus *Hepatovirus* in the family *Picornaviridae*. Its genome is a 7.6-kb single-stranded positive-sense RNA molecule. Owing to the fact that no practical cell culture systems for HAV isolation has been developed, nucleotide sequence analysis of VP1/2A region of HAV genome, followed by phylogenetic analyses, has then used to categorization of HAV isolates from various countries. Currently, there are seven HAV genotypes; genotype I (GI) to VII (GVII).⁽⁹⁻¹¹⁾ GI and GIII, are further divided into subgenotypes, IA and IB, and IIIA and IIIB, respectively.⁽¹¹⁾

According to a nationwide surveillance system of viral hepatitis in Thailand, several HAV outbreaks were reported from many provinces including Suphanburi, Chantaburi, Chiangrai and Lampang in 2001, 2002, 2005 and 2005, respectively.^(12,14) Wattanasri N *et. al* firstly reported that HAV isolates in Thailand were classified into two genetic groups, GIA and GIB.⁽¹²⁾

The hepatitis outbreak in 2008 was reported to occur at a military training center in Chonburi Province. The present study was to serologically and genetically determine causative agent(s), as well as to identify possible source(s) of infection.

Materials and Methods

Patient sera

A total of 388 serum specimens were collected from patients with clinically diagnosed as having acute viral hepatitis during June 19th to July 7th in 2008. All, attending a training course during April 2nd to June 3rd, 2008 at a military training center in Chonburi, were recruits from Songkhla (n = 98), Chonburi (n = 228) and Chantaburi (n = 62) provinces. All sera were tested for Anti-HAV IgM antibody, anti-HAV total antibody, anti-hepatitis B core (HBc) IgM antibody, anti-hepatitis C virus (HCV), and anti-hepatitis E virus (HEV) IgM antibody using commercially available reagents; VIDAS HAV IgM (BioMerieux, Marcy-l'Étoile, France), VIDAS HAV total (BioMerieux), Mini VIDAS HBc IgM (BioMerieux), ETI-AB-HCVK-4 (DiaSorin, Saluggia, Italy), and HEV-IgM ELISA (MP Diagnostic, Singapore), respectively.

Water samples

Eleven water samples suspected of contamination were collected from each of 11 water tanks at the military training center. The water was generally used for both drinking and commercial purposes. Concentrations of HAV particles were measured as described.⁽¹³⁾ Briefly, one liter of water was collected in a sterile bottle from each tank and stored in an icebox until analysis. The water was dechlorinated with sodium thiosulfate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) (Merck, Darmstadt, Germany) to obtain a final concentration of 50 mg/l. Aluminum chloride hexahydrate ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added at a final concentration of 120 mg/l, and pH was adjusted to 3.5 with 1.0 N HCl. Each sample was filtrated with a 0.22 - μm filter (Millipore, Bedford, MA), and the filter was washed with 0.14 N NaCl for 5 min to remove excess Al^+ . For the elution of the virus, the filter was soaked for 3 min in 300 μl of 3% Beef Extracts (BD, Beckon Dickinson, LePontdeclair, France) at pH 9.0. Antibiotic (Streptomycin and Penicillin) and $10 \times \text{MEM}$ was added and the samples were kept at -70°C until further processing. A positive control, used for estimation of HAV recovery during concentration, was 1 ml of HAV vaccine antigens derived from the HM - 175 strain (Havrix1440, GlaxoSmithKline Biological, Rixensart, Belgium). All samples were tested in triplicate.

Stool samples

A total of 48 stool specimens were collected from the patients who were clinically diagnosed acute viral hepatitis in Chonburi Province. One gram of stool was used to prepare a 10% suspension (w/v) with phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4. The suspension was clarified by centrifugation for 30 min at 10,000 g at 4°C , and the supernatant was kept at -70°C until use.

Viral RNA extraction

Viral RNA was extracted from 100 μl of 10% suspension (w/v) of serum and stool samples, and the eluent from each water sample using Trizol reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions.

RT-PCR and sequencing

RNA was dissolved with 20 μl RNase-free distilled water containing 40 U ribonuclease inhibitor (RNasin, Promega, Madison, WI). For cDNA synthesis and the first polymerase chain reaction (PCR), 10 μl of the RNA was incubated for 45 min at 42°C with 15 pmol of reverse primer BR-9 (3310 - 3286 nt, 5'AGT CAC ACC TCT CAA GGA AAA CTT 3'). For the RNA sample, 40 μl of the reaction mixture containing $1 \times \text{AMV}$ buffer (10 mM Tris - HCl [pH 8.3], .5 mM MgSO_4 , 50 mM KCl, and 0.001% gelatin), 5 U of AMV reverse transcriptase, 5 U Tfl, 10 mM deoxynucleoside triphosphates (dNTPs) (Access RT-PCR system kit, Promega), and 15 pmol of forward primer BR-5 (2950 - 2972 nt, 5' TTG TCT GTC ACA GAA CAA TCA

G 3') were added. After an initial denaturation at 94°C for 2 min, 35 cycles of amplification were performed using the GeneAmp PCR System 2400 (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA). Each cycle consisted of denaturation for 1 min at 94°C, primer annealing for 1 min at 55°C, and an extension reaction for 1 min at 72°C followed by a final extension for 7 min at 72°C. The positions of the primers were numbered according to the complete nucleotide sequence of HAV HM175 strain.

A nested PCR was performed in 20 µl of reaction mixture containing 2 µl of the first PCR product, 15 pmol of forward primer RJ-3 (2984 – 3002 nt, 5' TCC CAG AGC TCC ATT GAA 3') 15 pmol of reverse primer BR-6 (3217 – 3193 nt, 5'AGG AGG TGG AAG CAC TTC ATT TGA 3'), 1 × Taq buffer (10 mM Tris-HCl [pH 8.3], 1.5 mM MgCL₂, 50 mM KCl, and 0.001% gelatin), 2.5 mM deoxynucleoside triphosphate (dNTPs), and 1U Taq DNA polymerase (Promega). The PCR was performed under the same conditions as the first PCR. The nested PCR products were purified with a QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany). A nucleotide sequence was determined with an ABI 3110 Genetic Analyzer (PE-Applied Biosystems) using a Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE-Applied Biosystems) as described.⁽¹²⁾ RJ3 and BR6 primers were used for sequencing. The nucleotide sequences were then aligned with the corresponding HAV genomic region using MacVector software version 4.5.3 (Kodak Scientific Imaging System, Oxford, UK).

Genetic analysis

Phylogenetic analysis was performed with the Phylogenetic Inference Package (PHYLIP) 3.5.7.2 (University of Washington, Seattle, WA). An evolutionary distance was estimated using DNADIST (UPGMA), and unrooted phylogenetic trees were constructed using the neighbor-joining (NJ) method. A phylogenetic tree was visualized and edited with TREE VIEW ver. 1.5.

Results

Determination of HAV Infection

Serological examination

All sera were tested for Hepatitis A, B, C and E infection. None were detected positive for Hepatitis B, C and E. Among 388 serum specimens, 188 were positive for anti-HAV IgM antibody. Of these, 51, 114 and 23 were specimens obtained from those coming from Songkhla, Chonburi and Chantaburi, respectively (Table 1). The results indicated that HAV was the causative agent of the 2008 hepatitis outbreak. In addition, clinical symptoms were correlated with an incubation time of HAV infection (data not shown).

Genetic analysis of HAV genotypes

An outbreak investigation team was further collected stool samples of some HAV-positive cases as well as possible drinking water as source(s) of contamination. Using RT-PCR, 42 out of 48 stool specimens and 1 out of 11 drinking tank water were positive for HAV RNA. Additionally, detection of HAV RNA was found in 30 out of 45 anti-HAV IgM positive sera (Table 1).

Due to a limitation in the amount of specimens collected, nucleotide sequencing at VP1/2A junction was performed in 15, 5 and 1 of serum, stool and water specimens, respectively. Sequencing and phylogenetic analysis was shown that each NT sequences of each samples were identical and classified into genotype 1A (Fig. 1). According to the genetic analysis, it could indicate that the 2008 HAV outbreak was due to genotype 1A and suggested that the possible source of HAV contamination was one of the drinking tanks in Chonburi training center.

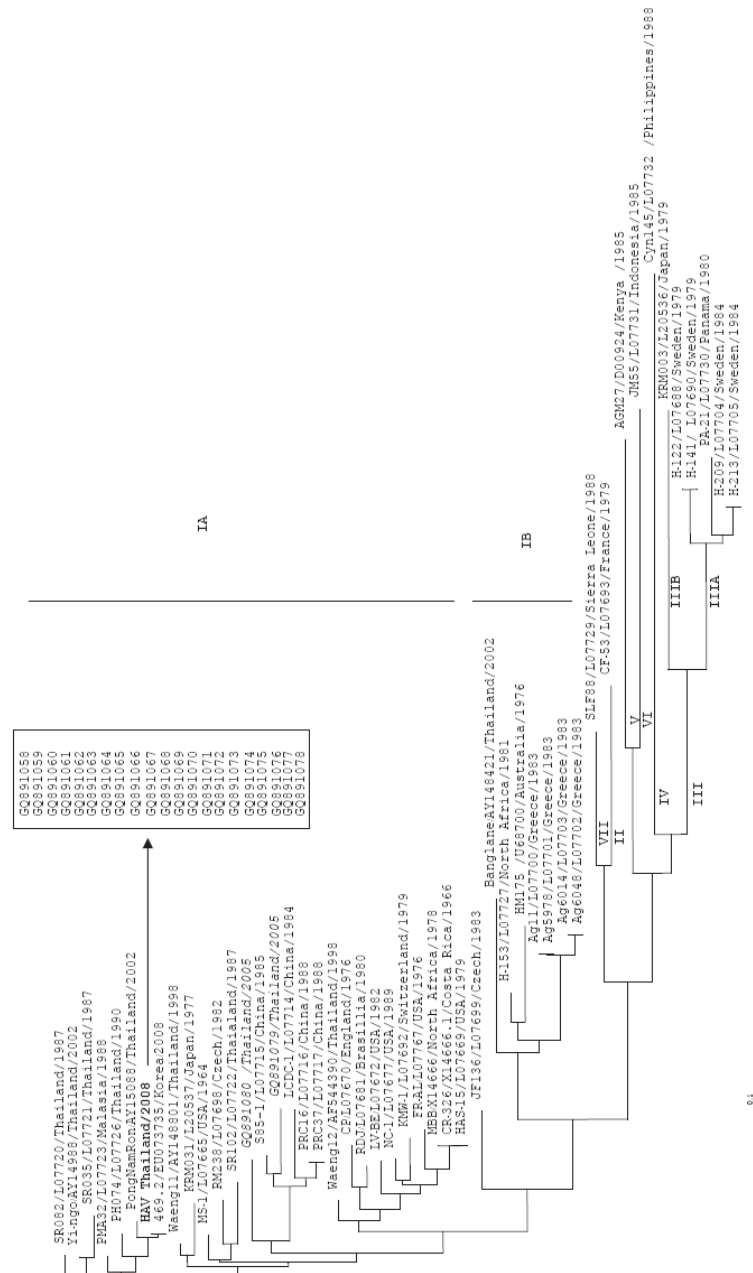
Table 1 Detection of Hepatitis A virus in various specimens during the 2008 HAV outbreak at the military training center, Chonburi Province, Thailand

Province of samples collection	Type of sample	Duration of Samples collection	Positive for anti-HAV IgM antibody/Total (%)	HAV-RNA positive/ Anti HAV-IgM positive (%)	No. of Sequencing/ HAV-RNA positive	Genotype
Songkhla	Serum	June 19–July 4	51/98 (52.0)	11/19 (57.9)*	5/11**	1A
Chonburi	Serum	June 21–July 7	114/228 (50.0)	12/19 (63.2)*	5/11**	1A
	Stool	June 21–July 7	nd	42/48 (87.5)	5/42**	1A
	(Drinking tank water)	June 21–July 7	nd	1/11 (9.1)	1/1	1A
Chanthaburi	Serum	July 1	23/62 (37.0)	7/7 (100)	5/7	1A
Total			188/388 (48.8)	73/94 (77.7)	21/73 (28.8)	

nd = not done

* = randomly selected sera depended on the limited amount of serum

** = randomly selected sequencing samples depended on PCR product concentration



148  วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
ปีที่ 59 ฉบับที่ 3 กรกฎาคม - กันยายน 2560

Discussion

Acute hepatitis mainly occurs by eating and/or drinking of food and/or water contaminated with Hepatitis A virus. Anti-HAV and HAV RNA assays are used to determine HAV infection. Anti-HAV IgM, in particular, is used to detect acute or recent infection. A number of HAV outbreaks in Thailand were reported in the past 10 years.^(12,14)

In this study, almost 50% of suspected cases were found positive for anti-HAV IgM. In addition, duration of specimens collection was in accordance with an incubation time known for HAV infection. Our findings could indicate that the 2008 outbreak of acute hepatitis among recruits attending the training course during June 19th to July 7th was caused by Hepatitis A virus.

HAV genotyping studies illustrated that all 21 strains were classified into GIA, one of the two genotypes previously reported in acute hepatitis patients during 1998 – 2002.⁽¹²⁾ Previous investigations suggested that the HAV outbreaks were due to indigenous HAV, where HAV strains identified in the central part of Thailand were different from those in the eastern part of the country.⁽¹⁴⁾ The present study also showed a strain indigenous to Chonburi province where the occurrence and the possible source of the outbreak were found. Interestingly, comparison of 168 bases in the VP1/2A region of the genome (168 bp) among sequences previously reported, it was shown that the sequences of the outbreak strains are identical to that of a strain detected in Korea in 2006 (EU073735.1)⁽¹⁵⁾, however, the relationship between these two strains is unknown.

Using molecular technique, the possible source of the 2008 outbreak was subjected to be one of the drinking water tanks. Raising awareness on good hygiene to the public and continuation on control measures of food and drinking water are, therefore, important. Additionally, laboratory-based surveillance should be regularly performed as a part of an alert system on occurrence of possible outbreaks.

Conclusion

The 2008 hepatitis A outbreak at the military training center, Chonburi was potentially caused by a contaminated drinking water tank. We also found that nucleotide sequencing of HAV from all representative clinical specimens demonstrated identical sequences and were classified into genotype IA. Good practices on hygiene are recommended to prevent any outbreaks that might occur.

Acknowledgments

We thank Dr.Darin Areechokchai for providing us with the serum specimens. This work was supported in part by grants-in-aid for scientific research from the National Research Council of Thailand (NRCT) and from the Ministry of Public Health (MOPH), Thailand. This

research was partially supported by the Grant-in-Aid for Scientific Research (C) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan (MEXT), and by the Research Program on Hepatitis and Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases from the Japan Agency for Medical Research and Development (AMED).

References

1. Ruddy SJ, Johnson RF, Mosley JW, Atwater JB, Rossetti MA, Hart JC. An epidemic of clam-associated hepatitis. *JAMA* 1969; 208(4): 649-55.
2. Schiff ER. Atypical clinical manifestations of hepatitis A. *Vaccine* 1992; 10(Suppl 1): S18-20.
3. Arankalle VA, Sarada Devi KL, Lole KS, Shenoy KT, Verma V, Haneephabi M. Molecular characterization of hepatitis A virus from a large outbreak from Kerala, India. *Indian J Med Res* 2006; 123(6): 760-9.
4. Lee CS, Lee JH, Kwon KS. Outbreak of hepatitis A in Korean military personnel. *Jpn J Infect Dis* 2008; 61(3): 239-41.
5. Schwarz NG, Revillion M, Roque-Afonso AM, Dussaix E, Giraud M, Liberpre C, et al. A food-borne outbreak of hepatitis A virus (HAV) infection in a secondary school in Upper Normandy, France, in November 2006. *Euro Surveill* 2008; 13(22): [5 p.].
6. Schmid D, Fretz R, Buchner G, Konig C, Perner H, Sollak R, et al. Foodborne outbreak of hepatitis A, November 2007-January 2008, Austria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; 28(4): 385-91.
7. Lednar WM, Lemon SM, Kirkpatrick JW, Redfield RR, Fields ML, Kelley PW. Frequency of illness associated with epidemic hepatitis A virus infections in adults. *Am J Epidemiol* 1985; 122(2): 226-33.
8. Hadler SC. Global impact of hepatitis A virus infection: changing patterns. In: Hollinger FB, LS, Margolis HS, editor. *Viral hepatitis and liver disease*. Baltimore: Williams and Wilkins Press; 1991. p. 14-20.
9. Costa-Mattioli M, Di Napoli A, Ferre V, Billaudel S, Perez-Bercoff R, Cristina J. Genetic variability of hepatitis A virus. *J Gen Virol* 2003; 84(Pt 12): 3191-201.
10. Robertson BH, Khanna B, Nainan OV, Margolis HS. Epidemiologic patterns of wild-type hepatitis A virus determined by genetic variation. *J Infect Dis* 1991; 163(2): 286-92.
11. Robertson BH, Jansen RW, Khanna B, Totsuka A, Nainan OV, Siegl G, et al. Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *J Gen Virol* 1992; 73(Pt 6): 1365-77.
12. Wattanasri N, Ruchusatsawat K, Wattanasri S. Phylogenetic analysis of hepatitis A virus in Thailand. *J Med Virol* 2005; 75(1): 1-7.
13. Divizia M, De Filippis P, Di Napoli A, Gabrieli R, Santi AL, Pana A. HAV recovery from tap water: evaluation of different types of membranes. *Ann Ig* 1989; 1(1-2): 57-64.
14. Ruchusatsawat K, Thiemsing L, Siripanee J, Sawanpanyalert P. Genotypes of hepatitis A virus in Thailand 2002-2006. *J Health Sci* 2007; 16(6): 934-42.
15. Yun H, Kim S, Lee H, Byun KS, Kwon SY, Yim HJ, et al. Genetic analysis of HAV strains isolated from patients with acute hepatitis in Korea, 2005-2006. *J Med Virol* 2008; 80(5): 777-84.

สายพันธุ์เชื้อไวรัสตับอักเสบ เอ ที่ระบาดในศูนย์การฝึก อบรมทหารเรือ จังหวัดชลบุรี โดยสาเหตุจากแหล่งน้ำดื่ม

เกรียงศักดิ์ ฤชศาสตร์* ชลธิชา กาวิตำ* ลัดดาวัลย์ เทียมสิงห์* สมชาย แสงกิจพร*

นาโอคัชชี ทาเคะ*** มาซาชิ ทซึมิ*** โคจิ อิชิ*** ลี แทง ชัง****

และจกกลนี้ วงศ์ปิยะบวร*****

* ฝ่ายไวรัสตับอักเสบ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

** ศูนย์ร่วมมือการวิจัยโรคติดต่ออุบัติใหม่ และอุบัติซ้ำระหว่างประเทศไทยกับประเทศญี่ปุ่น กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

*** สถาบันวิจัยโรคทางจุลชีพ, มหาวิทยาลัยโอซากา, ซุอิตะ, โอซากา 565-0781, ประเทศญี่ปุ่น

**** ฝ่ายไวรัสวิทยา II, สถาบันวิจัยโรคติดต่อแห่งชาติ, โตเกียว 208-0011, ประเทศญี่ปุ่น

***** ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

บทคัดย่อ เชื้อไวรัสตับอักเสบ เอ สามารถติดต่อได้ทางการกิน การดื่ม จากอาหาร หรือน้ำที่มีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัส ซึ่งเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย โดยเฉพาะในกลุ่มวัยเริ่มทำงาน ได้ทำการตรวจตัวอย่างซีรัมของผู้ที่มีอาการป่วยสงสัยว่าอาจเกิดจากเชื้อไวรัสตับอักเสบ จำนวน 388 ตัวอย่าง หลังจากเข้ารับการฝึกอบรมในปี พ.ศ. 2551 ที่ศูนย์การฝึกอบรมทหารเรือ จังหวัดชลบุรี ผลการตรวจด้วยเทคนิคซีโรโลยี พบว่าให้ผลบวกกับแอนติบอดีชนิดไอจีเอ็มต่อไวรัสตับอักเสบ เอ จำนวน 188 ตัวอย่าง โดยที่ไม่พบการบ่งชี้การติดเชื้อเฉียบพลันจากไวรัสตับอักเสบ ซี บี และอี จากนั้นได้สุ่มตัวอย่างซีรัมที่ให้ผลบวกต่อไวรัสตับอักเสบ เอ จำนวน 45 ตัวอย่าง พร้อมกับตัวอย่างอุจจาระ 48 ตัวอย่าง และตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำดื่ม 11 ตัวอย่าง นำมาตรวจสอบพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบ เอ โดยวิธี reversed-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) ในส่วนเชื่อมต่อ VP1/2A (234 เบส) พบว่าให้ผลบวก 30, 42 และ 1 ตัวอย่าง ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วนเชื่อมต่อ VP1/2A ของเชื้อไวรัสตับอักเสบ เอ ที่ได้จากตัวอย่างแหล่งน้ำดื่ม และตัวอย่างผู้ป่วย พบว่าลำดับเบสของแต่ละตัวอย่างตรงกันทั้งหมด และจัดอยู่ในกลุ่มจีโนไทป์ 1 เอ (Genotype 1A, GIA) การศึกษานี้แสดงว่าสาเหตุของการระบาดที่ศูนย์การฝึกอบรมทหารเรือครั้งนี้อาจเกิดจากการปนเปื้อนในแหล่งน้ำดื่ม ดังนั้นมาตรการป้องกัน และการตรวจสอบความสะอาดของแหล่งน้ำจึงเป็นสิ่งจำเป็น

การใช้ Accuracy profile ตรวจสอบความถูกต้อง ของแผ่นทดสอบ Petrifilm™ Rapid Yeast and Mold Count Plate สำหรับตรวจหา ปริมาณยีสต์และราในเครื่องดื่ม

กรรณา ตีรสมิทธิ์ ลดาพรรณ แสงคล้าย และณลินี อยู่เพชร

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณทางจุลชีววิทยาตาม ISO 16140 – 2:2016 กำหนดให้ใช้ Accuracy profile ในการเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ของวิธีอ้างอิงกับวิธีทางเลือก งานวิจัยนี้ได้นำ Accuracy profile มาใช้ตรวจสอบความถูกต้องของแผ่นทดสอบ Petrifilm™ Rapid Yeast and Mold (3M RYM) ในการตรวจนับปริมาณยีสต์และราในเครื่องดื่มชนิดเหลวเปรียบเทียบกับวิธีอ้างอิง US FDA BAM โดยใช้ตัวอย่างเครื่องดื่มที่ปนเปื้อนยีสต์และราตามธรรมชาติและตัวอย่างที่เติมเชื้อที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ ระดับต่ำ (1 – 100 CFU/มิลลิลิตร) ระดับกลาง (100 – 1,000 CFU/มิลลิลิตร) และระดับสูง (มากกว่า 1,000 CFU/มิลลิลิตร) ผลทดสอบพบว่าเมื่อบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25°C และ 28°C นาน 48 และ 72 ชั่วโมง ผลทดสอบของวิธี 3M และวิธีอ้างอิงสอดคล้องกันเป็นแนวเส้นตรง (Linearity) และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (r) ที่ใช้หาความสัมพันธ์ของ 2 วิธีมีค่าใกล้เคียง 1 เท่ากับ 0.9986, 0.9988, 0.9995 และ 0.9992 ตามลำดับ เมื่อสร้างกราฟ Accuracy profile เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของแผ่นทดสอบ 3M RYM โดยกำหนดให้ช่วงครอบคลุมการกระจายของข้อมูล (β -expectation tolerance intervals, β -ETI) เท่ากับ 80% ($\beta\%$) และขอบเขตการยอมรับผลทดสอบ (Acceptability limits, AL หรือ λ) เท่ากับ ± 0.3 และ $\pm 0.5 \log_{10}$ CFU/มิลลิลิตร ผลการประเมินพบว่าเมื่อ λ เท่ากับ $\pm 0.5 \log_{10}$ วิธี 3M ที่บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25°C และ 28°C นาน 48 และ 72 ชั่วโมง มีช่วงค่าของ β -ETI อยู่ในขอบเขตการยอมรับที่ทุกระดับการปนเปื้อน แต่เมื่อ λ เท่ากับ $\pm 0.3 \log_{10}$ ช่วงค่า β -ETI อยู่ในขอบเขตการยอมรับที่ทุกระดับการปนเปื้อนเมื่อบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25°C และ 28°C นาน 72 ชั่วโมงเท่านั้น สรุปได้ว่าช่วงความใช้ได้ของแผ่นทดสอบ 3M RYM ขึ้นกับการกำหนด $\beta\%$ และขอบเขตการยอมรับผลทดสอบ (λ) ของผู้ใช้งาน กล่าวได้ว่าการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีด้วยกราฟ Accuracy profile เป็นเครื่องมือให้ผู้ใช้งานสามารถพิจารณาความเหมาะสมของการนำวิธีไปใช้

Accepted for publication, 18 July 2017

บทนำ

ในอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องดื่ม จุลินทรีย์ประเภทหนึ่งที่มีความสำคัญมากต่อสุขลักษณะการผลิต คือ ยีสต์และรา การตรวจสอบยีสต์และราในอาหารและเครื่องดื่มเป็นปัจจัยสำคัญต่อการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ปัจจุบันวิธีอ้างอิงที่ใช้ตรวจนับยีสต์และราในอาหารมีมากมายหลายวิธี ตามเอกสารอ้างอิงที่เชื่อถือได้และโดยทั่วไป นิยมใช้เทคนิคการเพาะเชื้อ (Culturable technique) ตามเอกสาร ISO 21527:2008⁽¹⁾ หรือ U.S. Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual (US FDA BAM)⁽²⁾ ซึ่งใช้เวลานานถึง 5 - 7 วัน อาจเข้าไปสำหรับอุตสาหกรรมอาหารที่ต้องการทราบผลวิเคราะห์ภายในเวลารวดเร็วในการนำผลไปใช้ในการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ วัตถุดิบ หรืออื่น ๆ ในกระบวนการผลิตไม่ให้เกิดความเสียหายทางธุรกิจ วิธีทางเลือกที่ได้ผลวิเคราะห์รวดเร็วขึ้นจึงได้ถูกพัฒนาด้วยเทคนิคต่าง ๆ เช่น Flow cytometry ชีวโมเลกุล (Molecular) อิมมูโนวิทยา⁽³⁾ แต่วิธีเหล่านี้ต้องใช้เครื่องมืออัตโนมัติและค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์ค่อนข้างแพง วิธีการเพาะเชื้อที่ให้ผลที่รวดเร็วกว่าจึงได้ถูกพัฒนาขึ้นเป็นวิธีทางเลือก การใช้แผ่นทดสอบ 3M Petrifilm™ Rapid Yeast and Mold Count Plate (3M RYM) ก็เป็นวิธีทางเลือกที่รวดเร็ว โดยอาศัยหลักการเจริญของเชื้อบนแผ่นทดสอบที่มีสารอาหารผสมยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล และคลอเตตราซัยคลิน⁽⁴⁾ รวมทั้งสารที่ละลายน้ำแล้วทำให้เกิดเจล และอินดิเคเตอร์ที่มีความไวต่อเอนไซม์ฟอสฟาเตสที่มีอยู่ในยีสต์ รา และอาหารบางชนิด⁽⁵⁾ แต่การนำวิธีทางเลือกมาใช้อย่างมั่นใจว่าได้ผลทดสอบที่เทียบเท่าวิธีอ้างอิงจำเป็นจะต้องดำเนินการตรวจสอบความถูกต้องหรือความใช้ได้ของวิธีทางเลือก (Validation of alternative method) แผ่นทดสอบ 3M RYM ถูกพัฒนาให้อ่านผลได้เร็วขึ้นภายใน 48 - 60 ชั่วโมง และบ่มเพาะเชื้อได้ 2 อุณหภูมิ คือ 25°C และ 28°C หน่วยงาน AOAC และ AFNOR ได้ตรวจสอบความถูกต้องของแผ่นทดสอบ 3M RYM โดยผลการตรวจสอบของ AOAC⁽⁶⁾ ที่ดำเนินการภายในห้องปฏิบัติการในอาหาร 10 ชนิด พบว่าเมื่อบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25°C นาน 48 และ 60 ชั่วโมง มีอาหาร 4 ชนิด ได้แก่ โยเกิร์ต แอปเปิ้ล เนื้อวัวบด และไส้กรอก ที่ผลของแผ่นทดสอบ 3M RYM และวิธีอ้างอิง US FDA BAM หรือ ISO 21527 ไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 สำหรับครีมเปรี้ยว แชนดวิช พาย อัลมอนต์ และแป้งโดขนมปังแช่แข็ง มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ส่วนชุดผงแผ่นทดสอบ 3M RYM ตรวจพบเชื้อที่เดิมลงไป แต่วิธีอ้างอิงตรวจไม่พบเชื้อ สำหรับหน่วยงาน AFNOR⁽⁷⁾ ที่ดำเนินการตรวจสอบภายในห้องปฏิบัติการ โดยเปรียบเทียบการบ่มแผ่นทดสอบ 3M RYM ที่อุณหภูมิ 25°C และ 28°C นาน 60 และ 72 ชั่วโมง กับวิธีอ้างอิง ISO 21527 และมีการประเมินผลตาม ISO 16140:2003 ได้แก่ การทดสอบความเป็นเส้นตรง การหาความสัมพันธ์ของ 2 วิธีด้วยการวิเคราะห์การถดถอย (Regression analysis) ความแม่นยำสัมพัทธ์ (Relative accuracy) ความไวสัมพัทธ์ (Relative sensitivity) ขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณ (LOQ) ซึ่งสรุปว่าแผ่นทดสอบ 3M RYM เชื่อถือได้ ในปี พ.ศ. 2559 ISO ได้ประกาศใช้ ISO 16140-2:2016⁽⁸⁾ ซึ่งมีการประเมินผลด้วย Accuracy profile ที่เพิ่มขึ้นจากปี ค.ศ. 2003 โดย Boulanger และคณะ⁽⁹⁾ ได้ริเริ่มนำหลักการของ Accuracy profile มาใช้ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทางเลือกเพื่อลดข้อจำกัดของวิธีแบบเดิมที่ใช้การทดสอบสมมติฐานแบบ null hypothesis ในการตรวจสอบความแตกต่างของสองวิธีที่ความเชื่อมั่นระดับหนึ่ง และให้ข้อคิดเห็นว่าค่าความเที่ยง (Precision) ที่วัดด้วยค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation) ของผลทดสอบวิธีทางเลือกที่มีค่าต่ำหรือสูงไม่มีผลกระทบกับการทดสอบด้วย null hypothesis ซึ่งอาจทำให้การยอมรับวิธีของผู้ที่จะนำวิธีไปใช้งานไม่ได้คำนึงถึงความเที่ยงของวิธีทางเลือก นอกจากนี้วิธีทดสอบด้วย null hypothesis ไม่สามารถแสดงค่าความถูกต้องได้อย่างสมบูรณ์ เพราะไม่แสดงขอบเขตของการยอมรับได้ของผลวิเคราะห์ แต่การใช้ Accuracy profile สามารถทำได้โดยอาศัยค่าความแตกต่างสูงสุดที่ยอมรับได้ระหว่างผลทดสอบวิธีทางเลือกกับวิธีอ้างอิง Accuracy profile จึงเป็นเครื่องมือทางสถิติที่เหมาะสมสำหรับการแปลผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ได้ดีกว่าการทดสอบ null hypothesis เพราะมีการรวม β -expectation

tolerance intervals (β -ETI) และขอบเขตการยอมรับอยู่ภายในกราฟเดียวกัน ซึ่ง β -ETI เป็นช่วงที่คาดว่าผลการทดสอบในขนาดจำนวน $\beta\%$ จะตกอยู่ในช่วงนี้ การใช้ Accuracy profile ทำให้ผู้นำวิธีไปใช้สามารถพิจารณาความเหมาะสมของวิธีในการนำไปใช้ตามวัตถุประสงค์ของงาน (Fitness-for-purpose) ได้⁽¹⁰⁾ คณะผู้วิจัยจึงได้ศึกษาหลักการและทดลองนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบโดยศึกษากับแผ่นทดสอบ 3M RYM เปรียบเทียบกับวิธีอ้างอิง US FDA BAM ในการตรวจหาเชื้อและราในเครื่องดื่มชนิดเหลว

วัสดุและวิธีการ

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. Plate count agar (PCA) ผสมคลอแรมเฟนิคอล ความเข้มข้น 0.01% (PCA + chlo)
2. แผ่นทดสอบ 3M Petrifilm™ Rapid Yeast and Mold Count Plate (3M RYM)
3. Brain heart infusion broth (BHI broth)
4. สารละลาย 0.1% Peptone
5. สารละลาย Phosphate buffered saline + 0.1% Tween 20 (PBS + 0.1% Tween 20)

เครื่องมือและอุปกรณ์

อ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ $50 \pm 1^\circ\text{C}$ ตู้บ่มเพาะเชื้ออุณหภูมิ $25 \pm 1^\circ\text{C}$ และ $28 \pm 1^\circ\text{C}$ เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ ตู้บร้อน เครื่องนับโคโลนี กล้องจุลทรรศน์ เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง เครื่องผสม (Vortex mixer) เทอร์โมคัปเปิล นาฬิกาจับเวลา ปีเปตอัตโนมัติขนาด 1,000 ไมโครลิตร ปีเปตขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร ขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 250 มิลลิลิตร และ 500 มิลลิลิตร หลอดทดลองขนาด 18×150 มิลลิเมตร จานเพาะเชื้อขนาด 10×90 มิลลิเมตร แผ่นกระจกสไลด์ หลอดฉีดยาพลาสติกขนาด 10 มิลลิลิตร สำลีมีดปราศจากเชื้อ ห่วงเขี่ยเชื้อ หลอดหยด (Dropper) และไม้สวอป

จุลินทรีย์มาตรฐาน

ยีสต์มาตรฐาน *Saccharomyces cerevisiae* DMST 22805 และรามาตรฐาน *Aspergillus niger* DMST 15538 ได้จากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

วิธีเตรียมจุลินทรีย์มาตรฐาน

Saccharomyces cerevisiae เพาะยีสต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA + chlo บ่มที่อุณหภูมิ 25°C นาน 3 วัน แล้วเขี่ยเชื้อ 1 โคโลนี ใส่ลงในหลอด BHI broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มเพาะเชื้อที่ 25°C นาน 3 วัน เจือจางเชื้อด้วยสารละลาย 0.1% Peptone จนได้เชื้อประมาณ 10^5 CFU/มิลลิลิตร แล้วนำไปทำให้เชื้อขาดชีพ

Aspergillus niger เพาะราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA + chlo บ่มที่อุณหภูมิ 25°C นาน 5 วัน ใช้มีดปราศจากเชื้อ ตัดวันบริเวณขอบโคโลนีของราที่เจริญบนจานเพาะเชื้อ PCA + chlo ให้ได้ขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร นำไปวางตรงกลางจาน PCA + chlo บ่มเพาะเชื้อที่ 25°C นาน 7 วัน ทำการเก็บสปอร์โดยเติมสารละลาย PBS + 0.1% Tween 20 ประมาณ 5 มิลลิลิตร ลงบนจานเพาะเชื้อ ใช้ไม้สวอปถูไปมาเบาๆ บนเส้นใยเพื่อให้สปอร์หลุดออก แล้วใช้หลอดหยดดูดสารละลายสปอร์ไว้ในหลอดทดลองปราศจากเชื้อ เก็บสปอร์ซ้ำอีกหนึ่งครั้ง จากนั้นเทสารละลายสปอร์ทั้งหมดลงในหลอดฉีดยาที่บรรจุสำลีก้อนปราศจากเชื้อแบบหลวมๆ เพื่อกรองเส้นใยเชื้อราที่อาจติดมากับสปอร์ออก เก็บสารละลายสปอร์ที่ออกมาจากปลายหลอดฉีดยา เจือจางเชื้อด้วยสารละลาย 0.1% Peptone จนได้ระดับปริมาณเชื้อที่ต้องการแล้วนำไปทำให้เชื้อขาดชีพ

การทำให้จุลินทรีย์บาดเจ็บ (Injured) นำสารละลายยีสต์และสปอร์ราที่เตรียมได้ ใส่ลงในอ่างน้ำร้อน อุณหภูมิ $50 \pm 1^\circ\text{C}$ พร้อมกับหลอดที่มีสารละลาย 0.1% Peptone และเทอร์โมคัปเปิลสำหรับวัดอุณหภูมิ เมื่อแสดง อุณหภูมิ $50 \pm 1^\circ\text{C}$ แล้วจึงเริ่มจับเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลานำสารละลายเชื้อไปใช้ทดสอบต่อไป

ตัวอย่าง

เครื่องดื่มชนิดเหลวจำนวน 8 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างปนเปื้อนยีสต์และราตามธรรมชาติ (Natural contamination) ที่ทราบปริมาณปนเปื้อน ได้แก่ น้ำกระเจียบ น้ำมะขาม น้ำแอปเปิลผสมวานิลลาทางจระเข้ น้ำลำไย กาแฟเย็น และตัวอย่างที่เติมจุลินทรีย์มาตรฐานที่ทำให้บาดเจ็บ (Artificial contamination) ได้แก่ น้ำลินจี่ น้ำชาเขียว และน้ำผักผลไม้รวม

เตรียมตัวอย่างให้มีการปนเปื้อนยีสต์และรา 3 ระดับ คือ ระดับต่ำ ($1 - 100 \text{ CFU/มิลลิลิตร}$) ระดับกลาง ($100 - 1,000 \text{ CFU/มิลลิลิตร}$) และระดับสูง (มากกว่า $1,000 \text{ CFU/มิลลิลิตร}$) การเจือจางตัวอย่างใช้ตัวอย่าง ตั้งต้น 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในสารละลาย 0.1% Peptone ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้ตัวอย่างที่เจือจาง 10 เท่า (Tenfold dilution) ทำการเจือจางต่อจนได้ระดับเชื้อที่สามารถนับได้

การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง

แต่ละตัวอย่างทดสอบ 2 วิธี คือ วิธี 3M และวิธีอ้างอิง US FDA BAM 2001 โดยทดสอบ 5 ซ้ำสำหรับ วิธี 3M และทดสอบ 3 ซ้ำสำหรับวิธีอ้างอิง

วิธี 3M⁽¹⁾

ทดสอบตัวอย่าง 2 ชุด สำหรับแยกบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25°C และ 28°C นำแผ่นทดสอบ 3M RYM วางบนพื้นเรียบ แล้วใช้ปิเปตอัตโนมัติดูดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ยกแผ่นฟิล์มด้านบนขึ้น แล้วปล่อยตัวอย่างลงตรงกลาง แผ่นทดสอบ ค่อยๆ วางแผ่นฟิล์มด้านบนลง ใช้ตัวกดแผ่นทดสอบ 3M RYM กดเบาๆ ให้ตัวอย่างกระจายทั่วพื้นที่ วงกลม นำตัวกดออก วางแผ่นทดสอบทิ้งไว้สักครู่ ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25°C และ 28°C นับจำนวนยีสต์และรา เมื่อครบเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง และ 72 ± 3 ชั่วโมง รายงานผลเป็น CFU/มิลลิลิตร ลักษณะโคโลนียีสต์ คือ ขนาดเล็ก นูน มีขอบเขตชัดเจน สีน้ำตาลอมชมพู ถึงสีเขียวม่วงฟ้า ลักษณะโคโลนีรา คือ ขนาดใหญ่ แบน สีเขียวม่วงฟ้า ตรงกลางโคโลนีมีจุดเข็ม ขอบแผ่กระจาย

วิธีอ้างอิง US FDA BAM⁽²⁾

ปิเปตตัวอย่างใส่จานเพาะเชื้อ 3 จาน จานละ 1 มิลลิลิตรต่อระดับการเจือจาง เทอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA + chlo ลงไปผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25°C นาน 5 - 7 วัน นับจำนวนยีสต์และรา แล้วหาค่าเฉลี่ย จาก 3 จานเพาะเชื้อ รายงานผลเป็น CFU/มิลลิลิตร

การประเมินผล

นำผลการนับจำนวนโคโลนียีสต์และราของทั้งสองวิธีมาแปลงเป็นค่า $\log_{10} \text{CFU/มิลลิลิตร}$ แล้วดำเนินการ ดังนี้

1. การทดสอบการเพิ่มขึ้นของจำนวนโคโลนีของวิธี 3M

ใช้สถิติ Paired t-test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ทดสอบการเพิ่มขึ้นของจำนวนโคโลนีในการทดสอบด้วย วิธี 3M เมื่อใช้เวลาบ่มเพาะเชื้อนานขึ้นจาก 48 ชั่วโมงเป็น 72 ชั่วโมง ถ้าค่า p ที่คำนวณได้น้อยกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05 แสดงว่าการบ่มเพาะเชื้อนาน 72 ชั่วโมง มีจำนวนโคโลนีมากกว่าการบ่มนาน 48 ชั่วโมง

2. การทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) และการหาความสัมพันธ์ของสองวิธี

ใช้ซอฟต์แวร์โปรแกรม EXCEL สร้างกราฟดูความเป็นเส้นตรง (Linearity) พร้อมทั้งหาความสัมพันธ์ระหว่างวิธีอ้างอิงกับวิธี 3M ที่บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25°C และ 28°C นาน 48 และ 72 ชั่วโมง โดยใช้สถิติการถดถอยเชิงเส้นอย่างง่าย (Simple linear regression) หาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (Pearson's correlation coefficient, r) และค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (Regression coefficient) หรือความชัน (Slope)

3. การตรวจสอบความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธี 3M ด้วยกราฟ Accuracy profile

การสร้างกราฟ Accuracy profile⁽⁸⁾

สัญลักษณ์

- i = ตัวอย่าง
- q = จำนวนตัวอย่าง ($1 \leq i \leq q$) ในที่นี้ $q = 8$
- j = ตัวอย่างทดสอบทวนซ้ำ (Repeatability)
- n = จำนวนการทวนซ้ำของตัวอย่าง ($1 \leq j \leq n$)
ในที่นี้ วิธี 3M, $n = 5$ และวิธีอ้างอิง $n = 3$
- alt = วิธีทางเลือก (Alternative method) หมายถึง วิธี 3M
- ref = วิธีอ้างอิง (Reference method) หมายถึง วิธีอ้างอิง US FDA BAM

วิธีทำ

1. กำหนดขอบเขตการยอมรับผลทดสอบ (Acceptability limit, λ) เท่ากับ $\pm 0.3 \log_{10}$ และ $\pm 0.5 \log_{10}$

2. แปลงข้อมูลผลวิเคราะห์เป็นค่า $\log_{10}$ CFU

3. หาค่ามัธยฐานของผลทดสอบของแต่ละตัวอย่าง i ที่ได้จากวิธีอ้างอิง เรียกค่านี้ว่า ค่าอ้างอิง (X_i)

$$X_i = \text{median}(x_{ij})$$

4. หาค่ามัธยฐานของผลทดสอบของแต่ละตัวอย่าง i ที่ได้จากวิธี 3M

$$Y_i = \text{median}(y_{ij})$$

5. คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation) ของแต่ละตัวอย่างที่ได้จากวิธี 3M ($S_{alt,i}$)

$$S_{alt,i} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{j=1}^n (y_{ij} - \bar{y}_i)^2}$$

6. คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานรวม (Combined standard deviation) ที่ได้จากวิธี 3M (S_{alt})

$$S_{alt} = \sqrt{\frac{1}{q} \sum_{i=1}^q S_{alt,i}^2}$$

7. คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของแต่ละตัวอย่าง ($S_{ref,i}$) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานรวมที่ได้จากวิธีอ้างอิง (S_{ref})

$$S_{ref,i} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{j=1}^n (x_{ij} - \bar{x}_i)^2}$$

และ

$$S_{ref} = \sqrt{\frac{1}{q} \sum_{i=1}^q S_{ref,i}^2}$$

ค่า S_{ref} นำมาใช้เมื่อผลทดสอบอยู่นอกขอบเขตการยอมรับ โดยต้องพิจารณาว่าค่า S_{ref} มากกว่า 0.125 หรือไม่ ถ้ามากกว่า ต้องปรับค่าขอบเขตการยอมรับผลทดสอบใหม่ คือ $AL_S = 4 \cdot S_{ref}$

8. คำนวณค่าความแตกต่างของค่ามัธยฐานระหว่างสองวิธีของแต่ละตัวอย่าง i เรียกว่า Bias (B_i) หรือเรียกว่า ค่าความเบี่ยงเบนของผลวิธี 3M

$$B_i = Y_i - X_i$$

9. คำนวณขีดจำกัด (Limits) ของช่วงความคลาดเคลื่อนคาดหวัง (β -expectation tolerance interval, β -ETI) ซึ่งเป็นช่วงที่คาดว่าผลทดสอบจำนวน $\beta\%$ ในอนาคตที่ได้จากวิธี 3M จะตกอยู่ในช่วงค่านี้ โดยกำหนดสัดส่วนของผลทดสอบในอนาคตนี้เท่ากับ β

$$\text{ช่วงค่า } \beta - \text{ETI} = B_i \pm T \cdot S_{alt} \sqrt{1 + \frac{1}{n}}$$

เมื่อ $T = T_{\left(\frac{1-\beta}{2}\right); q(n-1)}$ เป็นค่า percentile ของการกระจายแบบ student-t สำหรับความ

น่าจะเป็น β ซึ่ง ISO 16140 กำหนด β ไว้เท่ากับ 80% และ $q(n-1) = \text{degrees of freedom}$ นั่นคือ T เป็นค่า coverage factor ของช่วง β -ETI ของวิธี 3M

จะได้ขีดจำกัดบน (Upper limit, U_i) และขีดจำกัดล่าง (Lower limit, L_i) ของช่วงค่า β -ETI ดังนี้

$$U_i = B_i + T \cdot S_{alt} \sqrt{1 + \frac{1}{n}} \text{ และ } L_i = B_i - T \cdot S_{alt} \sqrt{1 + \frac{1}{n}}$$

10. สร้างกราฟ Accuracy profile ให้แกน X เป็นค่าที่ได้จากวิธีอ้างอิงที่แปลงเป็นค่า $\log_{10}$ แล้ว และแกน Y เป็นค่า bias, acceptability limit, upper limit และ lower limit ของช่วงค่า β -ETI

ผล

เมื่อบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25°C และ 28°C นาน 48 และ 72 ชั่วโมง ผลทดสอบของวิธี 3M กับผลของวิธีอ้างอิงมีความแตกต่างกันไม่เกิน $\pm 0.5 \log_{10} \text{CFU/มิลลิลิตร}$ (ตารางที่ 1) และพบว่าที่ทุกระดับการปนเปื้อน การทดสอบด้วยวิธี 3M ที่อุณหภูมิ 25°C และ 28°C นาน 72 ชั่วโมง มีจำนวนโคโลนียีสต์และราเพิ่มขึ้นกว่าเวลาบ่ม 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 1) จำแนกได้ดังนี้

- ที่การปนเปื้อนเชื้อระดับต่ำ (1 - 100 CFU/มิลลิลิตร) วิธี 3M ที่บ่มอุณหภูมิ 25°C นาน 72 ชั่วโมง มีจำนวนโคโลนียีสต์และราเพิ่มขึ้น 0.125 ถึง 0.240 $\log_{10} \text{CFU/มิลลิลิตร}$ และที่อุณหภูมิ 28°C มีจำนวนโคโลนีเพิ่มขึ้น 0.085 ถึง 0.176 $\log_{10} \text{CFU/มิลลิลิตร}$

- ที่การปนเปื้อนเชื้อระดับปานกลาง (100 - 1,000 CFU/มิลลิลิตร) วิธี 3M ที่บ่มอุณหภูมิ 25°C นาน 72 ชั่วโมง มีจำนวนโคโลนียีสต์และราเพิ่มขึ้น 0.013 ถึง 0.065 $\log_{10} \text{CFU/มิลลิลิตร}$ และ 28°C มีจำนวนโคโลนีเพิ่มขึ้น 0.000 ถึง 0.026 $\log_{10} \text{CFU/มิลลิลิตร}$

- ที่การปนเปื้อนเชื้อระดับสูง (มากกว่า 1,000 CFU/มิลลิลิตร) วิธี 3M ที่บ่มอุณหภูมิ 25°C นาน 72 ชั่วโมง มีจำนวนโคโลนียีสต์และราเพิ่มขึ้น 0.000 ถึง 0.066 $\log_{10} \text{CFU/มิลลิลิตร}$ และ 28°C มีจำนวนโคโลนีเพิ่มขึ้น 0.000 ถึง 0.006 $\log_{10} \text{CFU/มิลลิลิตร}$

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบจำนวนโคโลนียีสต์และราโดยวิธี 3M ที่อุณหภูมิบ่มเพาะเชื้อ 25°C และ 28°C กับวิธีอ้างอิง US FDA BAM

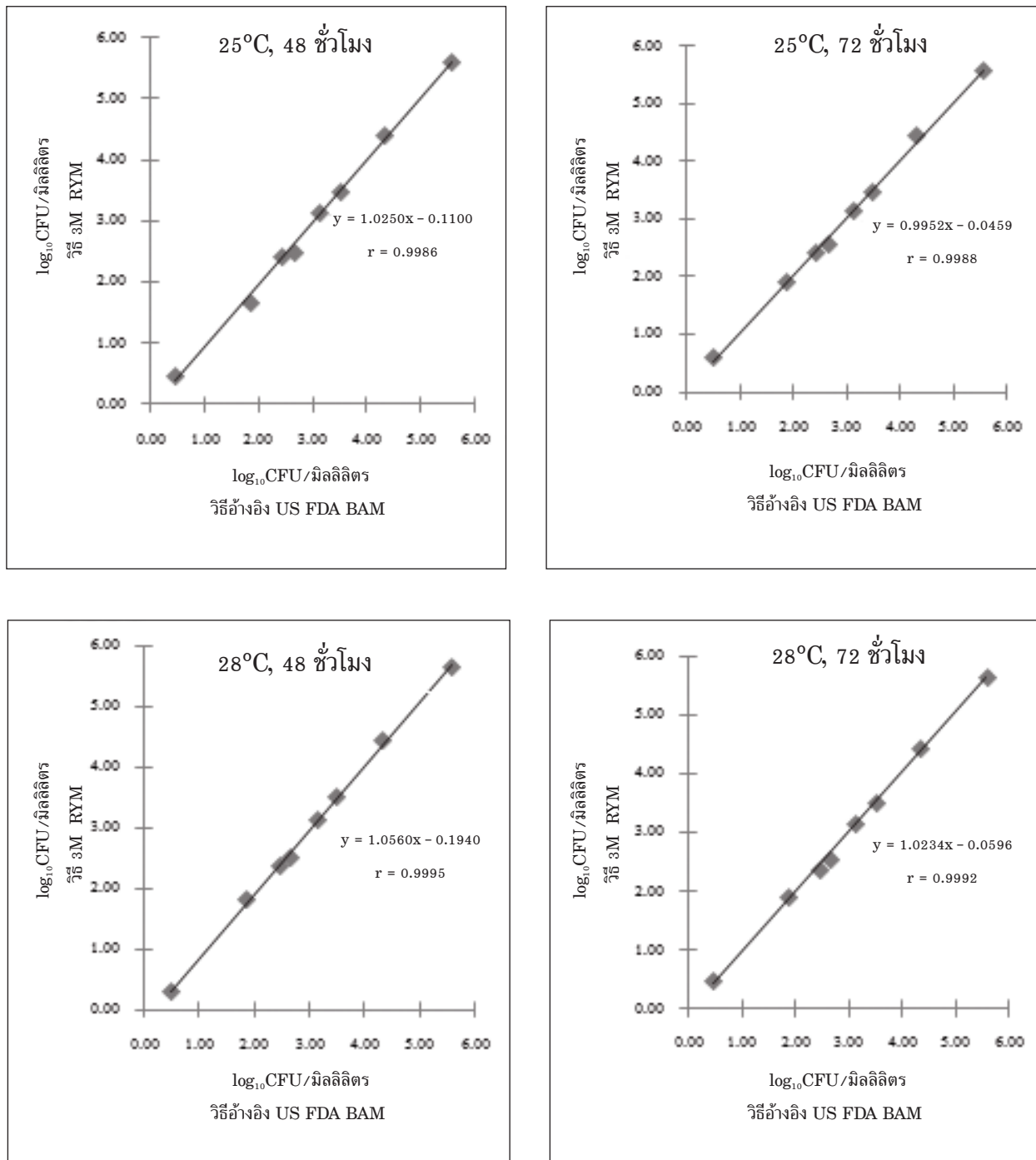
ระดับ การปนเปื้อน	วิธีอ้างอิง US FDA BAM	ผลต่างของ Median log ₁₀ CFU/ml ระหว่าง 3M กับวิธีอ้างอิง US FDA BAM							
		วิธี 3M ที่ 25°C		วิธี 3M ที่ 28°C		ที่ 25°C		ที่ 28°C	
	Median log ₁₀ CFU/ml	Median log ₁₀ CFU/ml		Median log ₁₀ CFU/ml					
CFU/ml	log ₁₀ CFU/ml	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
ต่ำ	0.477	0.477	0.602	0.301	0.477	0.000	+0.125	-0.176	0.000
(1 – 100)	1.857	1.663	1.903	1.813	1.898	-0.194	+0.046	-0.044	+0.041
ปานกลาง	2.435	2.410	2.423	2.375	2.375	-0.025	-0.012	-0.060	-0.060
(100 – 1,000)	2.650	2.491	2.556	2.505	2.531	-0.159	-0.094	-0.145	-0.119
สูง	3.127	3.134	3.149	3.137	3.143	+0.007	+0.022	+0.010	+0.016
(มากกว่า 1,000)	3.491	3.491	3.491	3.505	3.505	0.000	0.000	+0.014	+0.014
	4.326	4.407	4.473	4.435	4.435	+0.081	+0.147	+0.109	+0.109
	5.572	5.580	5.591	5.653	5.653	+0.008	+0.019	+0.081	+0.081

การทดสอบการเพิ่มขึ้นของจำนวนโคโลนีของวิธี 3M

จากการทดสอบทางสถิติพบว่า วิธี 3M เมื่อใช้เวลาบ่มเพาะเชื้อนานขึ้นจาก 48 ชั่วโมงเป็น 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25°C มีค่า p-value เท่ากับ 0.0267 ในขณะที่เมื่อบ่ม 28°C มีค่า p-value เท่ากับ 0.0733

การทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) และการหาความสัมพันธ์ของสองวิธี

จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างวิธีอ้างอิง US FDA BAM และวิธี 3M ที่อุณหภูมิ 25°C และ 28°C (ภาพที่ 1) พบว่า 2 วิธีมีความสัมพันธ์กันเป็นเส้นตรง เมื่อใช้สถิติการถดถอยเชิงเส้นอย่างง่าย ได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (r) ที่อุณหภูมิ 25°C เวลา 48 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง เท่ากับ 0.9986 และ 0.9988 ที่อุณหภูมิ 28°C เวลา 48 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง เท่ากับ 0.9995 และ 0.9992 ตามลำดับ ส่วนค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยหรือความชัน ที่อุณหภูมิ 25°C เวลา 48 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง เท่ากับ 1.0250 และ 0.9952 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 28°C เวลา 48 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง เท่ากับ 1.0560 และ 1.0234 ตามลำดับ



ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์ของวิธีอ้างอิง US FDA BAM กับวิธี 3M ที่อุณหภูมิบ่มเพาะเชื้อ 25°C และ 28°C นาน 48 และ 72 ชั่วโมง

การสร้างกราฟ Accuracy profile

นำผลการนับจำนวนโคโลนียีสต์และราของวิธีอ้างอิง US FDA BAM และวิธี 3M ที่อุณหภูมิ 25°C และ 28°C นาน 48 และ 72 ชั่วโมง ไปคำนวณหาค่าความเบี่ยงเบน (Bias) ของผลทดสอบวิธี 3M ซีดจำกัดบนและขีดจำกัดล่างของช่วงความคลาดเคลื่อนคาดหวัง (Upper and Lower β -ETI limits) เพื่อสร้างกราฟ Accuracy profile โดยกำหนดค่าเบต้า (β) เท่ากับ 80% และขอบเขตการยอมรับผลทดสอบ (λ) เท่ากับ ± 0.3 และ $\pm 0.5 \log_{10}$ ใน (ตารางที่ 2 - ตารางที่ 5) นำผลคำนวณที่ได้ไปสร้างกราฟ Accuracy profile (ภาพที่ 2)

ตารางที่ 2 จำนวนยีสต์และราของวิธีอ้างอิง US FDA BAM และวิธี 3M ที่อุณหภูมิ 25°C เวลา 48 ชั่วโมง

วิธีทดสอบ	จำนวนซ้ำ	ตัวอย่าง ที่ 1	ตัวอย่าง ที่ 2	ตัวอย่าง ที่ 3	ตัวอย่าง ที่ 4	ตัวอย่าง ที่ 5	ตัวอย่าง ที่ 6	ตัวอย่าง ที่ 7	ตัวอย่าง ที่ 8
US FDA	1	3	89	235	447	1340	3000	20100	360000
BAM	2	5	72	337	357	1293	3333	21167	440000
	3	2	58	272	497	1373	3100	24667	373330
3M	1	4	44	257	350	1180	3200	30900	21000
	2	3	46	234	250	1510	2000	25100	38000
	3	5	65	295	290	1300	3900	29000	55000
	4	3	45	306	310	1510	2150	22000	30000
	5	3	57	163	360	1360	3100	25500	47000
แปลงเป็นค่า $\log_{10}$									
US FDA	1	0.477	1.949	2.371	2.650	3.127	3.477	4.303	5.556
BAM	2	0.699	1.857	2.528	2.553	3.112	3.523	4.326	5.643
	3	0.301	1.763	2.435	2.696	3.138	3.491	4.392	5.572
	X_i	0.477	1.857	2.435	2.650	3.127	3.491	4.326	5.572
3M	1	0.602	1.643	2.410	2.544	3.072	3.505	4.490	5.322
	2	0.477	1.663	2.369	2.398	3.179	3.301	4.400	5.580
	3	0.699	1.813	2.470	2.462	3.114	3.591	4.462	5.740
	4	0.477	1.653	2.486	2.491	3.179	3.332	4.342	5.477
	5	0.477	1.756	2.212	2.556	3.134	3.491	4.407	5.672
	Y_i	0.477	1.663	2.410	2.491	3.134	3.491	4.407	5.580
	$S_{alt,i}$	0.101	0.075	0.110	0.064	0.046	0.123	0.058	0.165
	n	5	5	5	5	5	5	5	5
	S_{alt}	0.100							
	$S_{ref,i}$	0.199	0.093	0.079	0.073	0.013	0.023	0.046	0.046
	n	3	3	3	3	3	3	3	3
	S_{ref}	0.090							
	$Y_i - X_i$	0.000	-0.195	-0.025	-0.159	0.006	0.000	0.081	0.008
	$S_{alt} \cdot \sqrt{(1+1/n)}$	0.109							
	$T(0.1,32)^{(12)}$	1.3086							
	$T \cdot S_{alt} \cdot \sqrt{(1+1/n)}$	0.143							
	U_i	0.143	-0.051	0.118	-0.016	0.150	0.143	0.224	0.151
	L_i	-0.143	-0.338	-0.168	-0.302	-0.137	-0.143	-0.062	-0.135

ตารางที่ 3 จำนวนยีสต์และราของวิธีอ้างอิง US FDA BAM และวิธี 3M ที่อุณหภูมิ 25°C เวลา 72 ชั่วโมง

วิธีทดสอบ	จำนวนซ้ำ	ตัวอย่าง ที่ 1	ตัวอย่าง ที่ 2	ตัวอย่าง ที่ 3	ตัวอย่าง ที่ 4	ตัวอย่าง ที่ 5	ตัวอย่าง ที่ 6	ตัวอย่าง ที่ 7	ตัวอย่าง ที่ 8
US FDA	1	3	89	235	447	1340	3000	20100	360000
BAM	2	5	72	337	357	1293	3333	21167	440000
	3	2	58	272	497	1373	3100	24667	373330
3M	1	4	69	265	390	1180	3200	30900	22000
	2	3	80	237	320	1510	2000	26300	39000
	3	5	99	295	360	1320	4000	32700	56000
	4	3	71	309	340	1510	2230	24200	33000
	5	5	90	172	450	1410	3100	29700	47000
แปลงเป็นค่า Log ₁₀									
US FDA	1	0.477	1.949	2.371	2.650	3.127	3.477	4.303	5.556
BAM	2	0.699	1.857	2.528	2.553	3.112	3.523	4.326	5.643
	3	0.301	1.763	2.435	2.696	3.138	3.491	4.392	5.572
	X _i	0.477	1.857	2.435	2.650	3.127	3.491	4.326	5.572
3M	1	0.602	1.839	2.423	2.591	3.072	3.505	4.490	5.342
	2	0.477	1.903	2.375	2.505	3.179	3.301	4.420	5.591
	3	0.699	1.996	2.470	2.556	3.121	3.602	4.515	5.748
	4	0.477	1.851	2.490	2.531	3.179	3.348	4.384	5.519
	5	0.699	1.954	2.236	2.653	3.149	3.491	4.473	5.672
	Y _i	0.602	1.903	2.423	2.556	3.149	3.491	4.473	5.591
	S _{alt,i}	0.111	0.067	0.101	0.057	0.045	0.123	0.053	0.156
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
	S _{alt}	0.097							
	S _{ref,i}	0.199	0.093	0.079	0.073	0.013	0.023	0.046	0.046
	N	3	3	3	3	3	3	3	3
	S _{ref}	0.090							
	Y _i - X _i	0.125	0.046	-0.011	-0.094	0.022	0.000	0.147	0.019
	S _{alt} ·√(1+1/n)	0.106							
	T(0.1,32)	1.3086							
	T·S _{alt} ·√(1+1/n)	0.138							
	U _i	0.263	0.184	0.127	0.044	0.161	0.138	0.286	0.157
	L _i	-0.014	-0.093	-0.150	-0.232	-0.116	-0.138	0.009	-0.120

ตารางที่ 4 จำนวนยีสต์และราของวิธีอ้างอิง US FDA BAM และวิธี 3M ที่อุณหภูมิ 28°C เวลา 48 ชั่วโมง

วิธีทดสอบ	จำนวนซ้ำ	ตัวอย่าง ที่ 1	ตัวอย่าง ที่ 2	ตัวอย่าง ที่ 3	ตัวอย่าง ที่ 4	ตัวอย่าง ที่ 5	ตัวอย่าง ที่ 6	ตัวอย่าง ที่ 7	ตัวอย่าง ที่ 8
US FDA	1	3	89	235	447	1340	3000	20100	360000
BAM	2	5	72	337	357	1293	3333	21167	440000
	3	2	58	272	497	1373	3100	24667	373330
3M	1	2	50	195	340	1250	3700	28000	45000
	2	6	65	283	280	1210	3600	25600	43000
	3	1	71	239	340	1370	3200	27200	49000
	4	2	51	237	310	1430	2730	22100	34000
	5	3	84	237	320	1530	2600	28700	49000
แปลงเป็นค่า Log ₁₀									
US FDA	1	0.477	1.949	2.371	2.650	3.127	3.477	4.303	5.556
BAM	2	0.699	1.857	2.528	2.553	3.112	3.523	4.326	5.643
	3	0.301	1.763	2.435	2.696	3.138	3.491	4.392	5.572
	X _i	0.477	1.857	2.435	2.650	3.127	3.491	4.326	5.572
3M	1	0.301	1.699	2.290	2.531	3.097	3.568	4.447	5.653
	2	0.778	1.813	2.452	2.447	3.083	3.556	4.408	5.633
	3	0.000	1.851	2.378	2.531	3.137	3.505	4.435	5.690
	4	0.301	1.708	2.375	2.491	3.155	3.436	4.344	5.531
	5	0.477	1.924	2.375	2.505	3.185	3.415	4.458	5.690
	Y _i	0.301	1.813	2.375	2.505	3.137	3.505	4.435	5.653
	S _{alt,i}	0.285	0.096	0.057	0.035	0.042	0.069	0.045	0.065
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
	S _{alt}	0.116							
	S _{ref,i}	0.199	0.093	0.079	0.073	0.013	0.023	0.046	0.046
	N	3	3	3	3	3	3	3	3
	S _{ref}	0.090							
	Y _i - X _i	-0.176	-0.044	-0.060	-0.145	0.010	0.014	0.109	0.081
	S _{alt} ·√(1+1/n)	0.127							
	T(0.1,32)	1.3086							
	T·S _{alt} ·√(1+1/n)	0.166							
	U _i	-0.010	0.122	0.107	0.021	0.176	0.180	0.275	0.247
	L _i	-0.342	-0.211	-0.226	-0.312	-0.157	-0.153	-0.057	-0.085

ตารางที่ 5 จำนวนยีสต์และราของวิธีอ้างอิง US FDA BAM และวิธี 3M ที่อุณหภูมิ 28°C เวลา 72 ชั่วโมง

วิธีทดสอบ	จำนวนซ้ำ	ตัวอย่าง ที่ 1	ตัวอย่าง ที่ 2	ตัวอย่าง ที่ 3	ตัวอย่าง ที่ 4	ตัวอย่าง ที่ 5	ตัวอย่าง ที่ 6	ตัวอย่าง ที่ 7	ตัวอย่าง ที่ 8
US FDA	1	3	89	235	447	1340	3000	20100	360000
BAM	2	5	72	337	357	1293	3333	21167	440000
	3	2	58	272	497	1373	3100	24667	373330
3M	1	2	80	195	350	1250	3800	28100	45000
	2	6	75	283	310	1210	3600	25600	43000
	3	3	79	239	350	1390	3200	27200	49000
	4	2	58	237	340	1430	2740	22100	34000
	5	3	95	237	340	1540	2700	28800	49000
แปลงเป็นค่า Log ₁₀									
US FDA	1	0.477	1.949	2.371	2.650	3.127	3.477	4.303	5.556
BAM	2	0.699	1.857	2.528	2.553	3.112	3.523	4.326	5.643
	3	0.301	1.763	2.435	2.696	3.138	3.491	4.392	5.572
	X _i	0.477	1.857	2.435	2.650	3.127	3.491	4.326	5.572
3M	1	0.301	1.903	2.290	2.544	3.097	3.580	4.449	5.653
	2	0.778	1.875	2.452	2.491	3.083	3.556	4.408	5.633
	3	0.477	1.898	2.378	2.544	3.143	3.505	4.435	5.690
	4	0.301	1.763	2.375	2.531	3.155	3.438	4.344	5.531
	5	0.477	1.978	2.375	2.531	3.188	3.431	4.459	5.690
	Y _i	0.477	1.898	2.375	2.531	3.143	3.505	4.435	5.653
	S _{alt,i}	0.195	0.077	0.057	0.022	0.043	0.067	0.046	0.065
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
	S _{alt}	0.087							
	S _{ref,i}	0.199	0.093	0.079	0.073	0.013	0.023	0.046	0.046
	N	3	3	3	3	3	3	3	3
	S _{ref}	0.090							
	Y _i - X _i	0.000	0.040	-0.060	-0.119	0.016	0.014	0.109	0.081
	S _{alt} ·√(1+1/n)	0.095							
	T(0.1,32)	1.3086							
	T·S _{alt} ·√(1+1/n)	0.125							
	U _i	0.125	0.165	0.065	0.006	0.141	0.138	0.234	0.206
	L _i	-0.125	-0.084	-0.184	-0.244	-0.109	-0.111	-0.016	-0.044

จากกราฟ Accuracy profile (ภาพที่ 2) ถ้าส่วนใดของเส้นขีดจำกัดบนและขีดจำกัดล่างของ β -ETI (Upper and Lower β -ETI limits) ซึ่งครอบคลุมผลทดสอบในขนาด $\beta\%$ ตกอยู่นอกขอบเขตของ λ แสดงว่าผลทดสอบที่ระดับการปนเปื้อนที่ส่วนนั้นจะไม่ถูกยอมรับ หรือไม่สอดคล้องกับผลของวิธีอ้างอิง อีกนัยหนึ่งคือ ผลทดสอบของวิธี 3M จะสอดคล้องหรือเทียบเท่าวิธีอ้างอิง เมื่อเส้นขีดจำกัดบนและล่างของ β -ETI ตกอยู่ในขอบเขตของ λ จึงสรุปผลได้ดังนี้

1. การบ่มที่อุณหภูมิ 25°C นาน 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 2.)

เมื่อ λ เท่ากับ $\pm 0.5 \log_{10}$ ที่ทุกระดับการปนเปื้อนพบว่า ผลทดสอบขีดจำกัดบนและขีดจำกัดล่างของ β -ETI ของวิธี 3M ตกอยู่ในขอบเขตการยอมรับ แต่ถ้า λ เท่ากับ $\pm 0.3 \log_{10}$ พบตัวอย่างที่ 2 (ระดับปริมาณเชื้อ $1.663 \log_{10}$ CFU/มิลลิลิตร) และตัวอย่างที่ 4 (ระดับปริมาณเชื้อ $2.491 \log_{10}$ CFU/มิลลิลิตร) มีผลทดสอบตกอยู่นอกขอบเขตการยอมรับ

2. การบ่มที่อุณหภูมิ 25°C นาน 72 ชั่วโมง (ภาพที่ 2.2)

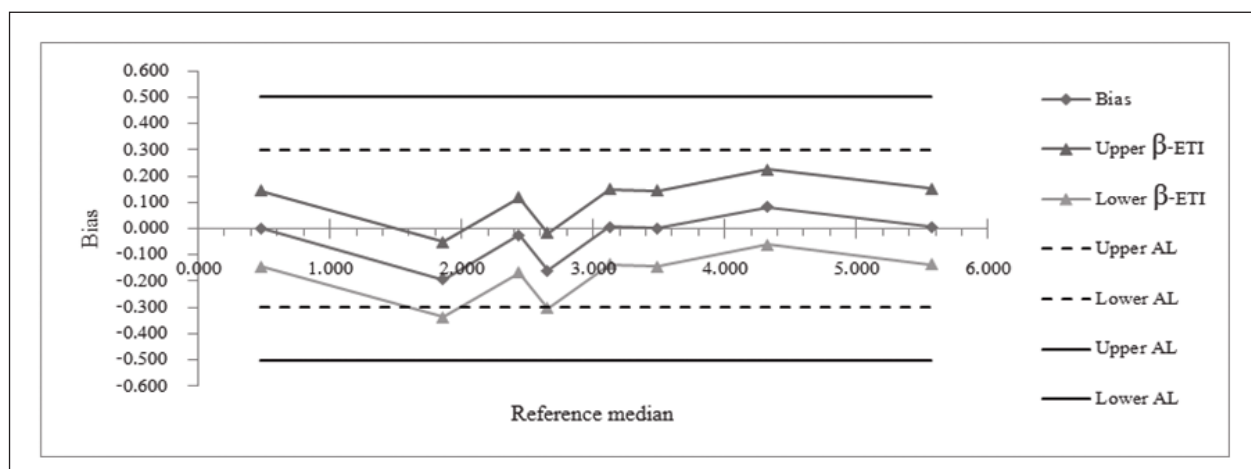
ผลทดสอบของวิธี 3M อยู่ในขอบเขตการยอมรับที่ทุกระดับการปนเปื้อน เมื่อ λ เท่ากับ ± 0.5 และ $\pm 0.3 \log_{10}$

3. การบ่มที่อุณหภูมิ 28°C นาน 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 2.3)

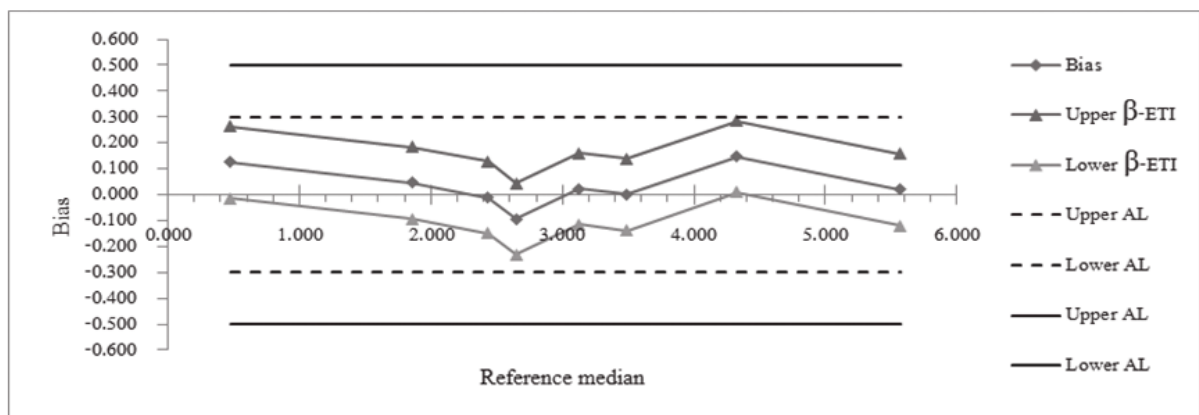
เมื่อ λ เท่ากับ $\pm 0.5 \log_{10}$ ที่ทุกระดับการปนเปื้อนพบว่า ผลทดสอบขีดจำกัดบนและขีดจำกัดล่างของ β -ETI ของวิธี 3M ตกอยู่ในขอบเขตการยอมรับ แต่ถ้า λ เท่ากับ $\pm 0.3 \log_{10}$ พบตัวอย่างที่ 1 (ระดับปริมาณเชื้อ $0.301 \log_{10}$ CFU/มิลลิลิตร) และตัวอย่างที่ 4 (ระดับปริมาณเชื้อ $2.505 \log_{10}$ CFU/มิลลิลิตร) มีผลทดสอบอยู่นอกขอบเขตการยอมรับ

4. การบ่มที่อุณหภูมิ 28°C นาน 72 ชั่วโมง (ภาพที่ 2.4)

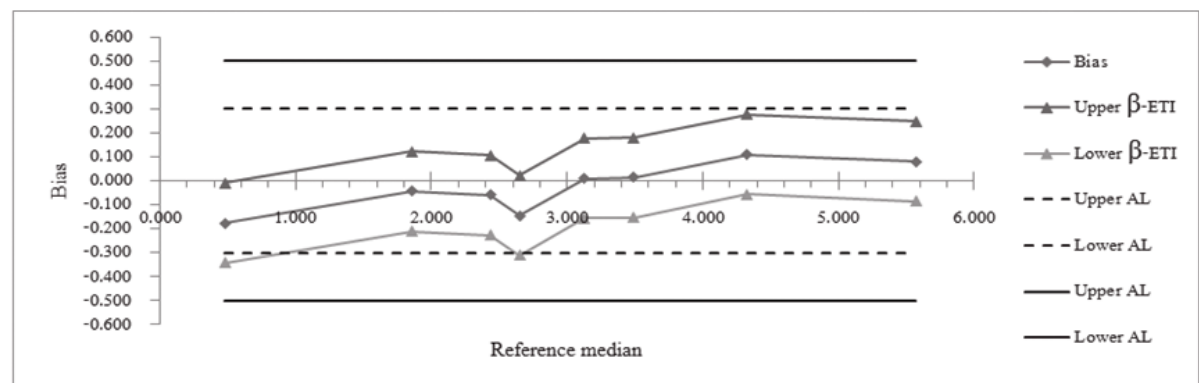
ผลทดสอบของวิธี 3M อยู่ในขอบเขตการยอมรับที่ทุกระดับการปนเปื้อน เมื่อ λ เท่ากับ ± 0.5 และ $\pm 0.3 \log_{10}$



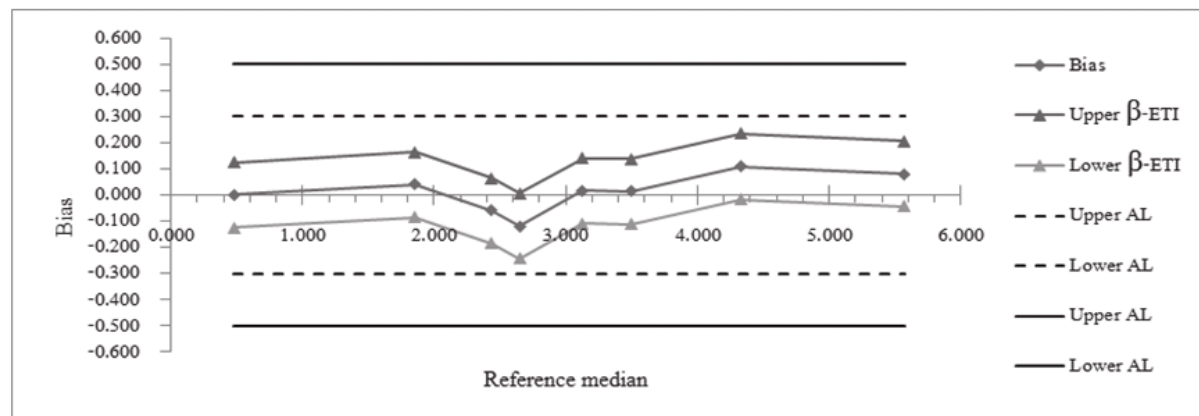
ภาพที่ 2.1 ที่อุณหภูมิ 25°C เวลา 48 ชั่วโมง



ภาพที่ 2.2 ที่อุณหภูมิ 25°C เวลา 72 ชั่วโมง



ภาพที่ 2.3 ที่อุณหภูมิ 28°C เวลา 48 ชั่วโมง



ภาพที่ 2.4 ที่อุณหภูมิ 28°C เวลา 72 ชั่วโมง

ภาพที่ 2 แสดง Accuracy profile ของแผ่นทดสอบ 3M RYM ที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ

วิจารณ์

โดยทั่วไปในงานทดสอบเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ซ้ำตัวอย่างเดียวกันแบบเชิงปริมาณทางจุลชีววิทยา ถ้าค่าความแตกต่างของผลซ้ำต่างกันไม่เกิน $\pm 0.5 \log_{10} \text{CFU}$ ถือว่ายอมรับได้⁽¹³⁾ จากตารางที่ 1 ผลทดสอบจำนวนโคโลนียีสต์และราในเครื่องตีชนิดเหลวระหว่างวิธี 3M กับวิธีอ้างอิง US FDA BAM ที่อุณหภูมิ 25°C และ 28°C เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง มีความแตกต่างกันไม่เกิน $\pm 0.5 \log_{10} \text{CFU/มิลลิลิตร}$ จึงถือว่ายอมรับได้หากผู้นำวิธี 3M ไปใช้ยอมรับเกณฑ์ตัดสินนี้ ตามคู่มือการใช้งานของแผ่นทดสอบ 3M RYM⁽¹¹⁾ ระบุให้บ่มเพาะอย่างน้อย 48 ± 2 ชั่วโมง แต่ถ้าเห็นโคโลนีไม่ชัดเจนให้บ่มเพิ่ม 12 ชั่วโมง เป็น 60 ชั่วโมง และถ้าไม่สะดวกในการอ่านผลในห้องปฏิบัติการสามารถขยายเวลาบ่มเป็น 72 ชั่วโมงได้ งานวิจัยนี้จึงบ่มนาน 72 ชั่วโมง จากผลทดสอบพบว่าเมื่อบ่มแผ่นทดสอบ 3M RYM ที่อุณหภูมิ 25°C และ 28°C นาน 72 ชั่วโมง พบมีจำนวนโคโลนียีสต์และราเพิ่มขึ้นจากการบ่ม 48 ชั่วโมง ($0.00 - 0.24 \log_{10} \text{CFU/มิลลิลิตร}$) จากการทดสอบทางสถิติพบว่าการบ่มแผ่นทดสอบ 3M RYM นาน 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25°C มีจำนวนโคโลนีมากกว่าการบ่มนาน 48 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) อาจเป็นเพราะโคโลนียีสต์และราที่เจริญช้ายังไม่สามารถสังเกตเห็นได้เมื่อครบ 48 ชั่วโมง แต่สามารถตรวจพบได้ที่เวลา 72 ชั่วโมง ส่วนที่อุณหภูมิ 28°C การบ่มนาน 72 ชั่วโมงมีจำนวนโคโลนีมากกว่าการบ่มนาน 48 ชั่วโมงอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) จึงอาจสรุปได้ว่าการบ่มที่อุณหภูมิ 28°C นาน 48 ชั่วโมง สามารถอ่านผลได้โดยไม่ต้องบ่มนานขึ้นถึง 72 ชั่วโมง สอดคล้องกับการศึกษาของ Hans และคณะ⁽¹⁴⁾ ที่เติมเชื้อยีสต์และราในตัวอย่างแป้งและมอลซาลาชีส แล้วพบว่าต้องบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25°C นาน 60 ชั่วโมง จึงจะเห็นการเจริญของยีสต์และราชัดเจน ในขณะทำงานวิจัยของ Bird และคณะ⁽¹⁵⁾ พบว่าการใช้แผ่นทดสอบ 3M RYM ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อมดแช่แข็งบ่มที่อุณหภูมิ 25°C และ 28°C นาน 48 ชั่วโมง เมื่อบ่มต่ออีกจนครบ 60 ชั่วโมง จำนวนยีสต์และราไม่เพิ่มขึ้น และได้สรุปว่าจากการทดสอบทางสถิติด้วย Paired t-test ผลทดสอบจำนวนยีสต์และราด้วยแผ่นทดสอบ 3M RYM กับวิธีอ้างอิง US FDA BAM แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

การทดสอบความเป็นเส้นตรงทำเพื่อหาความสัมพันธ์ของค่าที่ได้จากวิธีอ้างอิงกับวิธีทางเลือก เพราะมีผลกระทบต่อความแม่นยำ (Accuracy) โดยตรง⁽⁹⁾ จากภาพที่ 1 แสดงให้เห็นว่าข้อมูลผลทดสอบของวิธี 3M กับวิธีอ้างอิงที่บ่มทั้งสองอุณหภูมิมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงมากและไปในทิศทางเดียวกัน เพราะค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (r) ใกล้เคียง 1 มาก ($0.9986 - 0.9995$) สอดคล้องกับข้อมูลการตรวจสอบความถูกต้องของ ADRIA Developpement, 2014⁽⁷⁾ ที่เปรียบเทียบวิธี 3M กับวิธีมาตรฐาน ISO 21527 ในการตรวจนับยีสต์และราในอาหารน้ำผลไม้ และน้ำผ่านกระบวนการบำบัด นอกจากนี้ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (Slope) เท่ากับ 1 ($0.995 - 1.056$) แสดงว่าวิธี 3M ให้ผลการทดสอบที่เทียบเท่าวิธีอ้างอิง

ในงานวิจัยนี้กำหนด β เท่ากับ 80% ตามข้อกำหนดของ ISO 16140-2:2016 โดยปกติขอบเขตการยอมรับเป็นความแตกต่างสูงสุดที่ยอมรับได้ของผลการทดสอบระหว่างวิธีทางเลือกกับวิธีอ้างอิงซึ่งการกำหนดขอบเขตการยอมรับขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของวิธีอ้างอิง ระดับการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในอาหาร ประเภทจุลินทรีย์ หรือตามความต้องการของผู้ใช้งาน⁽¹⁰⁾ ใน ISO 16140-2:2016 กำหนดขอบเขตการยอมรับ (Acceptability limit, AL) ของวิธีทางเลือก เท่ากับ $\pm 0.5 \log_{10}$ การยอมรับผลทดสอบของวิธี 3M ดูจากขีดจำกัดบนและขีดจำกัดล่าง (Upper and lower limits) ของช่วงค่า $\beta - \text{ETI}$ ที่ไม่ออกนอกขอบเขตการยอมรับในแต่ละระดับการปนเปื้อน ดังนั้นในภาพที่ 2 ถ้ากำหนด AL (λ) เท่ากับ $\pm 0.5 \log_{10}$ จึงสามารถกล่าวได้ว่า วิธี 3M ให้ผลเทียบเท่าวิธีอ้างอิงสำหรับการทดสอบตัวอย่างเครื่องตีชนิดเหลวที่ระดับการปนเปื้อนที่ทดสอบตั้งแต่ $0.477 \log_{10} \text{CFU/มิลลิลิตร}$ ถึง $5.572 \log_{10} \text{CFU/มิลลิลิตร}$ (3 CFU/มิลลิลิตร ถึง $373,330 \text{ CFU/มิลลิลิตร}$) ถ้าช่วงค่า $\beta - \text{ETI}$ อยู่ในขอบเขตการยอมรับ (λ) ที่แคบลง เช่น $\lambda = \pm 0.3$ หรือ $\pm 0.4 \log_{10}$ จะแสดงว่าผลทดสอบของวิธีทางเลือกกับวิธีอ้างอิงมีความสอดคล้องหรือ

ใกล้เคียงกันมากยิ่งขึ้น นั่นคือวิธีทางเลือกมีความแม่นยำมากขึ้น ซึ่งเป็นประโยชน์กับผู้ใช้ในการตัดสินใจที่จะนำวิธีทางเลือกไปใช้โดยสามารถเลือกระดับความแม่นยำของวิธีได้ด้วยการกำหนดช่วงการยอมรับ อีกประการหนึ่งถ้ามีบางระดับการปนเปื้อนในช่วงค่า β -ETI อยู่นอกขอบเขตการยอมรับ ผู้ใช้ก็ยังสามารถเลือกใช้วิธีทางเลือกเฉพาะที่ช่วงค่า β -ETI อยู่ในขอบเขตการยอมรับได้ เช่น ในงานวิจัยนี้ เมื่อกำหนด λ เท่ากับ $\pm 0.3 \log_{10}$ ที่อุณหภูมิ 25°C และ 28°C นาน 72 ชั่วโมง วิธี 3M จะให้ผลเทียบเท่าวิธีอ้างอิง (ภาพที่ 2.2 และ 2.4) แต่ที่อุณหภูมิ 28°C นาน 48 ชั่วโมง วิธี 3M ให้ผลเทียบเท่าวิธีอ้างอิงยกเว้นที่ระดับการปนเปื้อนของตัวอย่างที่ 1 และ 4 (ภาพที่ 2.3) ในขณะที่อุณหภูมิ 25°C นาน 48 ชั่วโมง วิธี 3M ให้ผลเทียบเท่าวิธีอ้างอิงยกเว้นที่ระดับการปนเปื้อนของตัวอย่างที่ 2 และ 4 (ภาพที่ 2.1) นอกจากความแม่นยำแล้วผู้ใช้อาจยังสามารถดูความเที่ยง (Precision) ของวิธีทางเลือกจากกราฟ Accuracy profile ด้วยการพิจารณาช่วงค่า β -ETI ที่คำนวณจาก $B_i \pm T.S_{alt} \sqrt{1 + \frac{1}{n}}$ ซึ่งมีการนำค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของวิธีทางเลือกจากการทดลองตัวอย่างซ้ำหลายครั้งมาใช้ โดยถ้าวิธีทางเลือกมีความเที่ยงน้อยช่วงค่า β -ETI จะกว้าง การแปลผลจากกราฟ Accuracy profile เช่นนี้ ทำให้ผู้ใช้วิธีสามารถตัดสินใจเลือกใช้วิธีทางเลือกได้ตามขอบเขตการยอมรับที่กำหนดและเหมาะสมกับวัตถุประสงค์ที่จะนำไปใช้กับตัวอย่าง

การทดสอบความเป็นเส้นตรงกับการใช้ Accuracy profile ให้ผลสอดคล้องกัน คือ วิธี 3M ให้ผลเทียบเท่าวิธีอ้างอิง ยกเว้นเมื่อกำหนด λ เท่ากับ $\pm 0.3 \log_{10}$ ที่อุณหภูมิ 25°C และ 28°C นาน 48 ชั่วโมง วิธี 3M ให้ผลไม่เทียบเท่าวิธีอ้างอิงที่บางระดับการปนเปื้อนยีสต์และรา ซึ่งไม่สอดคล้องกับการทดสอบความเป็นเส้นตรงที่วิธี 3M ให้ผลเทียบเท่าวิธีอ้างอิง เนื่องจาก Accuracy profile มีการคำนวณช่วงที่คาดว่าจะผลทดสอบจำนวน $\beta\%$ ในอนาคตที่ได้จากวิธี 3M จะตกอยู่ในช่วงค่านี้ ซึ่งเป็นข้อดีของการใช้ Accuracy profile

สรุป

จากการตรวจสอบความถูกต้องของแผ่นทดสอบ 3M RYM ที่อุณหภูมิ 25°C และ 28°C นาน 48 และ 72 ชั่วโมง กับวิธีอ้างอิง US FDA BAM สำหรับการตรวจหาปริมาณยีสต์และราในเครื่องดื่มเหลว โดยใช้การสร้างกราฟ Accuracy profile พบว่าวิธี 3M ให้ผลเทียบเท่าวิธีอ้างอิงที่ทุกระดับการปนเปื้อน เมื่อกำหนดขอบเขตการยอมรับเท่ากับ $\pm 0.5 \log_{10}$ ตาม ISO 16140-2:2016 แต่เมื่อกำหนดขอบเขตการยอมรับแคบลงเท่ากับ $\pm 0.3 \log_{10}$ วิธี 3M ที่อุณหภูมิ 25°C และ 28°C เวลา 72 ชั่วโมง เท่านั้นที่ให้ผลเทียบเท่าวิธีอ้างอิงที่ทุกระดับการปนเปื้อน ดังนั้นแผ่นทดสอบ 3M RYM สามารถนำมาใช้นับจำนวนยีสต์และราโดยให้ผลเทียบเท่าวิธีอ้างอิง US FDA BAM ทั้งนี้ช่วงความใช้ได้ของแผ่นทดสอบ 3M RYM ขึ้นกับการกำหนด $\beta\%$ และขอบเขตการยอมรับของผู้ใช้งาน สำหรับระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการนำวิธีไปใช้สามารถพิจารณาจากกราฟ Accuracy profile ที่ผู้ใช้พิจารณาความเที่ยงและความแม่นยำได้ การศึกษานี้ช่วยให้ผู้พัฒนาวิธีวิเคราะห์หรือนำวิธีทางเลือกมาใช้ด้านอาหาร สามารถนำขั้นตอนที่ผู้วิจัยดำเนินการไปใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี รวมทั้งวิธีการแปลผลและการตั้งเกณฑ์การยอมรับตามวัตถุประสงค์ของงานได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณบุคลากรในฝ่ายน้ำและเครื่องดื่มกลุ่มจุลชีววิทยาทุกท่านที่ให้ความร่วมมือองงานวิจัยสำเร็จด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. International Organization for Standardization. ISO 21527: Microbiology of food and animal feeding stuffs -- horizontal method for the enumeration of yeasts and molds. Geneva: International Organization for Standardization (ISO); 2008.
2. Tournas V, Stack ME, Mislivec PB, Kock HA, Bandler R. Bacteriological analytical manual Chapter 18 yeasts, molds and mycotoxin [Online]. U.S. Food and Drug Administration; 2001 [cited 2014 May 10]. Available from: <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071435.htm>.
3. Rapidmicrobiology. Rapid detection of yeasts and moulds in food [online]. County Cork: Rapid Test Methods; 2001. [cited 2015 Sep 21]; [6 screens]. Available from: URL: <http://www.rapidmicrobiology.com/test-method/rapid-detection-of-yeasts-and-moulds-in-food>.
4. AOAC® official method 2014.05 enumeration of yeast and mold in food 3M™ petrifilm™ rapid yeast and mold count plate first action 2014 [online]. 3M; 2015 [cited 2015 Sep 21]. Available from: URL: <http://www.trafalgarscientific.co.uk/index.php?route=product/download/download&did=50>
5. Knight MT, Newman MC, Benzinger MJ Jr, Neufang KL, Agin JR, McAllister JS, et al. Comparison of the petrifilm dry rehydratable film and conventional culture methods for enumeration of yeasts and molds in foods: collaborative study. J AOAC Int 1997; 80(4): 806-23.
6. Boyle M, Benzinger MJ Jr, Bedinghaus P, Crowley E, Bird P, Agin J, et al. Method comparison of the 3MTM petrifilmTM rapid yeast and mold count plate method for the enumeration of yeast and mold [online]. Cincinnati, OH: Q Laboratories, Inc.; 2014. [cited 2015 Sep 21]. Available from: URL: <http://multimedia.3m.com/mws/media/934836O/3m-petrifilm-rapid-yeast-mold-case-study.pdf>
7. ADRIA Developpement. EN ISO 16140 validation of 3M™ rapid yeast and mold petrifilm™ plate for yeasts and molds enumeration in food, environmental sample, pet food and animal feed [online]. 2014 [cited 2015 Sep 21]. Available from: URL: http://nf-validation.afnor.org/wp-content/uploads/2014/10/Synt-3M-01-13-07-14_en.pdf
8. International Organization for Standardization. ISO 16140-2: Microbiology of the food chain-Method validation -- Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method. Geneva: International Organization for Standardization (ISO); 2016.
9. Feinberg M. Validation of analytical methods based on accuracy profiles. J Chromatogr A 2007; 1158(1-2): 174-83.
10. Feinberg M, Sohler D, David JF. Validation of an alternative method for counting Enterobacteriaceae in foods based on accuracy profile. J AOAC Int 2009; 92(2): 527-37.
11. 3M Science Applied to Life. Product instructions 3M™ petrifilm™ rapid yeast and mold count plate. USA: 3M; 2014.
12. StatsToDo. Tables of critical values of t for probabilities. [online]. 2016 [cited 2016 Sep 5]; [1 screen]. Available from: URL: http://www.stststodo.com/TTest_Tab.php
13. International Organization for Standardization. ISO/TS 22117: Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Specific requirements and guidance for proficiency testing by interlaboratory comparison. Geneva: International Organization for Standardization (ISO); 2010.

14. Froder H, Tsuhako V, Goularte L. Performance evaluation of 3M™ petrifilm™ rym to fast enumeration of yeasts and molds. [online]. 2014 [cited 2016 Sep 5]; [2 screens]. Available from: URL: <http://pdf.blucher.com.br.s3-sa-east-1.amazonaws.com/foodscienceproceedings/microal/261.pdf>.
 15. Bird P, Flannery J, Crowley E, Agin J, Goins D, Jechorek R. Evaluation of the 3M™ petrifilm™ rapid yeast and mold count plate for the enumeration of yeast and mold in food: collaborative study, first action 2014.05. J AOAC Int 2015; 98(3): 767-83.
-

Use of Accuracy Profile for Validation of Petrifilm™ Rapid Yeast and Mold Count Plate for Enumeration of Yeast and Mold in Beverage

Karuna Teerasamit Ladapan Saengklai and Nalinee Yoophet

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

ABSTRACT Validation of quantitative method in microbiology according to ISO 16140 – 2:2016 specifies use of accuracy profile to compare the result of reference and alternative methods. The accuracy profile was used to validate the Petrifilm™ Rapid Yeast and Mold Count Plate (3M RYM) by comparing yeast and mold counts in liquid beverages with the US FDA BAM procedure recognized as reference method. The test samples were naturally and artificially contaminated at low level (1 – 100 CFU/ml), medium level (100 – 1,000 CFU/ml), and high level (>1,000 CFU/ml). When incubated at 25°C and 28°C for 48 h and 72 h, the results of the two methods showed relationship as linear and the Petrifilm 3M RYM gave Pearson's correlation coefficient scores close to 1, i.e. 0.9986, 0.9988, 0.9995 and 0.9992, respectively. The accuracy profile for validation of Petrifilm 3M RYM was accomplished by setting the β -expectation tolerance intervals (β -ETI) at 80% ($\beta\%$) and the acceptability limits, AL (λ) at ± 0.3 and $\pm 0.5 \log_{10}$ CFU/ml. For a λ of $\pm 0.5 \log_{10}$, the 3M method incubated at 25°C and 28°C for 48 h and 72 h, the β -ETI limits were within the acceptability limits at all contamination levels. When λ was $\pm 0.3 \log_{10}$, only at 25°C and 28°C, 72 h that the β -ETI limits fell inside the acceptability limits at all contamination levels. It can be concluded that the validity of Petrifilm 3M RYM depends on defined $\beta\%$ and acceptability limits (λ) specified by the users. Use of accuracy profile assists the users to choose an analytical method appropriately.

Keywords: Accuracy profile, Validation, Petrifilm 3M RYM, Beverage

ตารางที่ 2 จำนวนยีสต์และราของวิธีอ้างอิง US FDA BAM และวิธี 3M ที่อุณหภูมิ 25°C เวลา 48 ชั่วโมง

วิธีทดสอบ	จำนวนซ้ำ	ตัวอย่าง ที่ 1	ตัวอย่าง ที่ 2	ตัวอย่าง ที่ 3	ตัวอย่าง ที่ 4	ตัวอย่าง ที่ 5	ตัวอย่าง ที่ 6	ตัวอย่าง ที่ 7	ตัวอย่าง ที่ 8
US FDA	1	3	89	235	447	1340	3000	20100	360000
BAM	2	5	72	337	357	1293	3333	21167	440000
	3	2	58	272	497	1373	3100	24667	373330
3M	1	4	44	257	350	1180	3200	30900	210000
	2	3	46	234	250	1510	2000	25100	380000
	3	5	65	295	290	1300	3900	29000	550000
	4	3	45	306	310	1510	2150	22000	300000
	5	3	57	163	360	1360	3100	25500	470000
แปลงเป็นค่า Log ₁₀									
US FDA	1	0.477	1.949	2.371	2.650	3.127	3.477	4.303	5.556
BAM	2	0.699	1.857	2.528	2.553	3.112	3.523	4.326	5.643
	3	0.301	1.763	2.435	2.696	3.138	3.491	4.392	5.572
	X _i	0.477	1.857	2.435	2.650	3.127	3.491	4.326	5.572
3M	1	0.602	1.643	2.410	2.544	3.072	3.505	4.490	5.322
	2	0.477	1.663	2.369	2.398	3.179	3.301	4.400	5.580
	3	0.699	1.813	2.470	2.462	3.114	3.591	4.462	5.740
	4	0.477	1.653	2.486	2.491	3.179	3.332	4.342	5.477
	5	0.477	1.756	2.212	2.556	3.134	3.491	4.407	5.672
	Y _i	0.477	1.663	2.410	2.491	3.134	3.491	4.407	5.580
	S _{alt,i}	0.101	0.075	0.110	0.064	0.046	0.123	0.058	0.165
	n	5	5	5	5	5	5	5	5
	S _{alt}	0.100							
	S _{ref,i}	0.199	0.093	0.079	0.073	0.013	0.023	0.046	0.046
	n	3	3	3	3	3	3	3	3
	S _{ref}	0.090							
	Y _i -X _i	0.000	-0.195	-0.025	-0.159	0.006	0.000	0.081	0.008
	S _{alt} ·√1 + 1/n	0.109							
	T(0.1,32) ⁽¹⁵⁾	1.3086							
	T·S _{alt} ·√1 + 1/n	0.143							
	U _i	0.143	-0.051	0.118	-0.016	0.150	0.143	0.224	0.151
	L _i	-0.143	-0.338	-0.168	-0.302	-0.137	-0.143	-0.062	-0.135



ตารางที่ 3 จำนวนยีสต์และราของวิธีอ้างอิง US FDA BAM และวิธี 3M ที่อุณหภูมิ 25°C เวลา 72 ชั่วโมง

วิธีทดสอบ	จำนวนซ้ำ	ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่ 2	ตัวอย่างที่ 3	ตัวอย่างที่ 4	ตัวอย่างที่ 5	ตัวอย่างที่ 6	ตัวอย่างที่ 7	ตัวอย่างที่ 8
US FDA	1	3	89	235	447	1340	3000	20100	360000
BAM	2	5	72	337	357	1293	3333	21167	440000
	3	2	58	272	497	1373	3100	24667	373330
3M	1	4	69	265	390	1180	3200	30900	220000
	2	3	80	237	320	1510	2000	26300	390000
	3	5	99	295	360	1320	4000	32700	560000
	4	3	71	309	340	1510	2230	24200	330000
	5	5	90	172	450	1410	3100	29700	470000
แปลงเป็นค่า $\log_{10}$									
US FDA	1	0.477	1.949	2.371	2.650	3.127	3.477	4.303	5.556
BAM	2	0.699	1.857	2.528	2.553	3.112	3.523	4.326	5.643
	3	0.301	1.763	2.435	2.696	3.138	3.491	4.392	5.572
	X_i	0.477	1.857	2.435	2.650	3.127	3.491	4.326	5.572
3M	1	0.602	1.839	2.423	2.591	3.072	3.505	4.490	5.342
	2	0.477	1.903	2.375	2.505	3.179	3.301	4.420	5.591
	3	0.699	1.996	2.470	2.556	3.121	3.602	4.515	5.748
	4	0.477	1.851	2.490	2.531	3.179	3.348	4.384	5.519
	5	0.699	1.954	2.236	2.653	3.149	3.491	4.473	5.672
	Y_i	0.602	1.903	2.423	2.556	3.149	3.491	4.473	5.591
	$S_{alt,i}$	0.111	0.067	0.101	0.057	0.045	0.123	0.053	0.156
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
	S_{alt}	0.097							
	$S_{ref,i}$	0.199	0.093	0.079	0.073	0.013	0.023	0.046	0.046
	N	3	3	3	3	3	3	3	3
	S_{ref}	0.090							
	$Y_i - X_i$	0.125	0.046	-0.011	-0.094	0.022	0.000	0.147	0.019
	$S_{alt} \cdot \sqrt{1 + 1/n}$	0.106							
	T(0.1,32)	1.3086							
	$T \cdot S_{alt} \cdot \sqrt{1 + 1/n}$	0.138							
	U_i	0.263	0.184	0.127	0.044	0.161	0.138	0.286	0.157
	L_i	-0.014	-0.093	-0.150	-0.232	-0.116	-0.138	0.009	-0.120

ตารางที่ 4 จำนวนยีสต์และราของวิธีอ้างอิง US FDA BAM และวิธี 3M ที่อุณหภูมิ 28°C เวลา 48 ชั่วโมง

วิธีทดสอบ	จำนวนซ้ำ	ตัวอย่าง ที่ 1	ตัวอย่าง ที่ 2	ตัวอย่าง ที่ 3	ตัวอย่าง ที่ 4	ตัวอย่าง ที่ 5	ตัวอย่าง ที่ 6	ตัวอย่าง ที่ 7	ตัวอย่าง ที่ 8
US FDA	1	3	89	235	447	1340	3000	20100	360000
BAM	2	5	72	337	357	1293	3333	21167	440000
	3	2	58	272	497	1373	3100	24667	373330
3M	1	2	50	195	340	1250	3700	28000	450000
	2	6	65	283	280	1210	3600	25600	430000
	3	1	71	239	340	1370	3200	27200	490000
	4	2	51	237	310	1430	2730	22100	340000
	5	3	84	237	320	1530	2600	28700	490000
แปลงเป็นค่า $\log_{10}$									
US FDA	1	0.477	1.949	2.371	2.650	3.127	3.477	4.303	5.556
BAM	2	0.699	1.857	2.528	2.553	3.112	3.523	4.326	5.643
	3	0.301	1.763	2.435	2.696	3.138	3.491	4.392	5.572
	X_i	0.477	1.857	2.435	2.650	3.127	3.491	4.326	5.572
3M	1	0.301	1.699	2.290	2.531	3.097	3.568	4.447	5.653
	2	0.778	1.813	2.452	2.447	3.083	3.556	4.408	5.633
	3	0.000	1.851	2.378	2.531	3.137	3.505	4.435	5.690
	4	0.301	1.708	2.375	2.491	3.155	3.436	4.344	5.531
	5	0.477	1.924	2.375	2.505	3.185	3.415	4.458	5.690
	Y_i	0.301	1.813	2.375	2.505	3.137	3.505	4.435	5.653
	$S_{alt,i}$	0.285	0.096	0.057	0.035	0.042	0.069	0.045	0.065
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
	S_{alt}	0.116							
	$S_{ref,i}$	0.199	0.093	0.079	0.073	0.013	0.023	0.046	0.046
	N	3	3	3	3	3	3	3	3
	S_{ref}	0.090							
	$Y_i - X_i$	-0.176	-0.044	-0.060	-0.145	0.010	0.014	0.109	0.081
	$S_{alt} \sqrt{1 + 1/n}$	0.127							
	T(0.1,32)	1.3086							
	$T.S_{alt} \sqrt{1 + 1/n}$	0.166							
	U_i	-0.010	0.122	0.107	0.021	0.176	0.180	0.275	0.247
	L_i	-0.342	-0.211	-0.226	-0.312	-0.157	-0.153	-0.057	-0.085



ตารางที่ 5 จำนวนยีสต์และราของวิธีอ้างอิง US FDA BAM และวิธี 3M ที่อุณหภูมิ 28°C เวลา 72 ชั่วโมง

วิธีทดสอบ	จำนวนซ้ำ	ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่ 2	ตัวอย่างที่ 3	ตัวอย่างที่ 4	ตัวอย่างที่ 5	ตัวอย่างที่ 6	ตัวอย่างที่ 7	ตัวอย่างที่ 8
US FDA	1	3	89	235	447	1340	3000	20100	360000
BAM	2	5	72	337	357	1293	3333	21167	440000
	3	2	58	272	497	1373	3100	24667	373330
3M	1	2	80	195	350	1250	3800	28100	450000
	2	6	75	283	310	1210	3600	25600	430000
	3	3	79	239	350	1390	3200	27200	490000
	4	2	58	237	340	1430	2740	22100	340000
	5	3	95	237	340	1540	2700	28800	490000
แปลงเป็นค่า $\log_{10}$									
US FDA	1	0.477	1.949	2.371	2.650	3.127	3.477	4.303	5.556
BAM	2	0.699	1.857	2.528	2.553	3.112	3.523	4.326	5.643
	3	0.301	1.763	2.435	2.696	3.138	3.491	4.392	5.572
	X_i	0.477	1.857	2.435	2.650	3.127	3.491	4.326	5.572
3M	1	0.301	1.903	2.290	2.544	3.097	3.580	4.449	5.653
	2	0.778	1.875	2.452	2.491	3.083	3.556	4.408	5.633
	3	0.477	1.898	2.378	2.544	3.143	3.505	4.435	5.690
	4	0.301	1.763	2.375	2.531	3.155	3.438	4.344	5.531
	5	0.477	1.978	2.375	2.531	3.188	3.431	4.459	5.690
	Y_i	0.477	1.898	2.375	2.531	3.143	3.505	4.435	5.653
	$S_{alt,i}$	0.195	0.077	0.057	0.022	0.043	0.067	0.046	0.065
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
	S_{alt}	0.087							
	$S_{ref,i}$	0.199	0.093	0.079	0.073	0.013	0.023	0.046	0.046
	N	3	3	3	3	3	3	3	3
	S_{ref}	0.090							
	$Y_i - X_i$	0.000	0.040	-0.060	-0.119	0.016	0.014	0.109	0.081
	$S_{alt} \cdot \sqrt{1 + 1/n}$	0.095							
	T(0.1,32)	1.3086							
	$T \cdot S_{alt} \cdot \sqrt{1 + 1/n}$	0.125							
	U_i	0.125	0.165	0.065	0.006	0.141	0.138	0.234	0.206
	L_i	-0.125	-0.084	-0.184	-0.244	-0.109	-0.111	-0.016	-0.044

การศึกษา Charge Variants ในยาชีววัตถุ เพื่อการรักษาชนิดโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วย Capillary Isoelectric Focusing

วิชชุดา จริยะพันธุ์, ฐิตาภรณ์ ภูติภินโยวัฒน์ และสายวรุฬ จตุรภิตตินันท์
สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ โมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในยาสำเร็จรูปอาจมีหลายแบบเนื่องจากประจุที่แตกต่างกัน (charge heterogeneity) หากมีการเปลี่ยนแปลงอาจส่งผลกระทบต่อความคงสภาพของยา การออกฤทธิ์ และ/หรือกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ก่อให้เกิดอันตราย ดังนั้นคุณภาพของยาแต่ละรุ่นต้องมี charge variants ที่สม่ำเสมอ จึงได้ทำการศึกษาชนิดของ charge variants ของยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดสำเร็จรูป 14 ชื่อการค้าที่ขึ้นทะเบียนในประเทศไทยด้วยเทคนิค Capillary Isoelectric Focusing ผลการศึกษาจากอิเล็กโตรโฟโกราฟีพบว่ายาโมโนโคลนอลแอนติบอดีทุกชนิดมี isoforms ทั้ง 3 แบบและตรงตาม isoforms ของสารมาตรฐาน ค่า pI ของ isoforms อยู่ในช่วง 6 - 10 โดย pI ของพีคชนิด basic และ acidic พีค อยู่ในช่วง 9.48 - 6.70 และ 9.24 - 6.40 ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่ายาอาจยังมีความคงตัวดีกว่ายาล้างคัสลิงจากการเปรียบเทียบ isoforms เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 37°C นาน 5 วัน สรุปได้ว่าตัวอย่างยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ส่งตรวจประกอบการขึ้นทะเบียนมี charge variants ตรงตามสารมาตรฐานที่ชัดเจน อย่างไรก็ตามภาครัฐควรพิจารณาแนวทางการติดตามการเฝ้าระวังด้านคุณภาพของยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีรุ่นอื่นๆ รวมทั้งความคงสภาพของยาชีววัตถุคล้ายคลึง

บทนำ

โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody: mAb) ที่ผลิตเป็นยารักษาโรคด้วยเทคโนโลยีชีวภาพเป็นยา Biotherapeutic products (BTP) ในการผลิตมีโอกาสได้โมเลกุลของยาที่แตกต่างกัน ความแตกต่างหนึ่งที่จะพบได้คือโมเลกุล mAb ในยาสำเร็จรูปอาจมีประจุที่แตกต่างกัน (charge variants)⁽¹⁾ ซึ่งเป็นผลจากการทำงานของเอนไซม์หรือปฏิกิริยาอื่น (enzymatic และ nonenzymatic modifications) หลายปฏิกิริยา เช่น glycosylation, glycation, deamidation, oxidation, disulfide bond formation หรือการปรับแต่งชนิดของกรดอะมิโนที่ปลายสายโปรตีน (C-/N-terminal amino acids modification) และ peptide bond cleavage เป็นต้น ซึ่งเป็นความแตกต่างเล็กน้อย (microheterogeneity) โดยอาจเกิดระหว่างขบวนการผลิตในเซลล์หรือเกิดในขบวนการที่อยู่นอกเซลล์ขึ้นอยู่กับชนิดของปฏิกิริยาเหล่านั้น รวมถึงเกิดระหว่างการทำบริสุทธิ์และขณะเก็บรักษาที่ทำให้เกิดการปรับแต่งโมเลกุลโปรตีน⁽²⁾

variants บางชนิดอาจไม่ก่อให้เกิดผลด้านความปลอดภัย บางชนิดอาจกระทบต่อประสิทธิภาพของยาเมื่อนำไปใช้มากหรือน้อยแล้วแต่ชนิดของโปรตีนนั้น อย่างไรก็ตาม charge variants ของยา mAb มีความสำคัญในแง่ที่มีผลต่อความคงตัวและการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ การเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของชนิดประจุบนโมเลกุลเพียงเล็กน้อยสะท้อนถึงโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงและอาจส่งผลกระทบต่อความคงตัวของยาหรือกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่เป็นอันตราย^(3,4) ขณะเดียวกันยา mAb มีกระบวนการผลิตที่ซับซ้อน มีโอกาสเบี่ยงเบนจากมาตรฐานหากควบคุมการผลิตไม่ดีก็อาจได้ยาที่มีคุณภาพไม่ตรงตามที่ออกแบบไว้ ปัจจุบันยา mAb ที่ใช้ในประเทศไทยเป็นยานำเข้าทั้งหมดจากประเทศต่างๆ ทั้งจากโรงงานใหญ่ที่จำหน่ายยาไปทั่วโลกและโรงงานขนาดเล็กที่ผลิตยาชีววัตถุคล้ายคลึง (biosimilars) ที่จำหน่ายยาในเขตอื่นนอกเหนือจากยุโรปและอเมริกา ดังนั้นในการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์นี้จึงต้องมีการตรวจวิเคราะห์ด้าน charge variants ของยา mAb ร่วมกับการวิเคราะห์หัวข้ออื่นๆ หากมีการเปลี่ยนแปลงกระบวนการผลิตหรือเก็บรักษายาเป็นเวลานานอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโมเลกุล ซึ่งอาจไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงประจุ แต่บางชนิด เช่น การตัดกรดอะมิโนไลซีนที่ C-terminal ของ heavy chain ออกอย่างไม่สมบูรณ์จึงทำให้มีการเปลี่ยนแปลงประจุเกิดการจับเป็นวง (cyclization) ของ glutamine ที่ N-terminal หรือมีปฏิกิริยา oxidation เปลี่ยน methionine เป็น methionine sulfoxide ทำให้ได้ basic variants ส่วน acidic variants เกิดจากการเติมน้ำตาลกรดไซอะลิก (sialic acid) ในส่วน Fc และปฏิกิริยา deamidation เช่น จากกรดอะมิโนแอสพาราจีนเป็นกรดแอสปาร์ติก เป็นต้น^(5,6) ปัจจุบันผู้ผลิตและภาครัฐให้ความสำคัญกับความสัมพันธ์ของโครงสร้างโมเลกุลกับประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของ mAb ซึ่งการเปลี่ยนแปลงประจุอาจไม่กระทบต่อการออกฤทธิ์ของยา แต่เนื่องจากปัจจุบันยังมีข้อมูลด้านนี้จำกัด จึงต้องติดตามตรวจสอบความสม่ำเสมอของคุณลักษณะทางประจุ

เทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ด้านประจุ คือ อิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแคปิลลารี⁽⁷⁻⁹⁾ (capillary electrophoresis: CE) ชนิด isoelectric focusing (cIEF) โดยพิจารณาจากค่า isoelectric point (pI) ซึ่งแสดงเป็น isoforms มีทั้งแบบ acidic variants และ basic variants นอกเหนือจากโมเลกุลหลัก (main peak) ที่มีค่าประจุรวมเป็นศูนย์ในสนามไฟฟ้าและเปรียบเทียบ isoforms กับสารมาตรฐานร่วมการวิเคราะห์คุณลักษณะด้านอื่นๆ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาคุณลักษณะ charge variants ของยา mAb ชนิดต่างๆ ที่นำเข้ามาจำหน่ายในประเทศไทยด้วยเทคนิค cIEF เพื่อตรวจสอบยืนยันคุณลักษณะของยาว่าเป็นไปตามที่จดแจ้งในการขึ้นทะเบียนยา และเพื่อศึกษาเปรียบเทียบคุณลักษณะด้านประจุของยา mAb ชนิดคล้ายคลึงกับยาอ้างอิง เพื่อให้ได้ข้อมูลสำหรับการเฝ้าระวังหลังจำหน่ายเพื่อให้ประชาชนได้รับยาที่ดีและปลอดภัย

วัสดุและวิธีการ

สารเคมี

สารเคมีและสารละลายที่ใช้เป็นชนิด analytical grade ทั้ง Anolyte (200 mM Phosphoric Acid), Catholyte (300 mM Sodium Hydroxide), Chemical Mobilizer (350 mM Acetic Acid), Cathodic Stabilizer (500 mM Arginine), Anodic Stabilizer (200 mM Iminodiacetic Acid), Urea Solution (4.3 M Urea), 3 M Urea-cIEF Gel, Pharmalyte 3 - 10 carrier ampholytes (GE Healthcare # 17 - 0456 - 01)

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแคปิลลารี รุ่น PA 800 Plus Pharmaceutical Analysis System (Beckman Coulter, USA) โดยโปรแกรมประมวลผล 32 Karat Software version 9.1 patch และ PA 800 plus Software version 1.1 patch ใช้แคปิลลารีแบบ neutral-coated ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 50 μm ความยาวทั้งหมด (L) 30.2 cm และเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงชนิด UV 280 nm สารละลาย cIEF gel

ตัวอย่างและสารมาตรฐาน

ยาชีววัตถุเพื่อการรักษาลำเร็จรูปชนิดโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำนวน 14 ชื่อการค้า (brands) คือ ชนิด A-N ที่ขึ้นทะเบียนเพื่อจำหน่ายในประเทศไทยสำหรับการรักษาโรคชนิดต่างๆ เช่น โรคติดเชื้อ มะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งเม็ดเลือดขาว โรคข้ออักเสบ โรคกระดูกพรุนและโรคปลูกประสาทอักเสบ เป็นต้น โดย 1 ชนิดเป็นยาคัดลอก (Biosimilars) และอีก 13 ชนิดเป็นยาต้นแบบ (originators) ซึ่งมี 1 ชนิดเป็นยาอ้างอิง (reference product) ของยาคัดลอก ซึ่งได้รับจากผู้ผลิตรวมทั้งสารมาตรฐานของ mAb ทั้ง 14 ชนิด ตัวอย่างทั้งหมดเป็นทั้งชนิดผงแห้งและน้ำ เก็บที่ 2 - 8°C

โปรตีนอ้างอิงมาตรฐาน (cIEF peptide markers: pI 10.0, 9.5, 7.0, 5.5, 4.1 # A58481) จาก Beckman Coulter; USA

การเตรียมตัวอย่างและสารมาตรฐาน

ละลายตัวอย่างและสารมาตรฐานด้วยน้ำสำหรับยาฉีดให้มีความเข้มข้น 10 mg/mL เติมน้ำ 10 μL ลงในหลอด micro tube ที่มีสารเหล่านี้ในหลอด คือ 3 M urea-cIEF Gel ปริมาตร 200 μL carrier ampholytes ปริมาตร 12.0 μL cathodic stabilizer ปริมาตร 20.0 μL anodic stabilizer ปริมาตร 2.0 μL และ pI มาตรฐาน 2 ชนิด ที่มีค่า pI ใกล้เคียงกับตัวอย่าง ชนิดละ 2.0 μL ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer ประมาณ 15 วินาที แล้วนำไปปั่นในเครื่องปั่นเหวี่ยง 6,600 rpm ประมาณ 20 วินาที เพื่อให้ฟองอากาศหายไปก่อนทำการทดสอบ

เตรียมโปรตีนอ้างอิงมาตรฐาน (cIEF peptide markers) โดยเปิด 3 M urea-cIEF Gel ปริมาตร 200 μL ใส่ใน micro tube แล้วเติม pharmalyte 3 - 10 carrier ampholytes ปริมาตร 12.0 μL cathodic stabilizer ปริมาตร 20.0 μL anodic stabilizer ปริมาตร 2.0 μL จากนั้นเติม pI markers 10.0, 9.5, 7.0, 5.5 และ 4.1 ชนิดละ 2.0 μL ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นในเครื่องปั่นเหวี่ยงประมาณ 20 วินาที เพื่อให้ฟองอากาศหายไปก่อนนำไปทดสอบ

วิธีการ

วิเคราะห์ตัวอย่างตามสภาวะที่กำหนดดังนี้ ล้างท่อแคปิลลารีด้วย 4.3 M urea solution โดยใช้ความดัน 50.0 psi นาน 3 นาที และล้างด้วยน้ำที่ความดัน 50.0 psi นาน 2 นาที แล้วจึงฉีดตัวอย่างที่ความดัน 25.0 psi เป็นเวลา 99 วินาที จากนั้นเป็นการแยกสารโดยช่วง focusing step ใช้ความต่างศักย์ 25.0 kV นาน 15 นาที และขั้นตอน mobilization step ปรับความต่างศักย์เป็น 30.0 kV นาน 30 นาที จึงสิ้นสุดการแยก และล้างแคปิลลารีด้วยน้ำที่ความดัน 50.0 psi 2 นาที และให้ความต่างศักย์ลดลงเป็น 15.0 kV เพื่อเตรียมการฉีดตัวอย่างครั้งต่อไป

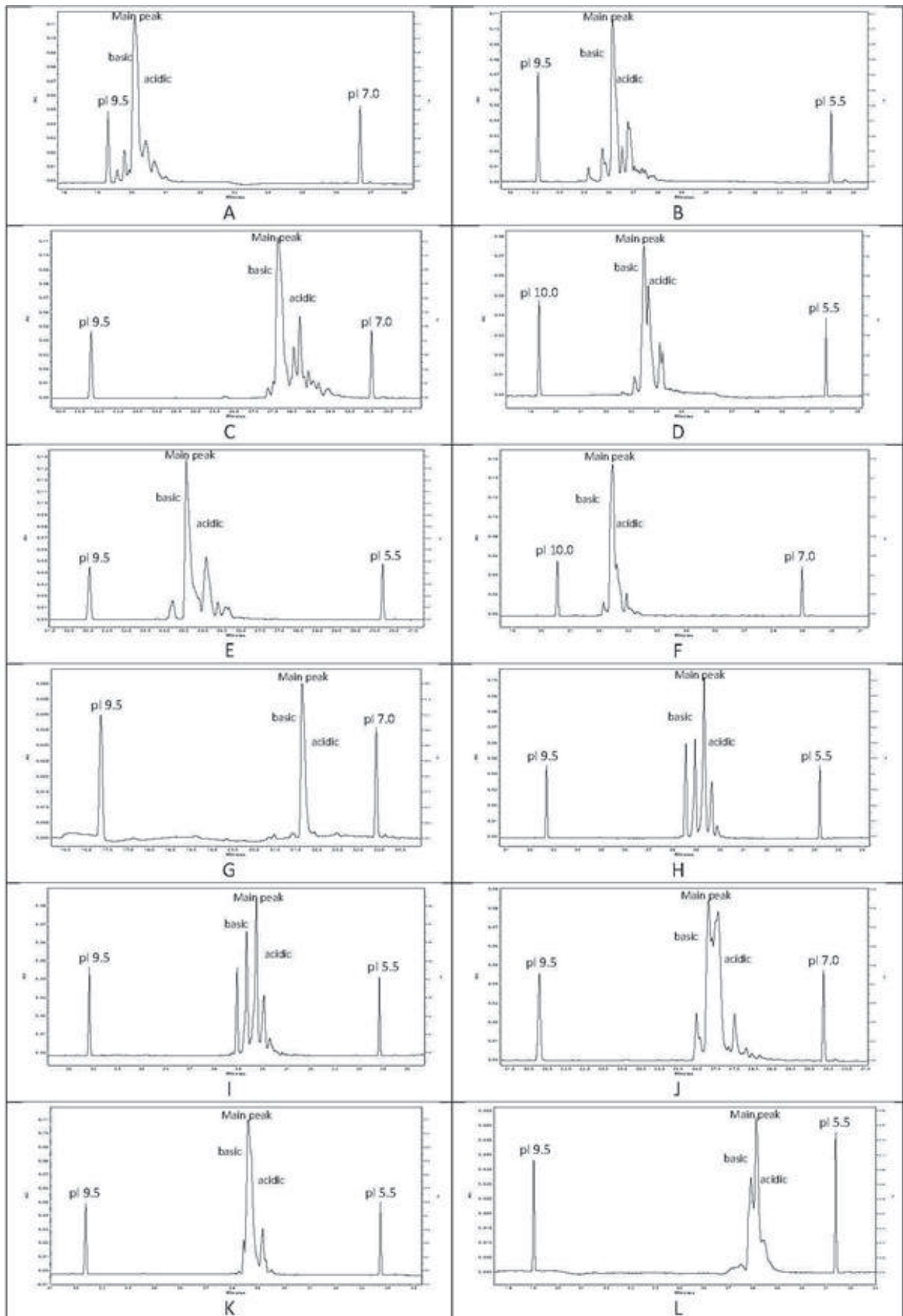
โปรตีนที่มีค่า pI สูงกว่าค่า pH จะมีประจุบวก โปรตีนที่มีค่า pI ต่ำกว่า pH จะมีประจุลบ เมื่อเคลื่อนที่ไปถึงตำแหน่งใดที่ประจุมบนโมเลกุลเป็นศูนย์ โปรตีนจะหยุดการเคลื่อน ณ จุดนี้คือค่า pI แสดงผลอิเล็กโตรโฟโแกรมเป็นพีคซึ่งมีความหมายทั้งตำแหน่งซึ่งบอกเวลาที่ใช้ในการเคลื่อนที่ (migration time: MT) ความสูง (peak height) และพื้นที่ใต้พีค (peak area) ที่บอกถึงปริมาณพีคที่ขนาดใหญ่หรือสูงที่สุดจะเป็นพีคหลัก (major peak/main peak) ซึ่งจะเป็นโปรตีนที่มีปริมาณมากที่สุดและมักจะมีพีคอื่นประกอบตามชนิดขององค์ประกอบในตัวอย่่างที่วิเคราะห์โดยพีคที่อยู่ด้านขวาของพีคหลักจะมีค่า pH ต่ำกว่าพีคหลักเรียกเป็น acidic peak และในด้านตรงกันข้ามค่า pH สูงกว่าพีคหลักคือ basic peak ในการตรวจเอกลักษณ์ของโปรตีนจะคำนวณหาค่า pI ของตัวอย่างจาก MT ซึ่งค่า pI และอิเล็กโตรโฟโแกรมของตัวอย่างต้องตรงกับสารมาตรฐานชนิดนั้น ๆ ซึ่งเป็นไปตามข้อกำหนดของยา (product specification) นอกจากนี้ได้ทำ forced degradation ของ mAb ของยาชนิดคล้ายคลึงโดยการอุ่นในตู้อบที่ 37°C นาน 1 - 5 วัน เพื่อศึกษาเปรียบเทียบกับยาอ้างอิง โดยทุกตัวอย่างทำการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ

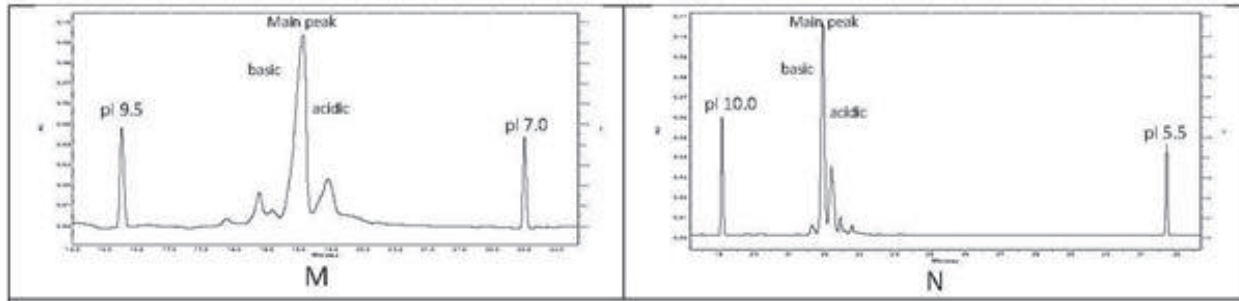
ผล

ผลการวิเคราะห์ mAb ทั้ง 14 ชนิดด้วย cIEF นาน 30 นาทีได้อิเล็กโตรโฟแกรมแสดง isoforms ของตัวอย่างแต่ละชนิด ในภาพรวม isoforms มีค่า pI ภาพ รวมอยู่ในช่วง 6 - 10 (ตารางที่ 1) เป็นกลุ่มของพีคที่มีความสูง จำนวนพีคและค่า MT แตกต่างกัน (ภาพที่ 1) โดยเริ่มปรากฏพีคแรกประมาณ 20 นาทีเป็นต้นไป เช่น ตัวอย่าง mAb ชนิด A โดยตัวอย่างทุกชนิดมี charge variants ทั้ง 3 รูปแบบ คือชนิด basic และ acidic นอกเหนือจากพีคหลักซึ่งเป็นพีคที่สูงที่สุด โดย pI ของพีคชนิด basic และ acidic พีค อยู่ในช่วง 9.48 - 6.70 และ 9.24 - 6.40 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน พบว่า mAb ทุกตัวอย่างมีอิเล็กโตรโฟแกรมตรงกับสารมาตรฐานของตัวเอง ทั้งลักษณะรูปแบบการกระจายตัว จำนวนพีค และความสูงของพีคที่สอดคล้องกัน ซึ่งได้แสดงผลการเปรียบเทียบของ mAb ชนิด I และ C เป็นตัวอย่าง (ภาพที่ 2) ส่วนการศึกษา forced degradation ของ mAb ชนิด H และ I พบว่าลักษณะของอิเล็กโตรโฟแกรมของชนิด I แตกต่างไปจากเดิมคือมีจำนวนพีคเพิ่มมากขึ้นจาก (ภาพที่ 3)

ตารางที่ 1 ค่า pI ของตัวอย่าง mAb 14 ชนิด

products	pI main peak
M	6 - 7
C G H I K L	7 - 8
B D E N J	8 - 9
A F	9 - 10

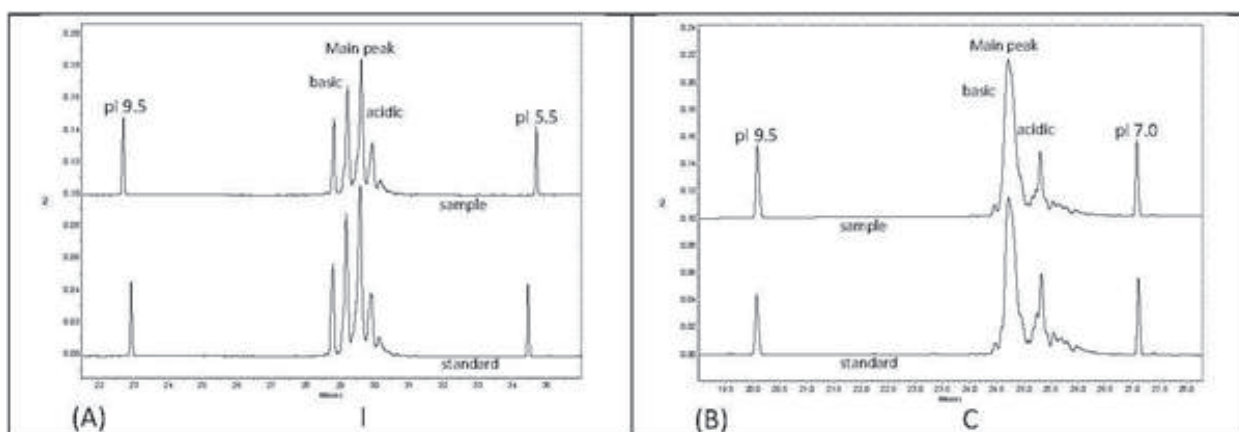




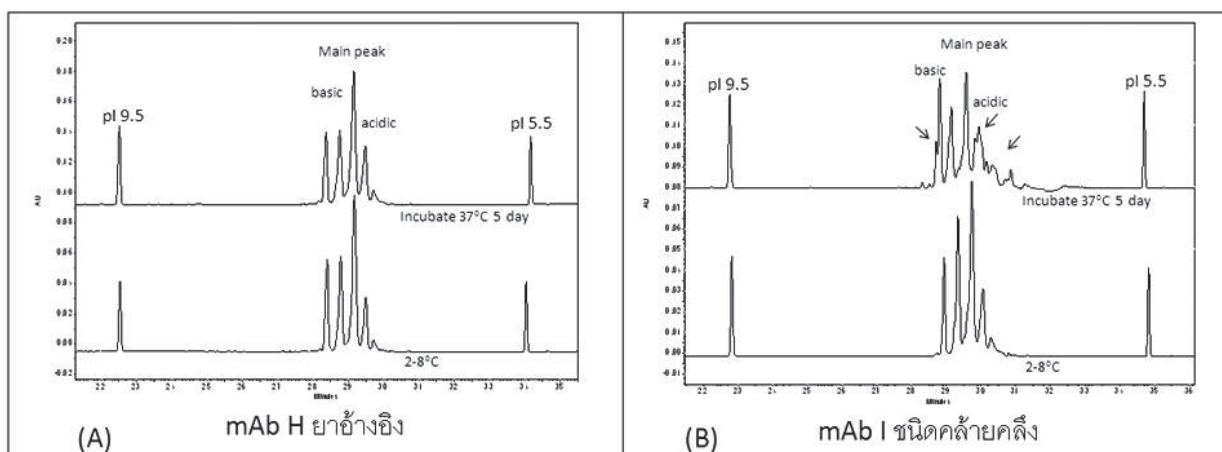
ภาพที่ 1 อิเล็กโทรโฟโกราฟีของตัวอย่าง mAb ทั้ง 14 ชนิด (ชนิด A-N)

ตารางที่ 2 ช่วงค่า pI ของ isoforms จากเทคนิค cIEF ของตัวอย่าง ทั้ง 14 ชนิด

products	pI basic peak	main peak	pI acidic peak
A	9.41 – 9.34	9.24	9.13 – 8.93
B	8.81 – 8.62	8.48	8.35 – 7.95
C	7.94	7.85	7.63 – 7.4
D	8.69 – 8.50	8.36 – 8.29	8.11 – 8.06
E	8.37	8.18	8.01 – 7.65
F	9.48 – 9.42	9.30	9.24 – 8.99
G	7.76	7.67	7.56
H	7.46 – 7.33	7.19	7.08 – 7.00
I	7.46 – 7.33	7.20	7.14 – 7.01
J	8.11	8.01 – 7.93	7.83 – 7.56
K	7.43 – 7.36	7.30	7.11 – 6.99
L	6.70	6.57–6.50	6.40
M	8.85–8.66	8.38	8.23
N	9.04	8.92	8.84–8.61
range	9.48–6.70	9.30–6.50	9.13–6.40



ภาพที่ 2 ลักษณะของอิเล็กโทรโฟโกราฟีจาก cIEF (A) ของยา mAb ชนิด I และ (B) mAb ชนิด C เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน



ภาพที่ 3 ลักษณะอิเล็กโทรโฟโแกรมของ mAb H ยาอ้างอิง (A) และชนิดคล้ายคลึง mAb I (B) เมื่อเก็บที่ 37 °C นาน 5 วัน

วิจารณ์

ตัวอย่างยา mAb จำนวน 14 ชนิด (A-N) ที่นำมาศึกษา 13 ชนิดเป็นยาอ้างอิงและหนึ่งชนิดเป็นยาคล้ายคลึงที่ขอขึ้นทะเบียนเพื่อจำหน่ายในประเทศไทยสำหรับรักษาโรคชนิดต่างๆ เช่น โรคติดเชื้อ มะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งเม็ดเลือดขาว โรคข้ออักเสบ โรคกระดูกพรุน และโรคปอดอักเสบ เป็นต้น

การศึกษานี้วิเคราะห์ charge variants ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟริซิสแบบแคปิลลารีชนิด cIEF ที่ได้ตรวจสอบความถูกต้องแล้ว⁽¹⁰⁾ และได้ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง mAb ทุกชนิดด้วยสภาวะเดียวกัน ผลการวิเคราะห์ mAb ทุกชนิดได้ charge variants ที่มี isoforms ทั้ง 3 แบบ คือชนิดพิคหลัก ชนิด basic และชนิด acidic variants แสดงถึงความหลากหลายของประจุบนโมเลกุลของยา ถือว่าเป็นความแตกต่างเพียงเล็กน้อย (microheterogeneity) ซึ่งพบได้ในโมเลกุลของโปรตีน ในการวิเคราะห์ได้เติม pI markers 2 ชนิด ซึ่งอยู่ในช่วงค่า pI 10.0 - 5.5 เพื่อการคำนวณค่า pI ของ isoforms จากโปรแกรมของเครื่องมือ cIEF ตามที่เหมาะสมกับชนิดตัวอย่าง isoforms ที่ได้แสดงให้เห็นว่า mAb เกือบทุกชนิดเป็น basic variants (ตารางที่ 1) คือ มีอิเล็กโทรโฟโแกรมอยู่ระหว่าง pI markers 7.0 - 10.0 (ภาพที่ 1) มี 1 ชนิดที่ pI ของพิคหลักเป็นชนิด acidic variant คือ mAb ชนิด M

จากการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานพบว่า mAb ทุกชนิดมีอิเล็กโทรโฟโแกรมของ isoforms ตรงกับสารมาตรฐานของตัวเอง ซึ่งได้แสดงผลจาก mAb ชนิด I และ C เป็นตัวอย่าง (ภาพที่ 2) แสดงว่าตัวอย่างและสารมาตรฐานมีโครงสร้างที่มีเอกลักษณ์ตรงกัน เนื่องจากหากอิเล็กโทรโฟโแกรมของตัวอย่างเปลี่ยนแปลงจากเดิมหรือของยาแต่ละรุ่นแตกต่างกัน หรือแตกต่างจากสารมาตรฐานจะทำให้ทราบถึงความผิดปกติของโมเลกุล⁽¹⁾ ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น จากลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างหรือเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของโมเลกุลหลังการผลิต หรือในระหว่างการเก็บรักษาเป็นเวลานาน ในขณะที่ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์อาจเป็นไปตามเกณฑ์และการตรวจสอบการออกฤทธิ์ของยาอาจไม่พบการเปลี่ยนแปลงนี้

เมื่อเปรียบเทียบการวิเคราะห์ isoforms ของ mAb จากงานวิจัยอื่นด้วยเทคนิค cIEF⁽¹¹⁻¹⁵⁾ เช่น ตัวอย่าง E⁽¹²⁾ ซึ่งมีสภาวะ cIEF แตกต่างกัน พบว่ารูปแบบของอิเล็กโทรโฟโแกรม และความสูงของพิคหลักเหมือนกันและอยู่ในช่วง pI marker 8.4 - 10.0 เช่นเดียวกัน แต่มีความแตกต่างของตำแหน่งพิคเล็กน้อย เนื่องจากผลการศึกษานี้มีค่า MT ที่เริ่มในช่วงเวลาที่ช้ากว่า และมีจำนวนพิคชนิด acidic variants มากกว่า ซึ่งเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น จากปฏิกิริยา deamidation ของกรดอะมิโนไลซีนที่ปลายสายโปรตีน (C-terminal) หรือมีการเติมน้ำตาลกรดไขมัน รวมทั้งอาจเกิดสลายตัวและการจับตัวกันของโปรตีน (aggregation)^(3,15,16) ในโมเลกุลของยารุ่นที่ส่งมาตรวจ

เนื่องจากประเทศไทยมีประกาศของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาว่าด้วยการขึ้นทะเบียนยาคล้ายคลึงในปี 2556⁽¹⁷⁾ ดังนั้นยา mAb ชนิดใดที่ขึ้นทะเบียนก่อนปี 2556 แม้จะเป็นยาคล้ายคลึงก็จะขึ้นทะเบียนเป็นยาใหม่ จึงไม่มีข้อมูลการศึกษาเปรียบเทียบความคล้ายคลึงระหว่างยาต้นแบบที่ใช้เป็นยาอ้างอิงของยาคล้ายคลึงแสดงไว้ในการขึ้นทะเบียน ซึ่งได้แก่ mAb ชนิด I จึงได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบความคล้ายคลึงด้านประจุในการทดสอบเดียวกัน (head-to-head comparison) ผลคือได้อิเล็กโทรโฟโกราแกรมตรงตามยาอ้างอิง คือ mAb ชนิด H แสดงถึงโครงสร้างที่คล้ายคลึงกัน (ภาพที่ 1) แต่ที่น่าสนใจคือผลจากการทดลอง forced degradation โดยการอุ่นตัวอย่างในตู้บัพที่ 37 °C นาน 5 วัน พบว่าอิเล็กโทรโฟโกราแกรมของยาอ้างอิงยังคงเดิมส่วนของยาคล้ายคลึงคือ mAb ชนิด I เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมอย่างชัดเจนจากจำนวนพีคที่เพิ่มมากขึ้นในส่วนของ acidic variants (ภาพที่ 3) เมื่อพิจารณาสูตรตำรับของยาอ้างอิงและยาคล้ายคลึงพบว่าไม่แตกต่างกัน ดังนั้นความคงตัวที่ต่างกันนี้อาจเกิดจากกระบวนการผลิตที่ต่างกัน เช่น จากปฏิกิริยาทางเคมี deamidation หรือการตัดกรดอะมิโนไลซีนบน C-terminal หรือการเติมน้ำตาลกรดไซอะลิกในส่วน Fc เป็นต้น

สรุป

การรักษาโรคด้วยยาชีววัตถุ Biotherapeutic product ชนิด mAb ต้องการการวิเคราะห์คุณภาพของยาเพื่อให้มั่นใจในคุณภาพ ประสิทธิภาพและความปลอดภัย แม้ว่าการศึกษานี้จะมีตัวอย่าง mAb แต่ละชื่อการค้าเพียง 1 รุ่น แต่ผลการศึกษา charge variants ของยา mAb ทั้ง 14 ชื่อการค้าที่ขึ้นทะเบียนในประเทศไทยพบว่ายาทุกชื่อการค้ามีคุณลักษณะเป็นไปตามมาตรฐานที่จัดแจ้ง และผลการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงด้านประจุเป็นประโยชน์สำหรับการเฝ้าระวังและตรวจสอบคุณภาพของยาเหล่านี้ในรุ่นต่อ ๆ ไปที่นำมาจำหน่ายในประเทศ ซึ่งภาครัฐจะต้องวางแผนการเฝ้าระวังความสม่ำเสมอของคุณภาพและความคงตัวต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

เอกสารอ้างอิง

1. Liu H, Gaza-Bulsecu G, Falu D, Chumsae C, Sun J. Heterogeneity of monoclonal antibodies. *J Pharm Sci* 2008; 97(7): 2426-47.
2. Beck A, Wagner-Rousset E, Ayoub D, Van Dorsselaer A, Sanglier-Cianferani S. Characterization of therapeutic antibodies and related products. *Anal Chem* 2013; 85(2): 715-36.
3. Zhao SS, Chen DDY. Applications of capillary electrophoresis in characterizing recombinant protein therapeutics. *Electrophoresis* 2014; 35(1): 96-108.
4. Liu X, Sosic Z, Krull IS. Capillary isoelectric focusing as a tool in the examination of antibodies, peptides and proteins of pharmaceutical interest. *J Chromatogr A* 1996; 735(1-2): 165-90.
5. Mack S, Cruzado-Park ID, Ratnayake CK. High Resolution cIEF of therapeutic monoclonal antibodies: a platform method covering pH 4-10 (A-12026A). [online]. Fullerton, CA: Beckman Coulter; 2014. [cited 2013 Dec 16]. Available from: <https://sciex.com/Documents/tech%20notes/A-12026A.pdf>
6. Tang S, Nesta DP, Maneri LR, Anumula KR. A method for routine analysis of recombinant immunoglobulins (rIgGs) by capillary isoelectric focusing (cIEF). *J Pharm Biomed Anal* 1999; 19(3-4): 569-83.

7. จูฑาภรณ์ ภูติภินโยวัฒน์, วิชชุดา จริยะพันธุ์, สายวรุฬ จตุรภิตตินันท์, อีรนารถ จิระไพศาลพงศ์. การพัฒนาวิธีการตรวจเอกลักษณ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธีแคปิลลารีไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง (cIEF). ว เกษศาสตร์อีสาน 2558; 11(2): 45-54.
8. Santora LC, Krull IS, Gran K. Characterization of recombinant human monoclonal tissue necrosis factor- α antibody using cation-exchange HPLC and capillary isoelectric focusing. Anal Biochem 1999; 275: 98-108.
9. Hunt G, Moorhouse KG, Chen AB. Capillary isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate-capillary gel electrophoresis of recombinant humanized monoclonal antibody HER2. J Chromatogr A 1996; 744(1-2): 295-301.
10. Hunt G, Hotaling T, Chen AB. Validation of a capillary isoelectric focusing method for the recombinant monoclonal antibody C2B8. J Chromatogr A 1998; 800(2): 355-67.
11. López-Morales CA, Miranda-Hernández MP, Juárez-Bayardo LC, Ramírez-Ibáñez ND, Romero-Díaz AJ, Piña-Lara N, et al. Physicochemical and biological characterization of a biosimilar trastuzumab. BioMed Res Int 2015; 2015: 1-10.
12. Bandyopadhyay S, Mahajan M, Mehta T, Singh AK, Parikh A Gupta AK, et al. Physicochemical and functional characterization of a biosimilar adalimumab ZRC-3197. Biosimilars 2015; 5: 1-18.
13. Khawli LA, Goswami S, Hutchinson R, Kwong ZW, Yang J, Wang X, et al. Charge variants in IgG1: Isolation, characterization, in vitro binding properties and pharmacokinetics in rats. mAbs 2010; 2(6): 613-24.
14. Neergaard MS, Nielsen AD, Parshad H, Van De Weert M. Stability of monoclonal antibodies at high-concentration: head-to-head comparison of the IgG1 and IgG4 Subclass. J Pharm Sci 2014; 103(1): 115-27.
15. Ito T, Tsumoto K. Effects of subclass change on the structural stability of chimeric, humanized, and human antibodies under thermal stress. Protein Sci 2013; 22(11): 1542-51.
16. ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง เอกสารหลักฐานการขอขึ้นทะเบียนตำรับยาชีววัตถุคล้ายคลึง. ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 130 ตอนพิเศษ 174 ง (ลงวันที่ 4 ธันวาคม 2556).

Charge Variants Analysis of Biotherapeutic Monoclonal Antibody by Capillary Isoelectric Focusing

Wichuda Jariyapan Titaporn Pootipinyowat and Saywarul Jadoonkittinan

Institute of Biological Product, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand.

ABSTRACT Monoclonal antibody molecules of therapeutic finished products could have variations due to their charge variants. Changes of charge profile could alter drug stability, bioactivity and/or induce harmful immunogenicity. Therefore, each batch should contain a consistent charge variant profile. This study was conducted to analyse charge heterogeneity of 14 brands of therapeutic monoclonal antibodies registered in Thailand using cIEF technique. The electropherogram results of all products showed 3 isoforms and complied with their reference material isoforms. Their pI range was within 7 – 10, while pI ranges of basic and acidic variants were 9.48 – 6.70 and 9.24 – 6.40, respectively. In addition, reference product showed better stability than its biosimilars when compared to their isoforms after incubation at 37 °C for 5 days. In conclusion, the therapeutic monoclonal antibodies registered in Thailand contained charge variants according to their reference materials; however, quality monitoring of lots of those therapeutic monoclonal antibody drug products should be considered including stability of biosimilars

Keywords: monoclonal antibodies, charge variants, biosimilars, capillary isoelectric focusing

การประเมินความเสี่ยงแคดเมียมจากการบริโภคประจำวันของคนไทย

พนาวลัย กลึงกลางดอน* ลัดดาวัลย์ โรจนพรรณทิพย์* กรรณิกา จิตติยศรา*

นนทรรัตน์ พรทรัพย์มณี** ปิ่นนรี ชินวรรณวงศ์*** และเชมิกา เหมโลหะ****

* สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

** ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อำเภอเมือง จังหวัดตรัง 92000

*** ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 เชียงใหม่ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ 50180

**** ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11 สุราษฎร์ธานี กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี 84100

บทคัดย่อ แคดเมียม (Cadmium, Cd) มักพบในอาหารเกือบทุกชนิด ซึ่งจะพบปริมาณที่ปนเปื้อนแตกต่างกันขึ้นกับชนิดอาหารและระดับปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม การบริโภคอาหารเป็นแหล่งหลักของการได้รับ Cd สำหรับคนทั่วไปที่ไม่สูบบุหรี่หรือทำงานในแหล่งที่มีแคดเมียม Cd จัดเป็นสารที่ก่อมะเร็งในมนุษย์ ในปี พ.ศ. 2553 หน่วยงาน JECFA (the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) กำหนดค่าความปลอดภัยจากการได้รับ Cd ต่อเดือน (provisional tolerable monthly intake, PTMI) เท่ากับ 25 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อเดือน งานวิจัยนี้ดำเนินการในช่วงปี พ.ศ. 2554 - 2556 เพื่อประเมินความเสี่ยงของ Cd จากการบริโภคประจำวันของคนไทย และมีข้อมูลที่เป็นปัจจุบันสำหรับใช้พิจารณาข้อกำหนดมาตรฐานแคดเมียมของอาหารในประเทศ และพิจารณาปรับแก้ข้อกำหนดมาตรฐานระหว่างประเทศให้เหมาะสม สำหรับขั้นตอนประเมินการได้รับสัมผัส Cd ด้วยวิธี duplicate portion โดยเก็บข้อมูลการบริโภค ตัวอย่างอาหารและน้ำที่บริโภคของคนไทยจาก 4 ภาค จำนวน 400 ครอบครัว ระยะเวลาศึกษา 4 วัน รวมประชากรที่ศึกษา 1,241 คน ตัวอย่างอาหาร 1,600 ตัวอย่าง และน้ำ 400 ตัวอย่าง วิเคราะห์ปริมาณ Cd ด้วยเครื่อง Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometer และ Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer ผลการศึกษาปริมาณ Cd เฉลี่ยที่ middle bound ในอาหาร และน้ำดื่ม เท่ากับ 0.009 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 7×10^{-4} มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปริมาณการบริโภคเฉลี่ยอาหารและน้ำดื่ม เท่ากับ 1,506 กรัมต่อคนต่อวัน และ 1,832 มิลลิตรต่อคนต่อวัน ตามลำดับ ปริมาณการได้รับสัมผัส Cd เฉลี่ยที่ middle bound จากการบริโภคประจำวัน (อาหารและน้ำดื่ม) ของคนไทย เท่ากับ 7.29 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อเดือน (น้ำหนักตัวเฉลี่ย 58 กิโลกรัม) คิดเป็นร้อยละ 29 ของค่า PTMI จึงสรุปได้ว่าโดยภาพรวมคนไทยยังคงปลอดภัยต่อ Cd ที่ได้รับจากการบริโภคประจำวัน

บทนำ

แคดเมียม (Cadmium, Cd) เป็นโลหะมีพิษที่เกิดขึ้นจากธรรมชาติในเปลือกโลกและมหาสมุทรในรูปอนินทรีย์ของ Cd เป็นธาตุที่ไม่ละลายน้ำ แต่สารประกอบของ Cd บางชนิดสามารถละลายน้ำได้ Cd ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมเนื่องจากธรรมชาติและกิจกรรมของมนุษย์ เช่น การระเบิดของภูเขาไฟ อุตสาหกรรม และแหล่งเกษตรกรรมต่าง ๆ สามารถนำมาใช้ประโยชน์หลากหลายด้าน เช่น ใช้ฉาบและเคลือบเงาผิวโลหะต่างๆ เพื่อความเงางามทนต่อการกัดกร่อน สารเพิ่มความคงตัวของพลาสติกจำพวกพีวีซี ผลิตเม็ดสี ผลิตแบตเตอรี่ขนาดเล็ก (แคดเมียม - นิกเกิล แบตเตอรี่) ปุ๋ยชนิดฟอสเฟต และยังใช้ในเตาปฏิกรณ์ปรมาณู โดยใช้เป็นตัวดูดซับนิวตรอน⁽¹⁻⁵⁾ แหล่งปนเปื้อน Cd ในสิ่งแวดล้อม ได้แก่ อากาศ ดิน และน้ำ Cd ปนเปื้อนเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารของมนุษย์มาจากดินและน้ำ โดยพืชจะดูด Cd ทางรากแล้วเก็บสะสมในส่วนต่างๆ ของพืช และสัตว์กินพืชนั้น แล้วมนุษย์ก็กินสัตว์และพืชนั้นเป็นอาหาร พืชจะดูดซึม Cd จากดินมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ความเป็นกรด-ด่าง (pH) อินทรีย์วัตถุในดิน และชนิดพืช ซึ่งดินที่เป็นกรดจะทำให้พืชดูดซึม Cd เพิ่มขึ้น⁽⁴⁻⁵⁾

สำหรับมนุษย์จะได้รับ Cd จากการหายใจ กิน ดื่ม หรือได้รับสัมผัสทางผิวหนัง สำหรับคนทั่วไปจะได้รับจากการบริโภคอาหารเป็นส่วนใหญ่ ส่วนผู้ที่สูบบุหรี่ก็จะได้รับ Cd เข้าสู่ร่างกายเพิ่มขึ้นอีก เนื่องจากใบยาสูบจะพบปริมาณ Cd สูง และคนที่ทำงานในแหล่งที่มี Cd เช่น เหมืองแร่ โรงงานแบตเตอรี่ขนาดเล็ก และการบัดกรี ก็จะมีโอกาสได้รับ Cd สูง⁽⁴⁻⁶⁾ สำหรับปริมาณ Cd ที่พบในอาหารนั้นจะพบปริมาณที่แตกต่างกันค่อนข้างมากขึ้นกับชนิดอาหารและระดับปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม โดยทั่วไปอาหารจำพวกพืชจะพบ Cd สูงกว่าอาหารจำพวกเนื้อสัตว์ ไข่ นม ผลิตภัณฑ์จากนม และปลา พืชที่มักพบ Cd สูงเป็นพวกธัญพืช พืชน้ำมัน พืชมีหัว นอกจากนั้นยังพบสูงในเห็ดป่า สำหรับเนื้อสัตว์พบ Cd สูงในเครื่องในสัตว์ และจะพบสูงขึ้นในสัตว์ที่อายุมาก ๆ ส่วนในสัตว์น้ำจืดและสัตว์ทะเลที่มักพบสูง เช่น หอยนางรม หอยสองฝา กุ้ง ปลาหมึก และปู⁽⁷⁻⁸⁾ นอกจากนี้ยังสามารถได้รับแคดเมียมจากภาชนะที่สัมผัสอาหาร เช่น เซรามิก อลลอย และพลาสติก⁽⁹⁾

Cd ถูกดูดซึมเข้าร่างกายจากการบริโภคประมาณร้อยละ 5 ซึ่งต่ำกว่าการดูดซึมจากการหายใจที่ดูดซึมร้อยละ 40 - 60⁽⁶⁾ สำหรับการดูดซึมทางผิวหนังนั้นน้อยมากประมาณร้อยละ 0.5⁽¹⁰⁾ การเกิดอันตรายจากการได้รับ Cd เข้าสู่ร่างกายมีหลายปัจจัย เช่น ปริมาณ ระยะเวลา วิธีทางที่ได้รับ Cd อายุ เพศ อาหารที่บริโภค และสภาวะทางโภชนาการ ซึ่งพบว่าคนที่ขาดธาตุเหล็กจะได้รับ Cd มากกว่าคนปกติ Cd จะสะสมได้ในร่างกาย และจะมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นตามอายุที่มากขึ้น⁽¹¹⁾ Cd เมื่อดูดซึมเข้าร่างกายจะถูกจับกับโปรตีน เช่น อัลบูมิน (albumin) และ เมทัลโลไธโอนีน (metallothionein) ทำให้ Cd มีความเป็นพิษน้อยลง⁽⁴⁾ เนื่องจาก Cd มีค่าครึ่งชีวิตยาวประมาณ 10 - 30 ปี Cd ที่ได้รับจะสะสมที่ไตหรือตับ และถูกขับจากร่างกายได้ช้ามากทางปัสสาวะและอุจจาระ⁽⁵⁾ เมื่อปริมาณ Cd ในร่างกายมีมากจนถึงจุดวิกฤตก็จะก่อให้เกิดพิษของ Cd ขึ้น สัญญาณแรกที่บ่งบอกว่าได้รับผลกระทบจากพิษ Cd คือ ท่อไต (renal tubular) ถูกทำลาย และถ้าได้รับ Cd เป็นเวลานานกระดูกระบาดจะมีความผิดปกติอย่างรุนแรง เรียกโรคนี้ว่า อีไต-อีไต⁽¹⁻³⁾ ปี ค.ศ. 2012 หน่วยงาน International Agency for Research on Cancer (IARC) จัดให้ Cd อยู่ใน Group 1 คือเป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ (carcinogenic to human)⁽¹²⁾

การศึกษาพิษวิทยาเลือกความผิดปกติของไต (renal dysfunction) เป็น end-point พิจารณาความเป็นพิษ จากการศึกษาแบบ meta-analysis ขนาดใหญ่ ของ dose-response ระหว่างการขับออกของ β 2-microglobulin (B2M) และปริมาณ Cd ในปัสสาวะ โดยเลือกศึกษากลุ่มประชากรในกลุ่มอายุ 50 ปีหรือมากกว่า ซึ่งพบความสัมพันธ์ระหว่างการเพิ่มขึ้นค่า B2M และปริมาณ Cd ในปัสสาวะ และเมื่อระดับ Cd ในไตมีสภาวะคงที่ จะขับ Cd ออกในปริมาณที่ต่ำกว่า 5.24 ไมโครกรัมของ Cd ต่อกรัมครีเอตินิน (μ g of Cd/gram creatinine)

และที่ 5 - 95 เปอร์เซ็นต์ไทล์ เท่ากับ 4.94 - 5.57 $\mu\text{g of Cd/gram creatinine}$ ซึ่งเป็นระดับที่ไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างการเพิ่มขึ้นของ B2M และปริมาณ Cd ในปัสสาวะ คณะกรรมการพิจารณาเลือกระดับต่ำ (lower bound) ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ไทล์ ของการได้รับสัมผัส Cd จากอาหารของประชากรทั้งหมดประมาณได้ค่า 0.8 $\mu\text{g/kg bw/day}$ หรือ 25 $\mu\text{g/kg bw/month}$ เป็นค่าที่เกิดผลกระทบน้อยจากการบริโภคประจำวัน และค่านี้ได้ประเมินจากการได้รับ Cd จากการบริโภคอาหารของทุกกลุ่มอายุ รวมทั้งผู้ที่บริโภคอาหารในปริมาณสูงและผู้ที่มีพฤติกรรมการบริโภคอาหารพิเศษ (เช่น ผู้บริโภคมังสวิรัต) ดังนั้น ในปี ค.ศ. 2010 หน่วยงาน The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additive (JECFA) จึงยกเลิกค่า PTWI (provisional tolerable weekly intake) แล้วกำหนดค่าความปลอดภัยใหม่เป็น PTMI (provisional tolerable monthly intake) ที่ระดับ 25 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อเดือน ($\mu\text{g/kg bw/month}$)⁽¹³⁾

สำหรับในประเทศไทยได้มีการศึกษาการได้รับโลหะจากการบริโภคอาหารต่อวัน ระหว่าง พ.ศ. 2542 - 2544 ด้วยวิธี Total diet Study พบว่าปริมาณ Cd ที่ได้รับจากการบริโภคอาหารเท่ากับ 17.24, 7.31 และ 4.82 ไมโครกรัมต่อคนต่อวัน⁽¹⁴⁾ ซึ่งอยู่ในระดับที่ปลอดภัยเมื่อเทียบกับค่าความปลอดภัย ปัจจุบันประเทศไทยยังไม่มีกฎหมายควบคุมปริมาณ Cd ในอาหาร⁽¹⁵⁾ ดังนั้นเพื่อคุ้มครองผู้บริโภคให้ปลอดภัย คณะผู้วิจัยจึงได้จัดทำโครงการบูรณาการร่วมกับศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ 7 แห่ง ขึ้นในปี พ.ศ. 2554 - 2556 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความเสี่ยงของ Cd ในอาหารและน้ำดื่มที่บริโภคประจำวันของคนไทย และมีข้อมูลที่เป็นปัจจุบันสำหรับใช้พิจารณากำหนดมาตรฐาน Cd ในอาหารในประเทศ และพิจารณาปรับแก้มาตรฐานระหว่างประเทศให้เหมาะสมและปลอดภัย

วัตถุประสงค์และวิธีการ

การศึกษานี้ดำเนินการในปี พ.ศ. 2554 - 2556 โดยใช้หลักวิธีประเมินความเสี่ยงที่เป็นที่ยอมรับในระดับสากล⁽¹⁶⁾ ลักษณะโครงการเป็นแบบบูรณาการระหว่างสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร และศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ใน 4 ภาค ได้แก่ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์เชียงใหม่ นครสวรรค์ อุตรธานี นครราชสีมา สุราษฎร์ธานี ตรัง และสมุทรสงคราม

1. การประเมินการได้รับสัมผัส (exposure assessment) Cd จากอาหารและน้ำดื่มซึ่งประกอบด้วย 3 ส่วนคือ ศึกษาข้อมูลปริมาณการบริโภค ศึกษาปริมาณ Cd ที่ปนเปื้อน และคำนวณปริมาณการได้รับสัมผัส ดังนี้

ส่วนที่ 1 ศึกษาข้อมูลปริมาณการบริโภคอาหารและน้ำดื่ม ดำเนินในปี พ.ศ. 2554 การศึกษาวิจัยนี้ใช้วิธีการเก็บข้อมูลการบริโภคอาหารและน้ำดื่มด้วยวิธี duplicate portion⁽¹⁷⁾ กลุ่มเป้าหมายที่จะศึกษาเลือกโดยการสุ่มอย่างง่าย (simple random sampling) โดยเลือกระดับภาค จำนวน 4 ภาค ได้แก่ กลาง เหนือ ตะวันออกเฉียงเหนือ และใต้ ระดับจังหวัดเลือกภาคละ 2 จังหวัด โดยเลือกจังหวัดที่เป็นที่ตั้งของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์หรือจังหวัดใกล้เคียง ได้แก่ นนทบุรี สมุทรสงคราม เชียงใหม่ อุทัยธานี นครราชสีมา อุตรธานี ตรัง และสุราษฎร์ธานี แต่ละจังหวัดเลือกระดับอำเภอ โดยสุ่มเลือกอำเภอที่เป็นตัวแทนของเขตเมือง 1 อำเภอ และเขตชนบท 1 อำเภอ แล้วสุ่มเลือกระดับตำบลและหมู่บ้านด้วยวิธีเดียวกัน แต่ละหมู่บ้านสุ่มเลือกครัวเรือนจำนวน 25 ครัวเรือน (ตารางที่ 1) รวม 50 ครัวเรือนต่อจังหวัด ภาคละ 100 ครัวเรือน รวมทั้งประเทศ 400 ครัวเรือน ระยะเวลาการศึกษา 4 วัน ซึ่งสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารและศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่เป็นตัวแทนของแต่ละภาคทำหน้าที่เก็บข้อมูลการบริโภคและเก็บตัวอย่างอาหารและน้ำ

ตารางที่ 1 รายละเอียดของพื้นที่ที่ดำเนินการสำรวจ

ภาค	จังหวัด	เขต	
กลาง	นนทบุรี	เมือง	เทศบาลบางบัวทอง ต.บางรักพัฒนา อ.บางบัวทอง จ.นนทบุรี
		ชนบท	บ้านคลองสอง ต.ทิวพัฒนา อ.ไทรน้อย จ.นนทบุรี
	สมุทรสงคราม	เมือง	ต.บางนาแขวก อ.บางคนที จ.สมุทรสงคราม
		ชนบท	ต.บางช้าง อ.อัมพวา จ.สมุทรสงคราม
เหนือ	เชียงใหม่	เมือง	ต.ต้นเปา อ.สันกำแพง จ.เชียงใหม่
		ชนบท	ต.ขุนคอง อ.หางดง จ.เชียงใหม่
	อุทัยธานี	เมือง	ต.ในเมือง อ.เมือง จ.อุทัยธานี
		ชนบท	บ้านดงยาง (หนองจิก) ต.หนองยาง อ.หนองฉาง จ.อุทัยธานี
ตะวันออกเฉียงเหนือ	นครราชสีมา	เมือง	ต.ในเมือง อ.เมือง จ.นครราชสีมา
		ชนบท	บ้านโนนหมั่น ต.โนนสูง อ.โนนสูง จ.นครราชสีมา
	อุดรธานี	เมือง	บ้านโนนพิบูลย์ ต.หมากแข้ง อ.เมือง จ.อุดรธานี
		ชนบท	บ้านนาม่วง ต.นาม่วง อ.ประจักษ์ศิลปาคม จ.อุดรธานี
ใต้	สุราษฎร์ธานี	เมือง	ต.ขุนทะเล อ.เมือง จ.สุราษฎร์ธานี
		ชนบท	ต.น้ำพุ อ.นาสาร จ.สุราษฎร์ธานี
	ตรัง	เมือง	หมู่ 4 ต.บ้านควน อ.เมือง จ.ตรัง
		ชนบท	บ้านน้ำพราย หมู่ 3 ต.ปากคม อ.ห้วยยอด จ.ตรัง

วิธีสำรวจปริมาณการบริโภควิธี duplicate portion นั้นเป็นการสำรวจปริมาณการบริโภคจริงต่อวันของครัวเรือนที่ร่วมโครงการ ปริมาณการบริโภคอาหารคำนวณได้จากข้อมูลการบริโภคที่สมาชิกบันทึกในแบบบันทึกข้อมูลการบริโภคอาหาร สมาชิกในครัวเรือนที่ร่วมโครงการต้องกรอกรายละเอียดเกี่ยวกับรายการอาหารที่บริโภค น้ำหนักอาหารก่อนและหลังบริโภค ปริมาณการบริโภคน้ำดื่มที่บริโภคจริง และจำนวนสมาชิกในครัวเรือนที่ร่วมบริโภคอาหารและน้ำดื่มในแต่ละมื้อ (ไม่รวมเด็กที่อายุน้อยกว่า 3 ปี) พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างอาหารและน้ำดื่มทุกอย่างที่ครัวเรือนบริโภค (ใช้ดำเนินการในส่วนที่ 2) โดยแต่ละครัวเรือนจะได้รับเครื่องชั่ง ถ้วยตวง และอุปกรณ์อื่นๆ เพื่อใช้ในการบันทึกปริมาณการบริโภคอาหารและน้ำดื่ม

วิธีการคำนวณปริมาณการบริโภคจากแบบบันทึกข้อมูลการบริโภคอาหาร

- อาหาร โดยเปลี่ยนหน่วยของน้ำหนักอาหารให้ เป็น “กรัม” เนื่องจากจะให้สมาชิกในครัวเรือนบันทึกน้ำหนักอาหารที่บริโภคเป็น “ขีด” จากนั้นนำน้ำหนักอาหารก่อนบริโภคลบด้วยน้ำหนักอาหารหลังบริโภคจะได้น้ำหนักอาหารที่บริโภคของครัวเรือนในแต่ละมื้ออาหารด้วยจำนวนสมาชิกที่บริโภคอาหารในมือนั้น (กรัมต่อคนต่อมื้อ) รวม 3 มื้อ จะได้ปริมาณการบริโภคอาหารต่อคนต่อวัน (กรัมต่อคนต่อวัน)

- น้ำดื่ม ปริมาณน้ำดื่มจะบันทึกปริมาณน้ำดื่มในแต่ละวันเป็นรายบุคคล ซึ่งจะบันทึกเป็น “ถ้วยตวง” โดย 1 ถ้วยตวงเท่ากับ 160 มิลลิลิตร จะได้ปริมาณการบริโภคน้ำดื่มต่อคนต่อวัน (มิลลิลิตรต่อคนต่อวัน)

ส่วนที่ 2 ศึกษาข้อมูลการปนเปื้อนของ Cd ในอาหารและน้ำดื่ม ดำเนินการในปี พ.ศ. 2555 - 2556 สมาชิกของครัวเรือนที่ร่วมโครงการต้องเก็บตัวอย่างอาหารทุกชนิดที่บริโภค ตามที่บันทึกในแบบบันทึกข้อมูลการบริโภคอาหาร และตัวอย่างที่เก็บได้ต้องดำเนินการเตรียมตัวอย่างตามสัดส่วนการบริโภคจริง ตรวจวิเคราะห์ปริมาณ Cd และรายงานผล ดังนี้

การเตรียมตัวอย่าง

- อาหาร ดำเนินการโดยรวมอาหารที่บริโภคใน 1 มื้อ ตามสัดส่วนการบริโภคจริงต่อคน (หน่วย กรัมต่อคนต่อมื้อ) แล้วบดให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นรวมอาหาร 3 มื้อ ตามสัดส่วนการบริโภคจริงต่อคน แล้วบดให้เป็นเนื้อเดียวกันอีกครั้ง จะได้เป็น 1 ตัวอย่างของอาหารที่คนไทยบริโภคจริงต่อคนต่อวัน (หน่วย กรัมต่อคนต่อวัน) ระยะเวลาศึกษา 4 วัน จาก 400 ครั้วเรือน รวมตัวอย่างอาหาร 1,600 ตัวอย่าง

- น้ำดื่ม เก็บตัวอย่างน้ำดื่มครั้วเรือนละ 1 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 400 ตัวอย่าง จาก 400 ครั้วเรือน เก็บรักษาตัวอย่างด้วยกรดไนตริก (เติมกรดไนตริกเข้มข้น 1 มิลลิลิตรต่อตัวอย่างน้ำดื่ม 1 ลิตร)

การตรวจวิเคราะห์

หน่วยงานที่ร่วมตรวจวิเคราะห์ จำนวน 4 หน่วยงาน ได้แก่ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์เชียงใหม่ สุราษฎร์ธานี และตรัง ซึ่งแต่ละหน่วยงานมีการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญผลอยู่ในเกณฑ์น่าพอใจ และมีการควบคุมคุณภาพทุกชุดการทดสอบ (batch) ได้แก่ แบลงค์ (blank) การทำซ้ำ (duplicate) และการเติมสารละลายมาตรฐานในตัวอย่างเพื่อหา % recovery

- วิเคราะห์ Cd ในอาหารใช้วิธี AOAC 999.10⁽¹⁸⁾ หรือ In-house method based on AOAC 999.10 ซึ่งเป็นวิธีย่อยตัวอย่างด้วยเทคนิค microwave digestion วัดปริมาณ Cd ด้วย GF-AAS หรือ ICP-OES ประสิทธิภาพของวิธี ชีตจำกัดของการตรวจพบ (LOD) ตั้งแต่ 0.0002 - 0.012 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (mg/kg) และชีตจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) ตั้งแต่ 0.001 - 0.0625 mg/kg

- วิเคราะห์ Cd ในน้ำดื่มใช้วิธี APHA⁽¹⁹⁾ หรือ In-house method based on APHA ตรวจวัดปริมาณ Cd ด้วย GF-AAS หรือ ICP-OES ประสิทธิภาพของวิธี ชีตจำกัดของการตรวจพบ (LOD) ตั้งแต่ 0.0001 - 0.003 มิลลิกรัมต่อลิตร (mg/L) และชีตจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) ตั้งแต่ 0.0005 - 0.01 mg/L

การรายงานผล

- ค่าที่วิเคราะห์ได้ต่ำกว่า LOD จะรายงานไม่พบ
- ค่าที่วิเคราะห์ได้ต่ำกว่า LOQ จะรายงานค่า น้อยกว่า LOQ
- ค่าที่วิเคราะห์ได้เท่ากับและสูงกว่า LOQ จะรายงานค่าที่ตรวจพบ

เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้มีห้องปฏิบัติการทำหน้าที่ตรวจวิเคราะห์หลายแห่งโดยวิธีที่มีค่า Performance Characteristic ที่สำคัญต่างกัน คือ ค่า LOD และ LOQ จึงใช้แนวทางการคำนวณโดยใช้ข้อมูล 3 ค่า ได้แก่

- ค่าต่ำ (lower bound) คือ ผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีค่าต่ำกว่า LOD และ ค่าต่ำกว่า LOQ จะแทนค่าด้วย “0”

- ค่ากลาง (middle bound) คือ ผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีค่าต่ำกว่า LOD แทนค่าด้วย “1/2 LOD” หรือ ค่าต่ำกว่า LOQ แทนค่าด้วย “1/2 LOQ”

- ค่าสูงสุด (upper bound) คือ ผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีค่าต่ำกว่า LOD แทนค่าด้วย “LOD” หรือ ค่าต่ำกว่า LOQ แทนค่าด้วย “LOQ”

ทั้งนี้เพื่อให้ได้ข้อมูลที่นำมาประเมินการได้รับสัมผัสที่ครอบคลุมค่า LOD และ LOQ ที่แตกต่างกัน

ส่วนที่ 3 ศึกษาปริมาณการได้รับสัมผัส Cd จากอาหารและน้ำดื่มที่บริโภคประจำวัน ปริมาณการได้รับสัมผัส (exposure) จากอาหารและน้ำดื่มที่บริโภคประจำวันของคนในแต่ละครั้วเรือน คำนวณได้จากสูตร

$$\text{exposure} = C \times fc$$

exposure = ปริมาณการได้รับสัมผัส Cd จากการบริโภคอาหารหรือน้ำดื่มของคนในแต่ละครั้วเรือน หน่วย ไมโครกรัมต่อคนต่อวัน ($\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$)

C = ปริมาณการปนเปื้อน Cd ในอาหารเฉลี่ย 4 วันหรือน้ำดื่มในแต่ละครัวเรือน หน่วย มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (mg/kg) หรือมิลลิกรัมต่อลิตร (mg/L) โดยคำนวณทั้ง 3 แบบ (lower bound, middle bound และ upper bound)

fc = ปริมาณการบริโภคอาหารหรือน้ำดื่มเฉลี่ย 4 วัน ในแต่ละครัวเรือน หน่วย กรัมต่อคนต่อวัน (g/person/day) หรือมิลลิลิตรต่อคนต่อวัน (mL/person/day)

คำนวณการได้รับสัมผัสเฉลี่ยที่ 3 ระดับ คือ ต่ำ กลาง และสูง ได้จากปริมาณ Cd เฉลี่ย ตามที่คำนวณทั้ง 3 แบบ (lower bound, middle bound และ upper bound) และการบริโภคเฉลี่ย ซึ่งมีแหล่งการได้รับสัมผัส 2 แหล่ง คือ อาหารและน้ำดื่ม แล้วรวมปริมาณการได้รับสัมผัส Cd ของทั้ง 2 แหล่ง หน่วย $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$ แล้วนำมาหารด้วยน้ำหนักตัวเฉลี่ยของประชากรไทยซึ่งเท่ากับ 58 กิโลกรัม (น้ำหนักตัวเฉลี่ยตั้งอายุ 3 ปีขึ้นไป)⁽²⁰⁾ จะได้การได้รับสัมผัส Cd ในหน่วยไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน ($\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{day}$) จากนั้นคูณด้วย 30 วัน จะได้การได้รับสัมผัส Cd ในหน่วย $\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{month}$

2. การอธิบายลักษณะความเสี่ยง (Risk Characterization) เป็นแบบเชิงกำหนด (deterministic) นำผลที่ได้จากการประเมินการได้รับสัมผัส (exposure) ของ Cd จากอาหารและน้ำดื่มที่บริโภคประจำวัน เปรียบเทียบกับค่าความปลอดภัยของสารเคมีต่อสุขภาพมนุษย์ (Health-Based Guidance Value, HBGV) ซึ่ง JECFA ได้ประเมินความปลอดภัยของ Cd และกำหนดค่าความปลอดภัยเป็นค่า Provisional tolerable monthly intake (PTMI) เท่ากับ $25 \mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{month}$ ซึ่งคำนวณได้ดังนี้

$$\text{risk (\% of PTMI)} = (\text{exposure}/\text{PTMI}) \times 100$$

ถ้า risk น้อยกว่าหรือเท่ากับ 100% ของ PTMI แสดงว่าปริมาณ Cd ที่ได้รับไม่สามารถทำให้เกิดผลเสียต่อร่างกายได้

ถ้า risk มากกว่า 100% ของ PTMI แสดงว่าปริมาณ Cd ที่ได้รับสามารถทำให้เกิดผลเสียต่อร่างกายได้

ผล

1. การประเมินการได้รับสัมผัส (Exposure assessment)

ส่วนที่ 1 ปริมาณการบริโภคอาหารและน้ำดื่ม

ปริมาณการบริโภคได้จากบันทึกปริมาณการบริโภคจริงตลอดวันของสมาชิกที่ร่วมโครงการ ทั้งหมด 4 ภาค คือ กลางเหนือ ตะวันออกเฉียงเหนือ และใต้ ภาคละ 100 ครัวเรือน รวมทั้งหมด 400 ครัวเรือน รวมจำนวนประชากรที่ศึกษา 1,241 คน ระยะเวลาศึกษา 4 วัน มีผลการศึกษาดังนี้

ปริมาณการบริโภคอาหารและน้ำดื่มของคนไทยทั่วประเทศ พบปริมาณการบริโภคอาหารเฉลี่ยเท่ากับ 1,506 กรัมต่อคนต่อวัน และที่ 97.5 เปอร์เซ็นไทล์ เท่ากับ 2,534 กรัมต่อคนต่อวัน และปริมาณบริโภคน้ำดื่มเฉลี่ยเท่ากับ 1,832 มิลลิลิตรต่อคนต่อวัน และที่ 97.5 เปอร์เซ็นไทล์ เท่ากับ 3,601 มิลลิลิตรต่อคนต่อวัน (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ปริมาณการบริโภคอาหารและน้ำดื่มของคนไทยจากการสำรวจ

ภาค	จำนวน ครัวเรือน	ปริมาณการบริโภคอาหาร* (กรัมต่อคนต่อวัน)			ปริมาณการบริโภคน้ำดื่ม* (มิลลิลิตรต่อคนต่อวัน)		
		ค่าเฉลี่ย	SD	97.5 th	ค่าเฉลี่ย	SD	97.5 th
เขตเมือง							
กลาง	50	1569	390	2381	2051	906	3546
เหนือ	50	1419	330	1994	1656	575	2977
ตะวันออกเฉียงเหนือ	50	1606	463	2661	2210	992	3753
ใต้	50	1355	448	2474	1330	561	2894
ทั่วประเทศ (เขตเมือง)	200	1487	421	2504	1812	850	3434
เขตชนบท							
กลาง	50	1430	311	2021	1963	533	3257
เหนือ	50	1529	541	2918	1701	495	2903
ตะวันออกเฉียงเหนือ	50	1710	430	2578	2247	843	3953
ใต้	50	1435	418	2082	1496	466	2611
ทั่วประเทศ (เขตชนบท)	200	1526	444	2547	1852	662	3622
รวมเขตเมืองและชนบท							
กลาง	100	1499	358	2232	2007	741	3507
เหนือ	100	1474	449	2295	1678	534	2978
ตะวันออกเฉียงเหนือ	100	1658	448	2597	2229	916	3936
ใต้	100	1395	433	2408	1413	520	2766
ทั่วประเทศรวม (เขตเมืองและชนบท)	400	1506	433	2534	1832	761	3601

หมายเหตุ *ปริมาณการบริโภคอาหารและน้ำดื่มของแต่ละครัวเรือนได้มาจากค่าเฉลี่ยของปริมาณการบริโภค 4 วัน

เมื่อพิจารณาเป็นรายเขต พบปริมาณการบริโภคทั้งอาหารและน้ำดื่มของเขตชนบทสูงกว่าเขตเมือง ปริมาณบริโภคอาหารเฉลี่ยเท่ากับ 1526 และ 1487 กรัมต่อคนต่อวัน ตามลำดับ และที่ 97.5 เพอร์เซ็นต์ไทล์ เท่ากับ 2547 และ 2504 กรัมต่อคนต่อวัน ตามลำดับ ปริมาณบริโภคน้ำดื่มเฉลี่ยเท่ากับ 1852 และ 1812 มิลลิลิตรต่อคนต่อวัน ตามลำดับ และที่ 97.5 เพอร์เซ็นต์ไทล์ เท่ากับ 3622 และ 3434 มิลลิลิตรต่อคนต่อวัน ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

เมื่อพิจารณาการบริโภคอาหารเฉลี่ยเป็นรายภาค (เขตเมืองและเขตชนบท) พบว่าปริมาณการบริโภคเฉลี่ยสูงสุดคือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รองลงมาคือ ภาคกลาง เหนือ และใต้ เท่ากับ 1658, 1499, 1474 และ 1395 กรัมต่อคนต่อวัน ตามลำดับ และที่ 97.5 เพอร์เซ็นต์ไทล์ สูงสุดคือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รองลงมาคือ ภาคใต้ เหนือ และกลาง เท่ากับ 2597, 2408, 2295 และ 2232 กรัมต่อคนต่อวัน ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

เมื่อพิจารณาการบริโภคน้ำดื่มเฉลี่ยเป็นรายภาค (เขตเมืองและเขตชนบท) พบว่าปริมาณการบริโภคเฉลี่ยสูงสุด คือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รองลงมาคือ ภาคกลาง เหนือ และใต้ เท่ากับ 2229, 2007, 1678 และ

1413 มิลลิลิตรต่อคนต่อวัน ตามลำดับ และที่ 97.5 เปอร์เซ็นต์สูงสุด คือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รองลงมาคือ ภาคกลางเหนือ และใต้ เท่ากับ 3936, 3507, 2978 และ 2766 มิลลิลิตรต่อคนต่อวัน ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ส่วนที่ 2 ปริมาณการปนเปื้อนของ Cd ในอาหารและน้ำดื่ม

ปริมาณการปนเปื้อน Cd ได้จากตัวอย่างอาหารและน้ำดื่มที่เก็บจากการบริโภคจริงของครัวเรือนที่ร่วมโครงการจำนวน 400 ครัวเรือน ระยะเวลาศึกษา 4 วัน รวมตัวอย่างอาหารทั้งสิ้น 1,600 ตัวอย่าง และน้ำดื่ม 400 ตัวอย่าง ผลการตรวจวิเคราะห์ดังนี้

ผลวิเคราะห์ปริมาณ Cd ในอาหารเฉลี่ย 4 วันของแต่ละครัวเรือน จำนวน 400 ครัวเรือน พบว่าทั่วประเทศ ไม่พบ Cd ในอาหาร จำนวน 72 ครัวเรือน คิดเป็นร้อยละ 18 ปริมาณ Cd เฉลี่ยที่ lower bound, middle bound และ upper bound เท่ากับ 0.005, 0.009 และ 0.012 mg/kg ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

เมื่อพิจารณาปริมาณ Cd ในอาหารเป็นรายเขต พบว่าเขตเมืองไม่พบ Cd จำนวน 54 ครัวเรือน คิดเป็นร้อยละ 27 และเขตชนบทไม่พบ Cd จำนวน 18 ครัวเรือน คิดเป็นร้อยละ 9 พบ Cd ในอาหารเขตชนบทสูงกว่าเขตเมือง ปริมาณ Cd เฉลี่ยที่ lower bound, middle bound และ upper bound เขตเมืองเท่ากับ 0.004, 0.008 และ 0.011 mg/kg ตามลำดับ และเขตชนบทเท่ากับ 0.006, 0.010 และ 0.013 mg/kg ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

เมื่อพิจารณาปริมาณ Cd ในอาหารเป็นรายภาค (เขตเมืองและเขตชนบท) พบว่าภาคกลางและภาคเหนือ ตรวจพบ Cd ในอาหารทุกครัวเรือน ภาคตะวันออกเฉียงเหนือไม่พบ Cd ในอาหาร จำนวน 44 ครัวเรือน คิดเป็นร้อยละ 44 และภาคใต้ไม่พบ Cd ในอาหารจำนวน 28 ครัวเรือน คิดเป็นร้อยละ 28 ปริมาณ Cd เฉลี่ยที่ lower bound, middle bound และ upper bound ภาคกลางจะมีค่าเท่ากันทั้งหมดเท่ากับ 0.009 mg/kg ภาคเหนือเท่ากับ 0.007, 0.010 และ 0.013 mg/kg ตามลำดับ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเท่ากับ 0.003, 0.004 และ 0.005 mg/kg ตามลำดับ และภาคใต้เท่ากับ 0.003, 0.012 และ 0.021 mg/kg ตามลำดับ พบปริมาณ Cd ในอาหารเฉลี่ยที่ middle bound สูงสุดคือ ภาคใต้ รองลงมาคือ ภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ผลวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อน Cd ในน้ำดื่มของครัวเรือน จาก 400 ครัวเรือน (จำนวน 400 ตัวอย่าง) พบว่าน้ำดื่มส่วนใหญ่ไม่พบ Cd หรือพบปริมาณต่ำมาก ทั้งประเทศตรวจไม่พบ Cd จำนวน 370 ครัวเรือน คิดเป็นร้อยละ 92.5 ปริมาณ Cd เฉลี่ยที่ lower bound, middle bound และ upper bound เท่ากับ 4×10^{-5} , 7×10^{-4} และ 0.001 mg/L ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

เมื่อพิจารณาปริมาณ Cd ในน้ำดื่มเป็นรายเขต พบว่าเขตเมืองตรวจไม่พบ Cd จำนวน 194 ครัวเรือน คิดเป็นร้อยละ 97.0 และเขตชนบทตรวจไม่พบ Cd จำนวน 176 ครัวเรือน คิดเป็นร้อยละ 88.0 ปริมาณ Cd เฉลี่ยที่ lower bound, middle bound และ upper bound เขตเมืองเท่ากับ ไม่พบ, 6×10^{-4} และ 0.001 mg/L ตามลำดับ และเขตชนบทเท่ากับ 7×10^{-5} , 7×10^{-4} และ 0.001 mg/L ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

เมื่อพิจารณาปริมาณ Cd ในน้ำดื่มเป็นรายภาค (เขตเมืองและเขตชนบท) พบว่าภาคกลางและเหนือ ตรวจไม่พบ Cd ทุกครัวเรือน ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตรวจไม่พบ Cd จำนวน 81 ครัวเรือน คิดเป็นร้อยละ 81.0 และภาคใต้ตรวจไม่พบ Cd จำนวน 89 ครัวเรือน คิดเป็นร้อยละ 89.0 ปริมาณ Cd เฉลี่ยที่ lower bound, middle bound และ upper bound ภาคกลางเท่ากับ ไม่พบ, 5×10^{-4} และ 0.001 mg/L ตามลำดับ ภาคเหนือเท่ากับ ไม่พบ, 0.002 และ 0.003 mg/L ตามลำดับ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเท่ากับ 8×10^{-5} , 6×10^{-4} และ 0.001 mg/L ตามลำดับ และภาคใต้เท่ากับ 6×10^{-5} , 1×10^{-4} และ 2×10^{-4} mg/L ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 3 ปริมาณการปนเปื้อนแคดเมียมในอาหาร

ภาค	ปริมาณแคดเมียมในอาหาร** (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)									
	จำนวนครัวเรือน		Lower bound***		Middle bound***		Upper bound***		ค่าเฉลี่ย	SD
	ทั้งหมด	ไม่พบ แคดเมียม*	Min-max	ค่าเฉลี่ย	Min-max	ค่าเฉลี่ย	Min-max	ค่าเฉลี่ย		
เขตเมือง										
กลาง	50	0	0.003-0.056	0.007	0.003-0.056	0.007	0.003-0.056	0.007	0.007	0.007
เหนือ	50	0	ไม่พบ-0.054	0.006	0.004-0.058	0.009	0.008-0.061	0.013	0.008	0.008
ตะวันออกเฉียงเหนือ	50	43	ไม่พบ-0.020	0.001	0.001-0.021	0.002	0.002-0.022	0.003	0.003	0.003
ใต้	50	11	ไม่พบ-0.050	0.002	0.002-0.056	0.012	0.004-0.625	0.022	0.013	0.013
ทั้งประเทศ (เขตเมือง)	200	54	ไม่พบ-0.056	0.004	0.001-0.058	0.008	0.002-0.625	0.011	0.011	0.011
เขตชนบท										
กลาง	50	0	0.003-0.155	0.010	0.003-0.155	0.010	0.003-0.155	0.010	0.022	0.022
เหนือ	50	0	ไม่พบ-0.055	0.008	0.004-0.055	0.011	0.008-0.055	0.014	0.009	0.009
ตะวันออกเฉียงเหนือ	50	1	ไม่พบ-0.035	0.005	0.001-0.036	0.007	0.002-0.036	0.008	0.007	0.007
ใต้	50	17	ไม่พบ-0.047	0.003	0.005-0.064	0.012	0.009-0.081	0.020	0.011	0.011
ทั้งประเทศ (เขตชนบท)	200	18	ไม่พบ-0.155	0.006	0.001-0.155	0.010	0.002-0.155	0.013	0.014	0.014
รวมเขตเมืองและชนบท										
กลาง	100	0	0.003-0.155	0.009	0.003-0.155	0.009	0.003-0.155	0.009	0.016	0.016
เหนือ	100	0	ไม่พบ-0.055	0.007	0.004-0.058	0.010	0.008-0.061	0.013	0.008	0.008
ตะวันออกเฉียงเหนือ	100	44	ไม่พบ-0.035	0.003	0.001-0.036	0.004	0.002-0.036	0.005	0.006	0.006
ใต้	100	28	ไม่พบ-0.050	0.003	0.002-0.064	0.012	0.004-0.081	0.021	0.012	0.012
ทั้งประเทศรวม (เขตเมืองและชนบท)	400	72	ไม่พบ-0.155	0.005	0.001-0.155	0.009	0.002-0.155	0.012	0.013	0.013

หมายเหตุ * ตรวจพบปริมาณแคดเมียมต่ำกว่า LOD

** ปริมาณแคดเมียมอาหารของแต่ละครัวเรือนได้มาจากค่าเฉลี่ย 4 วัน (คำนวณจากข้อมูลทั้งหมดทั้งที่พบและไม่พบ)

*** lower bound คือ ข้อมูลที่มีค่าต่ำกว่า LOD และ LOQ ใช้ค่าเท่ากับ “ 0”, middle bound คือ ข้อมูลที่มีค่าต่ำกว่า LOD หรือ LOQ ใช้ค่าเท่ากับ “1/2 LOD หรือ 1/2LOQ” upper bound คือ ข้อมูลที่มีค่าต่ำกว่า LOD หรือ LOQ ใช้ค่าเท่ากับ “LOD หรือ LOQ”

ภาคกลาง LOD = 0.0002 mg/kg และ LOQ = 0.001 mg/kg ภาคเหนือ LOD = 0.001 mg/kg และ LOQ = 0.01 mg/kg ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ LOD = 0.002 mg/kg และ LOQ = 0.01 mg/kg และภาคใต้ (2 หน่วยงาน) LOD = 0.004 mg/kg และ LOQ = 0.025 mg/kg, LOD = 0.012 mg/kg และ LOQ = 0.0625 mg/kg

ตารางที่ 4 ปริมาณการปนเปื้อนแคดเมียมในน้ำดื่ม

ภาค	ปริมาณแคดเมียมในน้ำดื่ม (มิลลิกรัมต่อลิตร)									
	จำนวนครัวเรือน		Lower bound**				Middle bound***			
	ทั้งหมด	แคดเมียม*	Min-max	ค่าเฉลี่ย	SD	Min-max	ค่าเฉลี่ย	SD	Min-max	Upper bound***
เขตเมือง										
กลาง	50	50	ไม่พบ	ไม่พบ	-	5×10 ⁻⁴	5×10 ⁻⁴	-	0.001	0.001
เหนือ	50	50	ไม่พบ	ไม่พบ	-	0.002	0.002	-	0.003	0.003
ตะวันออกเฉียงเหนือ	50	48	ไม่พบ	ไม่พบ	-	5×10 ⁻⁴ -0.001	5×10 ⁻⁴	1×10 ⁻⁴	0.001-0.002	0.001
ใต้	50	46	ไม่พบ	ไม่พบ	-	5×10 ⁻⁵ -5×10 ⁻⁴	8×10 ⁻⁵	1×10 ⁻⁴	1×10 ⁻⁴ -0.001	2×10 ⁻⁴
ทั่วประเทศ (เขตเมือง)	200	194	ไม่พบ	ไม่พบ	-	5×10 ⁻⁵ -0.001	6×10 ⁻⁴	5×10 ⁻⁴	1×10 ⁻⁴ -0.003	0.001
เขตชนบท										
กลาง	50	50	ไม่พบ	ไม่พบ	-	5×10 ⁻⁴	5×10 ⁻⁴	-	0.001	0.001
เหนือ	50	50	ไม่พบ	ไม่พบ	-	0.002	0.002	-	0.003	0.003
ตะวันออกเฉียงเหนือ	50	33	ไม่พบ-0.002	2×10 ⁻⁴	5×10 ⁻⁴	5×10 ⁻⁴ -0.002	8×10 ⁻⁴	4×10 ⁻⁴	0.001-0.002	0.001
ใต้	50	43	ไม่พบ-0.002	1×10 ⁻⁴	5×10 ⁻⁴	5×10 ⁻⁵ -0.002	7×10 ⁻⁴	6×10 ⁻⁴	1×10 ⁻⁴ -0.002	2×10 ⁻⁴
ทั่วประเทศ (เขตชนบท)	200	176	ไม่พบ-0.002	7×10 ⁻⁵	4×10 ⁻⁴	5×10 ⁻⁵ -0.002	7×10 ⁻⁴	6×10 ⁻⁴	1×10 ⁻⁴ -0.003	0.001
รวมเขตเมืองและชนบท										
กลาง	100	100	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	5×10 ⁻⁴	5×10 ⁻⁴	-	0.001	0.001
เหนือ	100	100	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	0.002	0.002	-	0.003	0.003
ตะวันออกเฉียงเหนือ	100	81	ไม่พบ-0.002	8×10 ⁻⁵	4×10 ⁻⁴	5×10 ⁻⁴ -0.002	6×10 ⁻⁴	3×10 ⁻⁴	0.001-0.002	0.001
ใต้	100	89	ไม่พบ-0.002	6×10 ⁻⁵	3×10 ⁻⁴	5×10 ⁻⁵ -0.002	1×10 ⁻⁴	3×10 ⁻⁴	1×10 ⁻⁴ -0.002	2×10 ⁻⁴
ทั่วประเทศรวม (เขตเมืองและชนบท)	400	370	ไม่พบ-0.002	4×10 ⁻⁵	3×10 ⁻⁴	5×10 ⁻⁵ -0.002	7×10 ⁻⁴	6×10 ⁻⁴	1×10 ⁻⁴ -0.003	0.001

หมายเหตุ * ตรวจพบปริมาณแคดเมียมต่ำกว่า LOD

** lower bound คือ ข้อมูลที่มีค่าต่ำกว่า LOD และ LOQ ใช้ค่าเท่ากับ “0” middle bound คือ ข้อมูลที่มีค่าต่ำกว่า LOD หรือ LOQ ใช้ค่าเท่ากับ “1/2 LOD หรือ 1/2 LOQ” upper bound คือ ข้อมูลที่มีค่าต่ำกว่า LOD หรือ LOQ ใช้ค่าเท่ากับ “LOD หรือ LOQ” (คำนวณจากข้อมูลทั้งหมดทั้งที่พบและไม่พบ)

ภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ LOD = 0.001 mg/L และ LOQ = 0.002 mg/L ภาคเหนือ LOD = 0.003 mg/L และ LOQ = 0.01 mg/L และภาคใต้ (2 หน่วยงาน) LOD = 0.0001 mg/L และ LOQ = 0.001 mg/L, LOD = 0.0001 mg/L และ LOQ = 0.0005 mg/L

ส่วนที่ 3 ปริมาณการได้รับสัมผัส Cd จากอาหารและน้ำดื่มที่บริโภคประจำวัน

ผลการศึกษาปริมาณการได้รับสัมผัส Cd จากอาหารของคนไทย มีค่าเฉลี่ยที่ lower bound, middle bound และ upper bound ทั้งประเทศเท่ากับ 7.8, 12.8 และ 17.9 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$ ตามลำดับ เขตเมืองเท่ากับ 5.7, 10.7 และ 15.8 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$ ตามลำดับ และเขตชนบทเท่ากับ 9.9, 15.0 และ 20.0 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$ ตามลำดับ การได้รับสัมผัส Cd จากอาหารเฉลี่ยเขตชนบทสูงกว่าเขตเมือง (ตารางที่ 5)

เมื่อพิจารณาการได้รับสัมผัส Cd จากอาหารเป็นรายภาค (เขตเมืองและเขตชนบท) มีค่าเฉลี่ยที่ lower bound, middle bound และ upper bound ภาคกลางมีค่าเท่ากันทั้งหมดเท่ากับ 11.9 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$ ภาคเหนือเท่ากับ 9.9, 14.9 และ 19.9 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$ ตามลำดับ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเท่ากับ 5.5, 7.4 และ 9.4 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$ ตามลำดับ และภาคใต้เท่ากับ 3.8, 17.2 และ 30.5 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$ ตามลำดับ การได้รับสัมผัส Cd จากการบริโภคอาหารเฉลี่ยที่ middle bound พบสูงสุด คือ ภาคใต้ รองลงมาคือ ภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

ผลการศึกษาปริมาณการได้รับสัมผัส Cd จากน้ำดื่มของคนไทย มีค่าเฉลี่ยที่ lower bound, middle bound และ upper bound ทั้งประเทศเท่ากับ 0.1, 1.3 และ 2.5 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$ ตามลำดับ เขตเมืองเท่ากับ ไม่พบ, 1.2 และ 2.4 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$ ตามลำดับ และเขตชนบทเท่ากับ 0.2, 1.4 และ 2.6 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$ ตามลำดับ การได้รับสัมผัส Cd เฉลี่ยจากน้ำดื่มเขตชนบทสูงกว่าเขตเมืองเล็กน้อย (ตารางที่ 5)

เมื่อพิจารณาได้รับสัมผัส Cd จากน้ำดื่มเป็นรายภาค (เขตเมืองและเขตชนบท) มีค่าเฉลี่ยที่ lower bound, middle bound และ upper bound ภาคกลางเท่ากับ ไม่พบ, 1.0 และ 2.0 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$ ภาคเหนือเท่ากับ ไม่พบ, 2.5 และ 5.0 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$ ตามลำดับ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเท่ากับ 0.2, 1.4 และ 2.7 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$ ตามลำดับ และภาคใต้เท่ากับ 0.1, 0.2 และ 0.3 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$ ตามลำดับ การได้รับสัมผัส Cd เฉลี่ยจากน้ำดื่มที่ middle bound พบสูงสุด คือ ภาคเหนือ รองลงมาคือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

การได้รับสัมผัส Cd จากการบริโภคประจำวันโดยรวมปริมาณการได้รับสัมผัส Cd 2 แหล่ง คือจากการบริโภคอาหารและน้ำดื่ม พบว่าคนไทยได้รับสัมผัสเฉลี่ยที่ lower bound, middle bound และ upper bound ทั้งประเทศเท่ากับ 7.9, 14.1 และ 20.4 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$ ตามลำดับ เขตเมืองเท่ากับ 5.7, 11.9 และ 18.2 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$ ตามลำดับ และเขตชนบทเท่ากับ 10.1, 16.4 และ 22.6 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$ ตามลำดับ การได้รับสัมผัส Cd เฉลี่ยจากอาหารและน้ำดื่มเขตชนบทสูงกว่าเขตเมือง (ตารางที่ 5)

เมื่อพิจารณาการได้รับสัมผัส Cd จากอาหารและน้ำดื่มที่บริโภคประจำวันเป็นรายภาค (เขตเมืองและชนบท) พบว่าคนไทยได้รับสัมผัสเฉลี่ยที่ lower bound, middle bound และ upper bound ภาคกลางเท่ากับ 11.9, 12.9 และ 13.9 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$ ตามลำดับ ภาคเหนือเท่ากับ 9.9, 17.4 และ 24.9 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$ ตามลำดับ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเท่ากับ 5.7, 8.8 และ 12.1 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$ ตามลำดับ และภาคใต้เท่ากับ 3.9, 17.4 และ 30.8 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$ ตามลำดับ การได้รับสัมผัส Cd เฉลี่ยจากอาหารและน้ำดื่มที่ middle bound พบสูงสุด คือ ภาคเหนือและภาคใต้ รองลงมาคือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ปริมาณการได้รับสัมผัสแคดเมียมจากการบริโภคอาหารและน้ำดื่มของคนไทย

ภาค	ปริมาณการได้รับสัมผัสแคดเมียมเฉลี่ย ($\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$)									
	อาหาร					น้ำดื่ม				
	Lower bound	Middle bound	Upper bound	Lower bound	Upper bound	Lower bound	Middle bound	Upper bound	Lower bound	Middle bound
เขตเมือง										
กลาง	10.2	10.2	10.2	0	1.0	2.1	10.2	11.2	12.3	
เหนือ	8.2	13.3	18.4	0	2.5	5.0	8.2	15.8	23.4	
ตะวันออกเฉียงเหนือ	1.0	2.6	4.1	0	1.2	2.3	1.0	3.8	6.4	
ใต้	3.2	16.9	30.5	0	0.1	0.2	3.2	17.0	30.7	
ทั่วประเทศ (เขตเมือง)	5.7	10.7	15.8	0	1.2	2.4	5.7	11.9	18.2	
เขตชนบท										
กลาง	13.5	13.5	13.5	0	1.0	2.0	13.5	14.5	15.5	
เหนือ	11.6	16.5	21.5	0	2.6	5.1	11.6	19.1	26.6	
ตะวันออกเฉียงเหนือ	10.0	12.3	14.6	0.4	1.7	3.1	10.4	14.0	17.7	
ใต้	4.4	17.4	30.5	0.2	0.3	0.4	4.6	17.7	30.9	
ทั่วประเทศ (เขตชนบท)	9.9	15.0	20.0	0.2	1.4	2.6	10.1	16.4	22.6	
รวมเขตเมืองและชนบท										
กลาง	11.9	11.9	11.9	0	1.0	2.0	11.9	12.9	13.9	
เหนือ	9.9	14.9	19.9	0	2.5	5.0	9.9	17.4	24.9	
ตะวันออกเฉียงเหนือ	5.5	7.4	9.4	0.2	1.4	2.7	5.7	8.8	12.1	
ใต้	3.8	17.2	30.5	0.1	0.2	0.3	3.9	17.4	30.8	
ทั่วประเทศรวม (เขตเมืองและชนบท)	7.8	12.8	17.9	0.1	1.3	2.5	7.9	14.1	20.4	

ตารางที่ 6 ปริมาณการได้รับสัมผัสแคดเมียมจากการบริโภคประจำวันของคนไทยและร้อยละของ PTMI

ภาค	Lower bound (อาหารและน้ำดื่ม)			Middle bound (อาหารและน้ำดื่ม)			Upper bound (อาหารและน้ำดื่ม)		
	ปริมาณได้รับสัมผัส เฉลี่ยต่อวัน* ($\mu\text{g/kg bw/day}$)	ปริมาณได้รับสัมผัส เฉลี่ยต่อเดือน** ($\mu\text{g/kg bw/month}$)	ร้อยละ ของ PTMI	ปริมาณได้รับสัมผัส เฉลี่ยต่อวัน* ($\mu\text{g/kg bw/day}$)	ปริมาณได้รับสัมผัส เฉลี่ยต่อเดือน** ($\mu\text{g/kg bw/month}$)	ร้อยละ ของ PTMI	ปริมาณได้รับสัมผัส เฉลี่ยต่อวัน* ($\mu\text{g/kg bw/day}$)	ปริมาณได้รับสัมผัส เฉลี่ยต่อเดือน** ($\mu\text{g/kg bw/month}$)	ร้อยละ ของ PTMI
เขตเมือง									
กลาง	0.18	5.28	21	0.19	5.79	23	0.21	6.36	25
เหนือ	0.14	4.24	17	0.27	8.17	33	0.40	12.10	48
ตะวันออกเฉียงเหนือ	0.02	0.52	2	0.07	1.97	8	0.11	3.31	13
ใต้	0.06	1.66	7	0.29	8.79	35	0.53	15.88	64
ทั้งประเทศ (เขตเมือง)	0.10	2.95	12	0.21	6.16	25	0.31	9.41	38
เขตชนบท									
กลาง	0.23	6.98	28	0.25	7.50	30	0.27	8.02	32
เหนือ	0.20	6.00	24	0.33	9.88	40	0.46	13.76	55
ตะวันออกเฉียงเหนือ	0.18	5.38	22	0.24	7.24	29	0.31	9.16	37
ใต้	0.08	2.38	10	0.31	9.16	37	0.53	15.98	64
ทั้งประเทศ (เขตชนบท)	0.17	5.22	21	0.28	8.48	34	0.39	11.69	47
รวมเขตเมืองและชนบท									
กลาง	0.21	6.16	25	0.22	6.67	27	0.24	7.19	29
เหนือ	0.17	5.12	20	0.30	9.00	36	0.43	12.88	52
ตะวันออกเฉียงเหนือ	0.10	2.95	12	0.15	4.55	18	0.21	6.26	25
ใต้	0.07	2.02	8	0.30	9.00	36	0.53	15.93	64
ทั้งประเทศรวม (เขตเมืองและชนบท)	0.14	4.09	16	0.24	7.29	29	0.35	10.55	42

หมายเหตุ * ปริมาณการได้รับสัมผัสเฉลี่ยต่อวัน หน่วย $\mu\text{g/kg bw/day}$ คำนวณจากปริมาณการได้รับสัมผัสเฉลี่ยต่อวัน หน่วย $\mu\text{g/person/day}$ หารด้วยน้ำหนักตัวเฉลี่ยคนไทย 58 กิโลกรัม** ปริมาณการได้รับสัมผัสเฉลี่ยต่อเดือน หน่วย $\mu\text{g/kg bw/month}$ คำนวณจากปริมาณการได้รับสัมผัสเฉลี่ยต่อวัน หน่วย $\mu\text{g/kg bw/day}$ คูณด้วย 30 วัน

2. การอธิบายลักษณะความเสี่ยง (Risk Characterization) แบบเชิงกำหนด (deterministic)

คนไทยได้รับสัมผัส Cd จากการบริโภคประจำวัน (อาหารและน้ำดื่ม) ค่าเฉลี่ยที่ lower bound, middle bound และ upper bound ทั้งประเทศเท่ากับ 0.14, 0.24 และ 0.35 $\mu\text{g/kg bw/day}$ ตามลำดับ หรือ 4.09, 7.29 และ 10.55 $\mu\text{g/kg bw/month}$ ตามลำดับ และคิดเป็นร้อยละของ PTMI เท่ากับ 16, 29 และ 42 ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

การได้รับสัมผัส Cd จากการบริโภคประจำวันของคนไทยเป็นรายเขต พบค่าเฉลี่ยที่ lower bound, middle bound และ upper bound เขตเมืองเท่ากับ 0.10, 0.21 และ 0.31 $\mu\text{g/kg bw/day}$ ตามลำดับ หรือ 2.95, 6.16 และ 9.41 $\mu\text{g/kg bw/month}$ ตามลำดับ และคิดเป็นร้อยละของ PTMI เท่ากับ 12, 25 และ 38 ตามลำดับ เขตชนบทเท่ากับ 0.17, 0.28 และ 0.39 $\mu\text{g/kg bw/day}$ ตามลำดับ หรือ 5.22, 8.48 และ 11.69 $\mu\text{g/kg bw/month}$ ตามลำดับ และคิดเป็นร้อยละของ PTMI เท่ากับ 21, 34 และ 47 ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

การได้รับสัมผัส Cd จากการบริโภคประจำวันของคนไทยเป็นรายภาค (เขตเมืองและชนบท) พบค่าเฉลี่ยที่ lower bound, middle bound และ upper bound ภาคกลางเท่ากับ 0.21, 0.22 และ 0.24 $\mu\text{g/kg bw/day}$ ตามลำดับ หรือ 6.16, 6.67 และ 7.19 $\mu\text{g/kg bw/month}$ ตามลำดับ และคิดเป็นร้อยละของ PTMI เท่ากับ 25, 27 และ 29 ตามลำดับ ภาคเหนือเท่ากับ 0.17, 0.30 และ 0.43 $\mu\text{g/kg bw/day}$ ตามลำดับ หรือ 5.12, 9.00 และ 12.88 $\mu\text{g/kg bw/month}$ ตามลำดับ และคิดเป็นร้อยละของ PTMI เท่ากับ 20, 36 และ 52 ตามลำดับ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเท่ากับ 0.10, 0.15 และ 0.21 $\mu\text{g/kg bw/day}$ ตามลำดับ หรือ 2.95, 4.55 และ 6.26 $\mu\text{g/kg bw/month}$ ตามลำดับ และคิดเป็นร้อยละของ PTMI เท่ากับ 12, 18 และ 25 ตามลำดับ และภาคใต้เท่ากับ 0.07, 0.30 และ 0.53 $\mu\text{g/kg bw/day}$ ตามลำดับ หรือ 2.02, 9.00 และ 15.93 $\mu\text{g/kg bw/month}$ ตามลำดับ และคิดเป็นร้อยละของ PTMI เท่ากับ 8, 36 และ 64 ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

ซึ่งอธิบายลักษณะความเสี่ยงได้ว่า โดยภาพรวมแล้วคนไทยยังคงปลอดภัยจาก Cd ที่ได้รับจากการบริโภคประจำวัน เนื่องจากปริมาณการได้รับสัมผัส Cd ต่ำกว่าค่า PTMI ที่ JECFA กำหนดไว้

วิจารณ์

การสำรวจปริมาณการบริโภคด้วยวิธี duplicate portion นั้นนำหน้าอาหารที่สมาชิกบริโภคคำนวณจากหน้าหน้าอาหารก่อนและหลังการบริโภค จึงทำให้ได้ข้อมูลปริมาณการบริโภคที่จริง และปริมาณ Cd ในอาหารก็ได้จากการวิเคราะห์อาหารที่สมาชิกบริโภคจริงในแต่ละวัน ทำให้ปริมาณการได้รับสัมผัสที่คำนวณนั้นเป็นค่าการได้รับสัมผัสจริงของแต่ละครัวเรือน สำหรับระยะเวลาในการสำรวจ 4 วัน ซึ่งงานวิจัยนี้ลดจำนวนวันลงจากที่องค์การอนามัยโลก (WHO) แนะนำระยะเวลาในการศึกษาแบบ duplicate portion นั้น ควรไม่น้อยกว่า 7 วัน⁽¹⁷⁾ เนื่องจากโครงการนี้ต้องการศึกษาให้ครอบคลุมทั้ง 4 ภาคของประเทศ ด้วยงบประมาณที่จำกัด งานวิจัยนี้เป็นการบูรณาการร่วมกับศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ 7 แห่ง จึงได้มีการกำหนดแนวทางปฏิบัติงาน อบรม และฝึกปฏิบัติให้แก่เจ้าหน้าที่ก่อนปฏิบัติจริง โดยดำเนินการนำร่อง (pilot study) ที่จังหวัดนนทบุรี ในการเก็บข้อมูลการบริโภค การเก็บตัวอย่างอาหารและน้ำดื่ม เพื่อให้ทราบปัญหาและอุปสรรค และทำการแก้ไขให้ได้วิธีการที่เหมาะสมสอดคล้องและถูกต้องสำหรับนำไปปฏิบัติในแนวทางเดียวกัน นอกจากนี้ก่อนจะดำเนินการสำรวจทุกครั้งเจ้าหน้าที่จะต้องจัดการอบรมให้แก่สมาชิกครัวเรือนที่ร่วมโครงการ เพื่อให้บันทึกน้ำหนักบริโภคและเก็บตัวอย่างได้ถูกต้อง สำหรับวิธีวิเคราะห์ที่ใช้ในการหาปริมาณ Cd นั้นต้องสามารถตรวจวิเคราะห์ Cd ในระดับต่ำๆ เนื่องจากอาหารและน้ำดื่มส่วนใหญ่จะพบปริมาณต่ำ ยกเว้นแหล่งที่มีการปนเปื้อน Cd การศึกษานี้มีหลายหน่วยงานที่ร่วมตรวจวิเคราะห์ปริมาณ Cd ดังนั้นการประเมินปริมาณการได้รับสัมผัสอาจเกิดความคลาดเคลื่อนได้เนื่องจาก LOD และ LOQ ที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ได้คำนวณค่าปริมาณแคดเมียม 3 ระดับคือ ต่ำ (lower bound) กลาง (middle bound) และสูง (upper bound) ซึ่งสามารถครอบคลุมปริมาณการได้รับสัมผัสที่จะเกิดความคลาดเคลื่อนขึ้นเนื่องจาก LOD และ LOQ ที่แตกต่างกัน

จากการศึกษาได้รับสัมผัส Cd จากการบริโภคอาหารของประเทศต่างๆ เช่น ประเทศจีนที่ศึกษาการได้รับสัมผัสจากการบริโภคอาหารโดยใช้ 2 วิธีคือ dietary recall และ food duplicate diet ในผู้ใหญ่มีค่าเฉลี่ย เท่ากับ 0.21 และ 0.26 $\mu\text{g/kg bw/day}$ ตามลำดับ⁽²¹⁾ ประเทศเกาหลี ศึกษาการได้รับสัมผัสด้วยวิธี Total diet Study เท่ากับ 0.26 $\mu\text{g/kg bw/day}$ ⁽²²⁾ ประเทศฝรั่งเศส ศึกษาการได้รับสัมผัสด้วยวิธี Total diet Study ในผู้ใหญ่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.16 $\mu\text{g/kg bw/day}$ ⁽²³⁾ และประเทศสวีเดน การได้รับสัมผัส Cd ในผู้ใหญ่มีค่ามัธยฐาน เท่ากับ 0.93 $\mu\text{g/kg bw/week}$ หรือ 0.13 $\mu\text{g/kg bw/day}$ ⁽²⁴⁾ เมื่อเปรียบเทียบการได้รับสัมผัส Cd จากการบริโภคประจำวันของคนไทยในงานวิจัยนี้ ซึ่งปริมาณได้รับสัมผัส Cd จากการบริโภคประจำวันของคนไทยเฉลี่ยที่ middle bound เท่ากับ 0.24 $\mu\text{g/kg bw/day}$ พบว่าประเทศในแถบเอเชียจะได้รับสัมผัส Cd ไม่แตกต่างกัน แต่จะได้รับสัมผัส Cd สูงกว่าเมื่อเทียบกับประเทศแถบยุโรป และสำหรับข้อมูลในประเทศไทยที่ศึกษาการได้รับสัมผัสด้วยวิธี Total diet Study เมื่อ พ.ศ. 2542 - 2544 พบว่าปริมาณ Cd ที่ได้รับจากการบริโภคอาหารเท่ากับ 0.29, 0.13 และ 0.08 $\mu\text{g/kg bw/day}$ ⁽¹⁴⁾ (คิดที่น้ำหนักตัวเฉลี่ย 58 กิโลกรัม) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบปริมาณการได้สัมผัส Cd ที่ศึกษาด้วยวิธี duplicate portion ในครั้งนี้กับวิธี Total diet Study พบว่าปี พ.ศ. 2542 มีค่าใกล้เคียงกัน แต่เนื่องด้วยเป็นการศึกษาในช่วงเวลาที่แตกต่างกันจึงเปรียบเทียบทั้งสองวิธีการศึกษาไม่ได้ชัดเจน

จากการสำรวจปริมาณบริโภคเฉลี่ยแต่ละภาคของอาหารและน้ำดื่มมีค่าสูงสุดและต่ำสุดต่างกัน เท่ากับ 1.2 และ 1.6 เท่า ตามลำดับ และพบว่าปริมาณ Cd ที่พบในน้ำดื่มต่ำเมื่อเทียบกับอาหาร ที่ middle bound ค่าเฉลี่ยจะแตกต่างกันประมาณ 13 เท่า และที่ค่าสูงสุดจะแตกต่างกันประมาณ 78 เท่า ดังนั้นปริมาณการได้รับสัมผัส Cd จากการบริโภคประจำวันของคนไทยนั้นจึงขึ้นอยู่กับปริมาณ Cd ที่ปนเปื้อนในอาหารเป็นหลัก เนื่องจากปริมาณ Cd ที่พบในน้ำดื่มต่ำมากและปริมาณการบริโภคก็ไม่แตกต่างกันมาก

ภาพรวมคนไทยส่วนใหญ่มัคงปลอดภัยจาก Cd ที่ได้รับจากการบริโภคประจำวัน (อาหารและน้ำดื่ม) เนื่องจากปริมาณ Cd ที่ได้รับต่ำกว่าค่า PTMI ที่ JECFA กำหนดไว้ 25 $\mu\text{g/kg bw/month}$ จากการสำรวจ 400 ครั้วเรือน พบว่าปริมาณ Cd ในอาหารจะพบสูงเพียงบางครั้วเรือนและบางวันเท่านั้น ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้การได้รับสัมผัส Cd ของครั้วเรือนนั้นสูง และรายการอาหารที่ครั้วเรือนบริโภคในวันนั้นจะคล้ายกัน คือ มีอาหารทะเลในรายการอาหารที่บริโภค เช่น ปลาหมึก หอยแครง ปูทะเล และปลาทู นอกจากนั้นยังมีปลาดุกและเห็ด ซึ่งอาหารเหล่านี้เป็นแหล่งที่พบ Cd สูง⁽⁷⁻⁸⁾ นอกจากนี้กลุ่มคนงานที่ต้องสัมผัสกับ Cd และคนที่สูบบุหรี่มีโอกาสได้รับ Cd เพิ่มขึ้นอีกจากการหายใจและสัมผัสทางผิวหนัง ทั้งนี้ถ้าผู้บริโภคมีภาวะทางโภชนาการที่ดีไม่ขาดสารอาหารจำพวกวิตามินดี แคลเซียม สังกะสี ทองแดง และเหล็ก จะช่วยลดการดูดซึมและการสะสม Cd ในร่างกายได้

สรุป

จากการประเมินความเสี่ยงของ Cd จากการบริโภคประจำวันของคนไทยใช้วิธีการสำรวจปริมาณการบริโภคและเก็บตัวอย่างอาหารและน้ำดื่มจากครั้วเรือนแบบ duplicate portion ประชากรที่ศึกษาสุ่มจาก 4 ภาคของประเทศไทย รวม 400 ครั้วเรือน จำนวน 1,241 คน พบว่าคนไทยได้รับสัมผัส Cd เฉลี่ยที่ middle bound เท่ากับ 14.1 $\mu\text{g/person/day}$ หรือ 0.24 $\mu\text{g/kg bw/day}$ หรือ 7.29 $\mu\text{g/kg bw/month}$ (น้ำหนักประชากรเฉลี่ย 58 กิโลกรัม) เมื่อเปรียบเทียบกับค่าความปลอดภัยที่ JECFA กำหนด (PTMI 25 $\mu\text{g/kg bw/month}$) สรุปได้ว่าโดยภาพรวมแล้วคนไทยได้รับสัมผัส Cd จากการบริโภคประจำวันในระดับที่ปลอดภัย ปริมาณ Cd ที่คนไทยได้รับคิดเป็นร้อยละ 29 ของค่าความปลอดภัยที่ JECFA กำหนด และข้อมูลการประเมินความเสี่ยงนี้สามารถนำไปใช้ประกอบการพิจารณากำหนดมาตรฐานแคดเมียมในอาหารในประเทศ และพิจารณาปรับแก้มาตรฐานระหว่างประเทศให้เหมาะสมและปลอดภัย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ห้องปฏิบัติการอาหารของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 เชียงใหม่ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 5 สมุทรสงคราม ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 8 อุดรธานี ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 9 นครราชสีมา ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11 สุราษฎร์ธานี และศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง เจ้าหน้าที่ของเทศบาล องค์การบริหารส่วนตำบล และโรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบล ในพื้นที่ที่ดำเนินการสำรวจทั้ง 8 จังหวัด นางสาวพรรณทิพย์ ตียพันธ์ นายพิพัฒน์ นพคุณ นางสาวมยุรี อูรารุ่งโรจน์ นางกาญจนา พันธุ์เวช นายสมพร ทัญชีวะ และเจ้าหน้าที่ฝ่ายสารพิษสารปนเปื้อนและไดออกซินทุกท่าน ที่ให้ความร่วมมือในการดำเนินการศึกษาวิจัยครั้งนี้จนบรรลุผลสำเร็จด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Jarup L. Hazards of heavy metal contamination. Br Med Bull 2003; 68: 167-82.
2. European Food Safety Authority. Cadmium dietary exposure in the European population. EFSA Journal [online]. 2012 [cited 2016 Nov 15]; 10(1): [37 pp]. Available from: URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2012.2551/epdf>.
3. United Nations Environment Programme, Chemicals Branch, DTIE. Final review of scientific information on cadmium [online]. 2010 [cited 2016 Nov 15]. Available from: URL: http://drustage.unep.org/chemicalsandwaste/sites/unep.org.chemicalsandwaste/files/publications/GAELP_PUB_UNEP_GC26_INF_11_Add_2_Final_UNEP_Cadmium_review_and_appendix_Dec_2010.pdf.
4. IPCS INCHEM. Environmental health criteria 134, cadmium. Geneva: World Health Organization; 1992. [cited 2016 Sep 1]. Available from: URL: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc134.htm>.
5. European Food Safety Authority. Scientific opinion cadmium in food scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. The EFSA Journal [Internet]. 2009 [cited 2016 Sep 1]; 980: 1-139. Available from: URL: http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/980.pdf.
6. Godt J, Scheidig F, Grosse-Siestrup C, Esche V, Brandenburg P, Reich A, et al. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. J Occup Med Toxicol [online]. 2006 [cited 2016 August 11]; 1(22): [6 screens]. Available from: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1578573/pdf/1745-6673-1-22.pdf>.
7. Jarup L, Akesson A. Current status of cadmium as an environmental health problem. Toxicol Appl Pharmacol 2009; 238(3): 201-8.
8. World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Joint FAO/WHO food standards programme, Discussion paper on cadmium (CX/FAC 99/21). The Hague, Netherlands; 22-26 March 1999.
9. U.S. Department of Health and Human Services. Toxicological profile for cadmium. Atlanta, Georgia: Agency for Toxic Substance and Disease Registry; 2012.
10. Norwegian Scientific Committee for Food Safety. Risk assessment of dietary cadmium exposure in the Norwegian population. [online]. 2015 [cited 2016 Sep 1]; [101 screens]. Available from: URL: <http://www.vkm.no/dav/07cfa5d365.pdf>

11. Olsson IM, Bensryd I, Lundh T, Ottosson H, Skerfving S, Oskarsson A. Cadmium in blood and urine-impact of sex, age, dietary intake, iron status, and former smoking-association of renal effects. *Environ Health Perspect* 2002; 110(12): 1185-90.
12. International Agency for Research on Cancer WHO. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. [online]. [cited 2016 Sep 1]. Available from: URL: http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php
13. WHO. Evaluations of the joint FAO/WHO expert committee on food additives (JECFA), Cadmium. [online]. 2013 [cited 2016 Sep 1]; [1 screens]. Available from: URL: <http://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=1376>
14. มยุรี อูรารุ่งโรจน์, ประกาย บริบูรณ์, พนาวัลย์ กลิ่งกลางตอน. การศึกษาปริมาณโลหะเป็นพิษในอาหารที่คนไทยบริโภคต่อวัน ระหว่าง พ.ศ. 2542-2544. *ว กรมวิทย พ* 2548; 47(4): 234-47.
15. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 (พ.ศ. 2529) เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน. ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 103 ตอนที่ 23 ง ฉบับพิเศษ (วันที่ 16 กุมภาพันธ์ 2529)
16. World Health Organization. Application of risk analysis to food standard issue. Report of the joint FAO/WHO expert consultation. Geneva, Switzerland. 13-17 March 1995 [online]. [cited 2016 Sep 1]; [45 screens]. Available from: URL: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/58913/1/WHO_FNU_FOS_95.3.pdf
17. World Health Organization. Guideline for the study of dietary intake of chemical contaminants. Geneva: World Health Organization; 1985.
18. AOAC International. AOAC official method 999.10 lead, cadmium, zinc, copper and iron in foods. In: Horwitz W, Latimer GW, editors. Official method of analysis of AOAC international. 18th ed. Maryland: AOAC International; 2011. Chapter 9 p.16-19.
19. American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22nd ed. Maryland: American Public Health Association; 2012.
20. สำนักมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. ข้อมูลการบริโภคอาหารของประเทศไทย. [ออนไลน์]. 2559 [สืบค้น 1 ก.พ. 2560]. เข้าถึงได้จาก : URL: http://www.acfs.go.th/document/download_document/FCDT.pdf
21. Liu P, Wang CN, Song XY, Wu YN. Dietary intake of lead and cadmium by children and adults-result calculated from dietary recall and available lead/cadmium level in food in comparison to result from food duplicate diet method. *Int J Hyg Environ Health* 2010; 213(6): 450-7.
22. Lee HS, Cho YH, Park SO, Kye SH, Kim BH, Hahm TS, et al. Dietary exposure of the Korean population to arsenic, cadmium, lead and mercury. *J Food Comp Anal* 2006; 19: S31-7.
23. Arnich N, Sirot V, Riviere G, Jean J, Noel L, Guerin T, et al. Dietary exposure to trace elements and health risk assessment in the 2nd French total diet study. *Food Chem Toxicol* 2012; 50(7): 2432-49.
24. Sand S, Becker W. Assessment of dietary cadmium exposure in Sweden and population health concern including scenario analysis. *Food Chem Toxicol* 2012; 50(3-4): 536-44.

Risk Assessment of Dietary Exposure to Cadmium in the Thai Population

Panawan Kluengklangdon* Laddawan Rojanapantip* Kannika Jittiyossara*
Nontarat Pornsapmanee** Pinnaree Chinwattanawong*** and Khemikar Hemloha****

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

** Regional Medical Sciences Center 12/1 Trang, Amphoe Muang, Trang 92000

*** Regional Medical Sciences Center 1 Chiang Mai, Amphoe Maerim, Chiang Mai 50180

**** Regional Medical Sciences Center 11 Surat Thani, Amphoe Muang, Surat Thani 84100, Thailand.

ABSTRACT Cadmium (Cd) is often found in almost foods and its contamination level depends on the type of food and the contamination in environment. Food consumption is the main source of cadmium intake for people who do not smoke or work in contaminated areas. The cadmium has been classified as a human carcinogen. In 2010, the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) established a provisional tolerable monthly intake (PTMI) on cadmium exposure of 25 µg/kg body weight/month. This research had been carried out during 2011 – 2013 and aimed at assessing the risk of cadmium exposure via food consumption among Thai population. The current results obtained can be served as a supportive data for establishing Thai regulations as well as supporting improvement of the international standards. In the step of exposure assessment of Cd by duplicate portion method, the food consumption data, sample of food and water were collected from 400 households in four regions of Thailand for a period of 4 days. The total number of 1,241 people, 1,600 samples of food and 400 samples of water were analyzed in this study. The Cd concentration was quantified by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometer and Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer. The results showed that the middle bound mean levels of cadmium found in food and water samples were 0.009 mg/kg and 7×10^{-4} mg/L respectively and the mean intakes of food and water were 1,506 g/person/day and 1,832 mL/person/day, respectively. The middle bound mean dietary exposure across Thai consumers was 7.29 µg/kg body weight/month (average body weight of 58 kg) which was equal to 29% of the PTMI value. In conclusion, Thai consumers are still safe from cadmium exposure through food consumption.

Keywords: risk assessment of cadmium, dietary exposure

สายพันธุ์ของไวรัสเดงกีในเขตสุขภาพที่ 2 ระหว่าง ปี พ.ศ. 2555 ถึง พ.ศ. 2559

ชวลิต เกียรติวิษณุกุล วชิรินทร์ ศรีสกุล และจิราพร ศรีสกุล

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 2 พิษณุโลก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อำเภอเมือง พิษณุโลก 65000

บทคัดย่อ โรคติดเชื้อไวรัสเดงกีเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย ที่จำเป็นต้องเฝ้าระวังและควบคุม โดยมี ยุงลาย (*Aedes spp.*) เป็นพาหะนำเชื้อมาสู่คน เชื้อไวรัสเดงกีทุกซีโรทัยป์ ได้แก่ DEN-1, DEN-2, DEN-3 และ DEN-4 สามารถก่อโรคและเป็นปัจจัยเสี่ยงที่มีความสำคัญต่อการระบาดในทุกพื้นที่ของประเทศ การศึกษานี้ใช้เทคนิค Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) เพื่อวิเคราะห์ซีโรทัยป์ของไวรัสเดงกีที่แพร่กระจายในพื้นที่เขตสุขภาพที่ 2 ประกอบด้วย 5 จังหวัด คือ พิษณุโลก สุโขทัย เพชรบูรณ์ อุตรดิตถ์ และตาก โดยการเก็บตัวอย่าง พลาสมาของผู้ป่วยในระยะเฉียบพลัน ที่ได้รับการวินิจฉัยเบื้องต้นว่าติดเชื้อไวรัสเดงกี ตั้งแต่เดือนมกราคม 2555 ถึง เดือนธันวาคม 2559 จากการศึกษาทั้งหมด 1,284 ตัวอย่าง พบผลบวกต่อสารพันธุกรรมของไวรัสเดงกี 696 ตัวอย่าง (ร้อยละ 54.2) โดยพบเป็น DEN-1, DEN-2, DEN-3 และ DEN-4 จำนวน 148, 177, 276 และ 95 ตัวอย่าง ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 11.5, 13.8, 21.5 และ 7.4 ตามลำดับ นอกจากนี้ตรวจพบทุกซีโรทัยป์ได้ตลอดปี และในอัตราที่สูง ตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงเดือนกรกฎาคมของทุกปีที่ศึกษา โดยกลุ่มช่วงอายุ 15 – 24 ปี มีอัตราผลบวกสูงกว่ากลุ่มอายุอื่น ผลการศึกษานี้แสดงว่าเขตสุขภาพที่ 2 มีการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสเดงกีทุกซีโรทัยป์ ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดความรุนแรงของอาการทางคลินิกเพิ่มขึ้นจากการติดเชื้อซ้ำ การเฝ้าระวังสายพันธุ์ทางห้องปฏิบัติการอย่างสม่ำเสมอเป็นสิ่งที่จะต้องพิจารณา เพื่อจะได้ข้อมูลนำไปสู่การวางแผนป้องกันและการเตรียมความพร้อมหากเกิดการระบาดในพื้นที่

บทนำ

โรคไข้เลือดออกเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสเดงกีซึ่งมียุงลาย (*Aedes spp.*) เป็นพาหะนำโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) และยุงลายสวน (*Aedes albopictus*) เชื้อไวรัสเดงกีจัดอยู่ใน genus *Flavivirus* ของ Family *Flaviviridae* เป็นอนุภาครูปทรงกลม ส่วนเปลือกหุ้มประกอบไปด้วยเยื่อไขมันและโปรตีน โดยมีสารพันธุกรรมเป็น Ribonucleic Acid (RNA) สายเดี่ยวขนาดประมาณ 11 kilobase (kb) ซึ่งจะสร้างโปรตีน 2 กลุ่ม คือ กลุ่มโปรตีนโครงสร้าง (structural protein) มี 3 ชนิด คือ Capsid (C), Pre-Membrane (PrM), และ Envelope (E) ส่วนอีกกลุ่มหนึ่งเป็นโปรตีนที่ไม่ได้รวมเป็นโครงสร้าง (nonstructural protein: NS) มี 7 ชนิด ได้แก่ NS1, NS2A NS2B, NS3, NS4A, NS4B และ NS5 โปรตีนในกลุ่มนี้ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์สาย RNA และจำเป็นต่อการรวมตัวเป็นอนุภาคภายในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีแบ่งออกเป็น 4 ซีโรทัยป์ (serotypes) คือ DEN-1, DEN-2, DEN-3 และ DEN-4⁽¹⁻³⁾

อาการทางคลินิกที่สำคัญของผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกี คือไข้สูง ปวดศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน มีภาวะเลือดออก (Dengue Hemorrhagic Fever: DHF) และในรายที่มีอาการรุนแรงอาจเกิดภาวะช็อก (Dengue Shock Syndrome: DSS)⁽²⁾ ซึ่งภาวะทั้งสองอาจเป็นสาเหตุให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ จำเป็นต้องได้รับการวินิจฉัยอย่างถูกต้องและรวดเร็ว จากรายงานการศึกษาแสดงให้เห็นว่าปัจจัยสำคัญที่ทำให้ไวรัสเดงกีก่อโรครุนแรงแตกต่างกัน⁽⁴⁻⁶⁾ ประกอบด้วย อายุ เพศ เชื้อชาติ การติดเชื้อซ้ำและสายพันธุ์ของไวรัส (viral strain) และยังมีรายงานว่าพื้นที่ที่มีไวรัสเดงกีหลายสายพันธุ์จะทำให้มีโอกาสดูติดเชื้อซ้ำสูง โดยการติดเชื้อซ้ำด้วย DEN-2 หรือ DEN-3 มีอัตราเสี่ยงที่จะเกิด DHF สูง นอกจากนี้ยังพบว่าการติดเชื้อซ้ำและต่างสายพันธุ์ คือ การติดเชื้อ DEN-2 หลังจากการติดเชื้อ DEN-1 มีอัตราเสี่ยงที่จะเกิด DHF มากที่สุด เมื่อเทียบกับการติดเชื้อ DEN-2 หลังจากการติดเชื้อ DEN-3 และ DEN-4⁽⁷⁾

การระบาดของเชื้อไวรัสเดงกีในประเทศไทยเริ่มตั้งแต่ปี พ.ศ. 2501 และเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศจนถึงปัจจุบัน⁽⁸⁾ โดยปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการแพร่กระจายของโรคแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ คือ ภูมิทัศน์ทางของประชาชน ชนิดของเชื้อไวรัสเดงกี ความหนาแน่นของประชากรและการเคลื่อนย้าย สภาพภูมิอากาศ ชนิดของยุงพาหะ นอกจากนี้ความรู้ ความเข้าใจ และความตระหนักของประชาชนในการกำจัดแหล่งเพาะพันธุ์ลูกน้ำยุงลายอย่างต่อเนื่อง เป็นสิ่งจำเป็นต่อการป้องกันและควบคุมการระบาดของโรคไข้เลือดออกได้⁽⁹⁾

การตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสเดงกีด้วยวิธี ELISA นั้นใช้สำหรับเพื่อการตรวจวินิจฉัยและการตรวจยืนยันการติดเชื้อ แต่เพื่อเป็นการเฝ้าระวังโรค การเปลี่ยนแปลงชนิดซีโรทัยป์ของไวรัสเดงกีซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญมากประการหนึ่งต่อการเกิดและการระบาดของโรค รวมทั้งเพื่อใช้ประกอบการประเมินสถานการณ์สำหรับวางแผนการป้องกันและควบคุมโรคที่มีประสิทธิภาพ จึงได้ทำการตรวจวิเคราะห์แยกชนิดสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสเดงกีด้วยวิธี RT-PCR จากผู้ป่วยในพื้นที่เขตสุขภาพที่ 2 ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2555 ถึง 2559

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างศึกษา

ตัวอย่างพลาสมา (EDTA Plasma) ที่แยกจากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยสงสัย ที่ได้รับการวินิจฉัยเบื้องต้นว่าติดเชื้อไวรัสเดงกี ซึ่งมีผลการตรวจโปรตีนชนิด NS-1 เป็นบวก หรือมีปริมาณเม็ดเลือดขาว และเกล็ดเลือดน้อยกว่า 5,000 และ 100,000 ตามลำดับ รวมถึงตัวอย่างที่มีอาการทางคลินิกสงสัยไข้เลือดออกที่เข้าเกณฑ์การสอบสวนโรคไข้เลือดออก⁽⁵⁾ โดยเก็บตัวอย่างเลือดภายใน 5 วัน นับจากวันเริ่มป่วย ตัวอย่างดังกล่าวจัดเก็บจากสถานพยาบาลในเขต

สุขภาพที่ 2 ตั้งแต่เดือนมกราคม 2555 ถึงเดือนธันวาคม 2559 จำนวนทั้งหมด 1,284 ตัวอย่าง จาก 5 จังหวัดได้แก่ พิษณุโลก สุโขทัย ตาก อุตรดิตถ์ และเพชรบูรณ์ แห่งละ 272, 148, 265, 414 และ 185 ตัวอย่าง ตามลำดับ

การตรวจซีโรทัยป์ของไวรัสเดงกีด้วยเทคนิค Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

การสกัด RNA จากพลาสมา

สกัด RNA ด้วยชุดน้ำยา PureLink Viral RNA/DNA Kit (In vitrogen, USA) ตามขั้นตอนของเอกสารกำกับน้ำยา กล่าวโดยย่อ คือ เติม proteinase K (37 µl) และ lysis buffer (250 µl) ลงไปในพลาสมา (100 µl) แล้วนำไปอุ่นใน heating block ที่อุณหภูมิ 56°C นาน 15 นาที เมื่อครบเวลา เติม 96 – 100% ethanol (300 µl) ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที จากนั้นนำไปใส่ใน column ปั่นที่ 6,800 × g นาน 1 นาที จึงล้างด้วย wash buffer (500 µl) 2 ครั้ง หลังจากเติม RNase-free water (40 µl) นำไปปั่นที่ 11,000 × g นาน 1 นาที เก็บสารละลาย RNA ที่ 4°C และนำไปตรวจหาซีโรทัยป์ หรือเก็บที่ -70°C เพื่อวิเคราะห์ต่อไป

การวิเคราะห์ซีโรทัยป์

นำ RNA ที่สกัดได้ (5 µl) มาทำการเพิ่มจำนวนรอบที่ 1 โดยใช้ Universal outer primers: DUR และ DUL (ตารางที่ 1)⁽¹⁰⁾ โดยในหนึ่งปฏิกิริยาประกอบด้วยสารละลาย 5x OneStep RT-PCR buffer ปริมาตร 5 µl สารละลาย 10 mM dNTP ปริมาตร 1 µl สารละลาย 10 µM DUR primer 0.5 µl สารละลาย 10 µM DUL primer ปริมาตร 0.5 µl สารละลาย RNase inhibitor ปริมาตร 1 µl (25 – 40 Units) สารละลาย QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme mix ปริมาตร 1 µl จากนั้นนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Px2 Thermal CyCler, Thermoelectron Corporation, USA) ที่ตั้งอุณหภูมิ 50°C นาน 30 นาที จำนวน 1 รอบ เพื่อเปลี่ยน RNA เป็น cDNA และขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C นาน 1 นาที ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 45°C นาน 1 นาที ขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 1 นาที ทำซ้ำจำนวน 40 รอบ โดยในรอบแรกเพิ่มเวลาขั้นตอน denaturation เป็น 5 นาที และรอบสุดท้ายเพิ่มเวลาขั้นตอน extension เป็น 5 นาที จากนั้นนำผลผลิต PCR รอบที่ 1 (1 µl) มาเพิ่มจำนวนรอบที่ 2 ด้วย primers ที่จำเพาะต่อซีโรทัยป์ของไวรัสเดงกี (ตารางที่ 1)⁽¹⁰⁾ โดยที่ในหนึ่งปฏิกิริยาประกอบด้วยสารละลาย 10 × PCR buffer ปริมาตร 2.5 µl สารละลาย 5 µM Mixed inner primers 2.0 µl สารละลาย 10 mM dNTP ปริมาตร 0.5 µl สารละลาย 25 MgCl₂ ปริมาตร 1 µl (25 – 40 Units) สารละลาย QIAGEN Hot Star Taq DNA polymerase ปริมาตร 0.125 µl และ DEPC-DW ปริมาตร 17.88 µl แล้วนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Px2 Thermal CyCler, Thermoelectron corporation, USA) ที่ตั้งอุณหภูมิ 95°C นาน 15 นาที จำนวน 1 รอบ เพื่อกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ และขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C นาน 1 นาที ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 62°C นาน 1 นาที ขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 1 นาที ทำซ้ำจำนวน 40 รอบ โดยในรอบแรกเพิ่มเวลาขั้นตอน denaturation เป็น 5 นาที และรอบสุดท้ายเพิ่มเวลาขั้นตอน extension เป็น 5 นาที แล้วนำผลผลิต PCR รอบที่ 2 วิเคราะห์ชนิดของซีโรทัยป์ด้วยวิธี Gel Electrophoresis โดยใช้ 2% Agarose ที่ผสมด้วย 0.5 µg/ml Ethidium bromide แล้วตรวจดูผลภายใต้ UV transilluminator, Spectroline, Spectronic corporation USA) ซึ่งขนาดผลผลิต PCR ของ DEN-1, DEN-2, DEN-3 และ DEN-4 เท่ากับ 504, 346, 196 และ 143 base pairs (bp) ตามลำดับ (ภาพที่ 1) ทั้งนี้ตัวอย่างควบคุมชนิดลบ (negative control) คือตัวอย่างที่มีผลตรวจยืนยันการติดเชื้อไวรัสเดงกีเป็นลบ ส่วนตัวอย่างควบคุมชนิดบวก (positive control) คือ DEN-1 (Hawaii strain), DEN-2 (Tr 1751 strain), DEN-3 (H 87 strain) และ DEN-4 (H 241 strain) ที่ได้รับการสนับสนุนจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของชุด primer ที่ใช้ตรวจวิเคราะห์หาสารพันธุกรรมของไวรัสเดงกีที่จำเพาะเจาะจงต่อชนิดซีโรทัยป์ด้วยเทคนิค RT-PCR

Outer primers		
Primer	Sequence (5' to 3')	Position
E region		
DUR	GCT GTG TCA CCC AGA ATG GCC AT	2169-2192
DUL	TGG CTG GTG CAC AGA CAA TGG TT	1552-1574
Mixed inner primers		
Type specific primers (E region)		
D1L	GGG GCT TCA ACA TCC CAA GAG	1574-1694
D1R	GCT TAG TTT CAA AGC TTT TTC AC	2055-2077
D2L	ATC CAG ATG TCA TCA GGA AAC	1744-1764
D2R	CCG GCT CTA CTC CTA TGA TG	2070-2089
D3L	CAA TGT GCT TGA ATA CCT TTG T	1829-1848
D3R	GGA CAG GCT CCT CCT TCT TG	2005-2024
D4L	GGA CAA CAG TGG TGA AAG TCA	1892-1911
D4R	CGT TAC ACT GTT GGT ATT CTC A	2012-2034

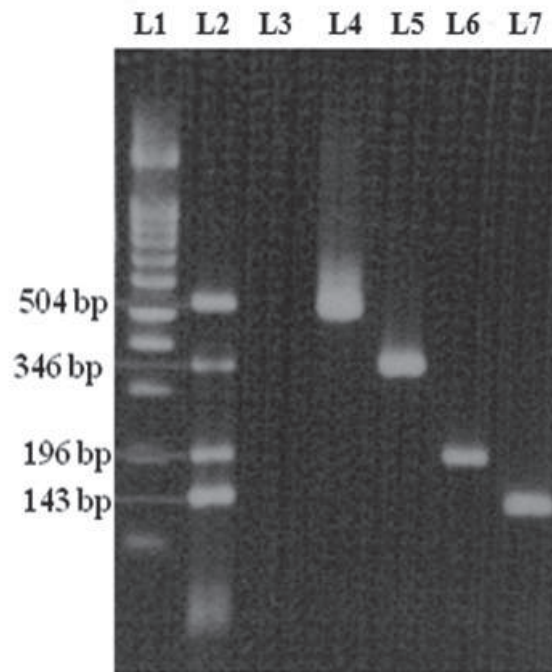
ผล

ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่าง

ตัวอย่างผู้ป่วยสงสัยไข้เลือดออกในพื้นที่เขตสุขภาพที่ 2 ทั้งหมด 5 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดพิษณุโลก สุโขทัย เพชรบูรณ์ อุตรดิตถ์ และตาก ระหว่างเดือนมกราคม 2555 ถึงเดือนธันวาคม 2559 จำนวนทั้งหมด 1,284 ตัวอย่าง เป็นเพศชาย 680 ตัวอย่าง และเพศหญิง 604 ตัวอย่าง ซึ่งมีอายุตั้งแต่ 1 เดือนถึง 83 ปี เมื่อแยกตามจำนวนปีที่ศึกษาพบว่าผู้ป่วยสงสัยไข้เลือดออกในปี 2555, 2556, 2557, 2558 และ 2559 จำนวน 149, 488, 121, 337 และ 189 ราย ตามลำดับ

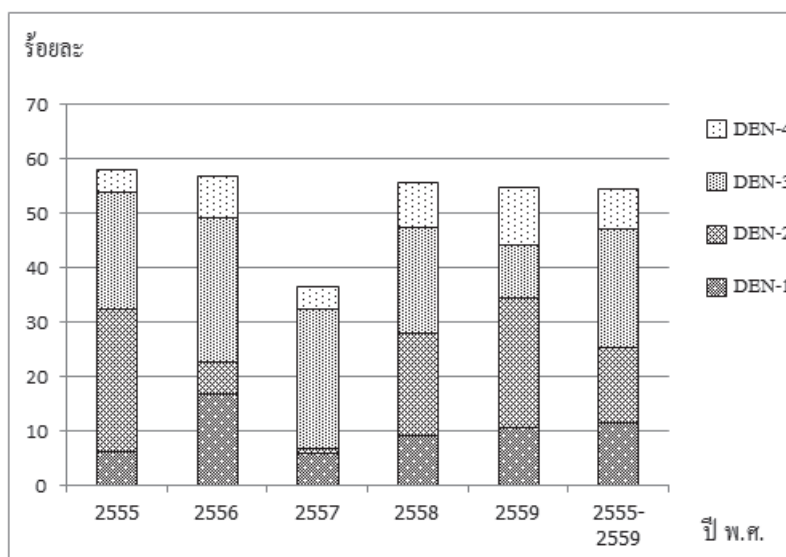
ซีโรทัยป์ของไวรัสเดงกี

วิเคราะห์ซีโรทัยป์ของตัวอย่างผู้ป่วยตามขนาดของผลผลิต PCR รอบที่ 2 ซึ่งจัดเป็น DEN-1, DEN-2, DEN-3 หรือ DEN-4 เมื่อมีขนาดผลผลิตเท่ากับ 504, 346, 196 หรือ 143 bp ตามลำดับ (ภาพที่ 1)



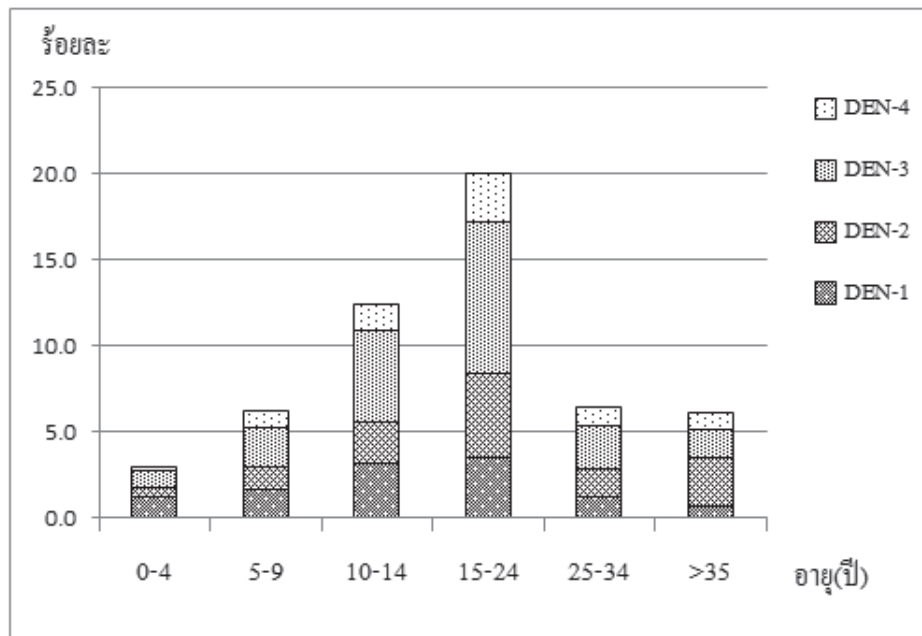
ภาพที่ 1 การตรวจสอบผลการตรวจวิเคราะห์โดยวิธี Gel Electrophoresis: นำผลผลิตรอบที่ 2 มาแยกขนาดด้วย 2% Agarose ที่ผสมด้วย 0.5 µg/ml Ethidium bromide แล้วตรวจดูผลภายใต้ UV transilluminator; L1:100 bp DNA L2: Dengue marker ผลผลิตรอบที่ 2 ที่ให้ผลบวกต่อ DEN-1, DEN-2, DEN-3 และ DEN-4 มาผสมรวมกัน L3: Negative control L4: DEN-1 (Hawaii strain) L5: DEN-2 (Tr 1751 strain) L6: DEN-3 (H 87 strain) L7: DEN-4 (H 241 strain)

จากการตรวจวิเคราะห์สายพันธุ์ด้วยเทคนิค RT-PCR ของตัวอย่าง 1,284 ราย พบว่าให้ผลบวก 696 ราย คิดเป็นร้อยละ 54.2 เมื่อวิเคราะห์สายพันธุ์จากตัวอย่างที่ให้ผลบวก แสดงให้เห็นว่าอัตราการแพร่กระจายของเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์แตกต่างกันไปในแต่ละปีที่ดำเนินการศึกษา (ภาพที่ 2) ซึ่งสายพันธุ์ที่พบมาก คือ DEN-2 และ DEN-3

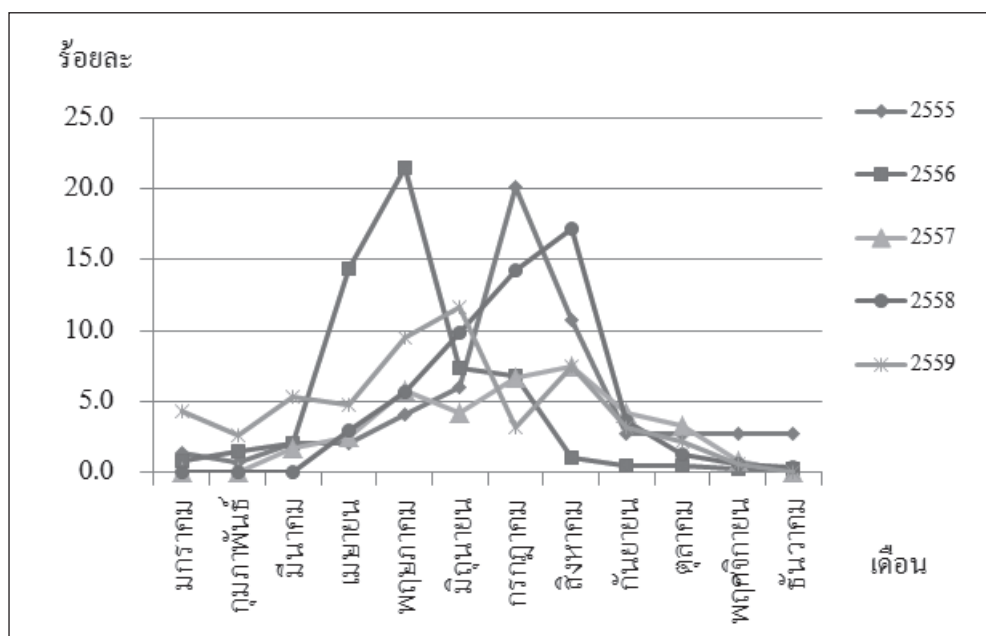


ภาพที่ 2 ซีโรทัยป์ของไวรัสเดงกีในเขตสุขภาพที่ 2 จำแนกตามปีที่ศึกษา

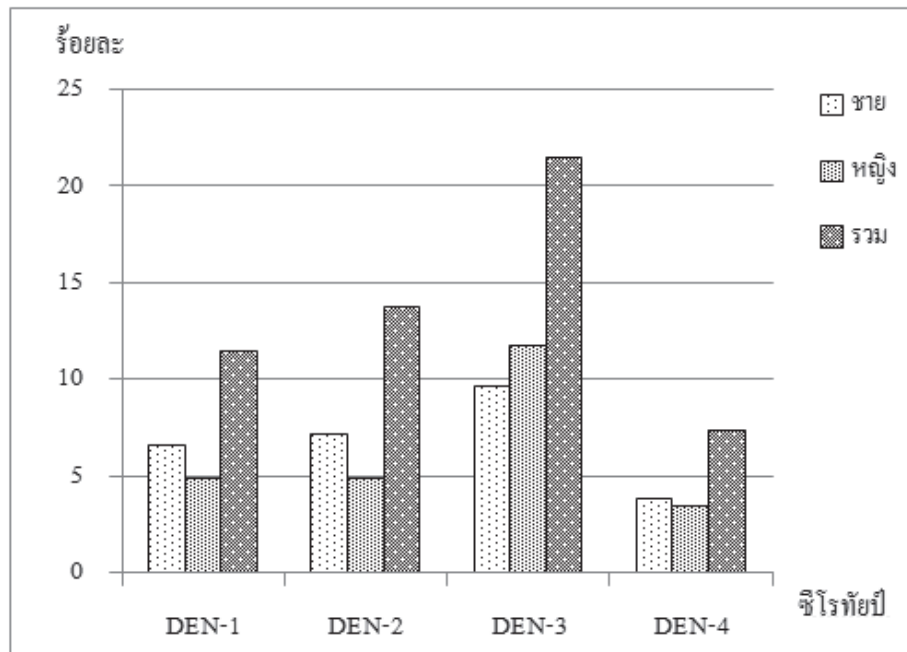
นอกจากนี้ พบการกระจายของทุกสายพันธุ์ในแต่ละช่วงอายุ โดยอัตราติดเชื้อสูงสุดของแต่ละซีโรทัยป์ พบในกลุ่มอายุระหว่าง 15 - 24 ปี (ภาพที่ 3) และยังพบผู้ติดเชื้อในอัตราที่สูงระหว่างเดือนพฤษภาคม ถึง เดือนสิงหาคมของปี (ภาพที่ 4) อย่างไรก็ตาม เพศสภาพของตัวอย่างไม่ได้แสดงให้เห็นว่าเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อหรือพยาธิสภาพของโรค (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 3 การกระจายของสายพันธุ์ไวรัสเดงกีในเขตสุขภาพที่ 2 จำแนกตามช่วงอายุ ระหว่างปี พ.ศ. 2555 - 2559



ภาพที่ 4 ซีโรทัยป์ของไวรัสเดงกีที่ตรวจพบในเขตสุขภาพที่ 2 ในแต่ละเดือน ของแต่ละปีที่ศึกษา



ภาพที่ 5 ซีโรทัยป์ของไวรัสเดงกีทั้ง 4 ชนิดที่ตรวจพบในเขตสุขภาพที่ 2 ช่วงปี พ.ศ. 2555-2559 จำแนกตามเพศสภาพ

วิจารณ์

การวิเคราะห์สายพันธุ์เชื้อไวรัสเดงกีในเขตสุขภาพที่ 2 ของการศึกษานี้เป็นการตรวจด้วยเทคนิค RT-PCR จากพลาสมาของผู้ป่วยสงสัยติดเชื้อในระยะเวลา 5 วัน นับจากเริ่มป่วยพบว่า สามารถตรวจแยกสายพันธุ์ได้เพียงร้อยละ 54.2 ทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับระยะเวลาของการเก็บตัวอย่างและปริมาณของเชื้อไวรัสในตัวอย่างทดสอบ ดังเช่นรายงานการศึกษาพบว่าตัวอย่างที่เก็บภายใน 1 - 2 วันก่อนและหลังมีอาการไข้ ให้ผลบวกในอัตราที่สูง⁽¹¹⁾ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าปริมาณเชื้อไวรัสในกระแสเลือดขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อด้วย⁽¹²⁻¹⁴⁾

การศึกษานี้ตรวจพบไวรัสเดงกีตลอดทั้งปี และยังพบสายพันธุ์ไวรัสเดงกีทั้ง 4 ซีโรทัยป์ ในทุกจังหวัดของเขตสุขภาพที่ 2 อีกด้วย แสดงว่าเขตสุขภาพที่ 2 เป็นพื้นที่ที่มีความเสี่ยงสูงในการติดเชื้อซ้ำ⁽¹⁵⁻¹⁶⁾ และจากการตรวจพบสายพันธุ์ที่ 2 และ 3 ในสัดส่วนที่สูงของการศึกษานี้ มีความสอดคล้องกับรายงานการเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์ที่ระบาดในประเทศไทยและอาการทางคลินิกที่เพิ่มขึ้น⁽¹⁷⁻¹⁸⁾ แสดงให้เห็นว่าโอกาสเกิดการติดเชื้อซ้ำต่างสายพันธุ์อาจเกิดขึ้นได้และอาจส่งผลให้ผู้ป่วยมีอาการรุนแรงกว่าปกติ

ผลของการศึกษานี้ยืนยันว่าอายุของผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเดงกี มีแนวโน้มสูงขึ้นจากช่วงอายุ 5 - 14 ปี เป็นช่วงอายุมากกว่า 15 ปี เช่นเดียวกับการศึกษาที่ผ่านมาทั้งในประเทศไทยและประเทศสิงคโปร์⁽¹⁹⁻²⁰⁾ และการตรวจพบเชื้อไวรัสเดงกีทางห้องปฏิบัติการที่เริ่มพบสูงขึ้นในช่วงเดือนพฤษภาคมจนถึงเดือนกรกฎาคม สอดคล้องกับข้อมูลจากระบบเฝ้าระวังของสำนักโรคระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค⁽²¹⁾ แสดงว่าการเตรียมการควบคุมกำจัดลูกน้ำยุงลาย รวมทั้งการให้ความรู้แก่ประชาชน ควรเริ่มดำเนินการก่อนเดือนเมษายน เพื่อลดปัญหาการแพร่กระจายและการเกิดโรคไข้เลือดออกในพื้นที่เขตสุขภาพที่ 2 ต่อไป

สรุป

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าโรคไข้เลือดออกในพื้นที่เขตสุขภาพที่ 2 มีโอกาสเกิดได้ตลอดทั้งปี จากเชื้อไวรัสเดงกีทั้ง 4 ซีโรทัยป์ ดังที่ตรวจพบจากตัวอย่างผู้ป่วยในจังหวัดพิษณุโลก สุโขทัย ตาก อุตรดิตถ์ และเพชรบูรณ์ ข้อมูลการแพร่กระจายของสายพันธุ์เป็นประโยชน์ต่อการประเมินความเสี่ยง การกำหนดแนวทางเพื่อการควบคุม ป้องกันโรค รวมถึงพาหะของโรคด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ว่าที่ ร.ต.ณัฐพัชร์ รัตนเดชานาคินทร์ ผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 2 พิษณุโลก ให้การสนับสนุนการดำเนินการในโครงการ และคณะทำงานเครือข่ายเฝ้าระวังโรคไข้เลือดออก สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดพิษณุโลก สุโขทัย ตาก อุตรดิตถ์ และเพชรบูรณ์ ที่ได้สนับสนุนประสานงานการเก็บตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Gubler DJ. Dengue. In: Monath TP, editor. The arboviruses: epidemiology and ecology, Vol. II. Boca Raton, FL: CRC Press; 1988. p. 223-260.
2. World Health Organization. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd ed. Geneva: WHO; 1997.
3. Monath TP. Flaviviruses. In: Fields BN, Knipe DM, editors. Virology, Vol. 1. 2nd ed. New York: Raven Press, 1990. p. 763-814.
4. Bureau of Epidemiology, Ministry of Public Health. Annual epidemiological surveillance report 2003. Nonthaburi, Thailand: Department of Disease Control; 2003.
5. Pancharoen C, Kulwichit W, Tantawichien T, Thisyakorn U, Thisyakorn C. Dengue infection: a global concern. J Med Assoc Thai 2002; 85 (Suppl 1): S25-33.
6. ชิชณญ์ พันธุ์เจริญ. โรคไข้เลือดออก. ใน : พรหมพิศ สุวรรณกุล, อีระพงษ์ ตันทวีเชียร, ศศิธร ลิขิตบุญกุล, บรรณาธิการ. Current practice in common infectious diseases. กรุงเทพฯ : สมาคมโรคติดต่อแห่งประเทศไทย; 2546. หน้า 215-238.
7. อุษา ทิสยากร. ไวรัสเดงกี : แรงจูงใจในการวิจัย. ใน : นลินี อัสวโกตี, สุรภี เทียนกริม, สมบัติ สีสามสุภาศรี, บรรณาธิการ. โรคติดต่อที่กำลังเป็นปัญหาสำคัญ. กรุงเทพฯ : บริษัท โฮลิสติก พับลิชชิ่ง จำกัด; 2537. หน้า 1-15.
8. กองระบาดวิทยา กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข. สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรค. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์องค์การทหารผ่านศึก; 2520-2541.
9. ศิริเพ็ญ กัลยาณรุจ, สุภาวดี พวงสมบัติ. การติดเชื้อ อาการและอาการแสดง. ใน : สุภาวดี พวงสมบัติ, อีราวีดี กอพักคณินทร์, วราภรณ์ เอมะรุจ, ศรัณรัชต์ ชาญประโคน, บรรณาธิการ. คู่มือวิชาการโรคติดต่อเดงกีและโรคไข้เลือดออกเดงกีด้านการแพทย์และสาธารณสุข ปี พ.ศ. 2558. นนทบุรี : สำนักโรคติดต่ออันตรายโดยแมลง กรมควบคุมโรค; 2558. หน้า 16-23.
10. Yenchitsomanus PT, Sricharoen P, Jaruthsana I, Pattanakitsakul SN, Nitayaphan S, Mongkolsapaya J, et al. Rapid detection and identification of dengue viruses by polymerase chain reaction(PCR). Southeast Asian J Trop Med Public Health 1996; 27(2): 228-36.
11. Sa-ngasang A, Wibulwattanakij S, Chanama S, O-rapinpatipat A, A-nuegoonpipat A, Anantapreecha S, et al. Evaluation of RT-PCR as a tool for diagnosis of secondary dengue virus infection. Jpn J Infect Dis 2003; 56(5-6): 205-9.

12. Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis* 2000; 181: 2-9.
13. Kalayanarooj S, Nimmannitya S. Clinical and laboratory presentations of dengue patients with different serotypes. *Dengue Bull* 2000; 24: 53-9.
14. Wang WK, Chao DY, Kao CL, Wu HC, Liu YC, Li CM, et al. High levels of plasma dengue viral load during defervescence in patients with dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *Virology* 2003; 305(2): 330-8.
15. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11(3): 480-96.
16. Pancharoen C, Thisyakorn U, Thisyakorn C. Dengue infection. *J Infect Dis Antimicrob Agents* 2001; 18(3): 115-21.
17. Nisalak A, Endy TP, Nimmannitya S, Kalayanarooj S, Thisyakorn U, Scott RM, et al. Serotype-specific dengue virus circulation and dengue disease in Bangkok, Thailand from 1973 to 1999. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 68(2): 191-202.
18. คำนวน อึ้งชูศักดิ์. สถานการณ์และแนวโน้มของโรคติดเชื้อไวรัสเดงกีในประเทศไทย. ใน : ชัชฎ์ พันธุ์เจริญ, วันลา กุลวิจิต, อีระพงษ์ ตันทวีเชียร, อุษา ทิสยากร, บรรณาธิการ. ไข้เลือดออก. กรุงเทพฯ : หจก. เพนตากอน แอ็ดเวอร์ไทซิง; 2546. หน้า 11-14.
19. Chareonsook O, Foy HM, Teeraratkul A, Silarug N. Changing epidemiology of dengue hemorrhagic fever in Thailand. *Epidemiol Infect* 1999; 122(1): 161-6.
20. Ooi EE, Goh KT, Wang DNC. Effect of increasing age on the trend of dengue and dengue hemorrhagic fever in Singapore. *Int J Infect Dis* 2003; 7(3): 231-2.
21. จรณิต แก้วกังวาล, จิระพัฒน์ เกตุแก้ว, อีราวัต กอพยัคฆินทร. ระบาดวิทยา. ใน : สุภาวดี พวงสมบัติ, อีราวัต กอพยัคฆินทร, วราภรณ์ เอมะรุจ, ศรัณรัชต์ ชาญประโคน, บรรณาธิการ. คู่มือวิชาการโรคติดเชื้อเดงกีและโรคไข้เลือดออกเดงกีด้านการแพทย์และสาธารณสุข ปี พ.ศ. 2558. นนทบุรี : สำนักโรคติดต่อ นำโดยแมลง กรมควบคุมโรค; 2558. หน้า 1-10.

Dengue Virus Serotypes in Health Region 2 in BE 2555-2559

Chavalit Kiatvitchukul Vatcharin Srisakul and Jiraporn Srisakul

Regional Medical Sciences Center 2 Phitsanolk, Department of Medical Sciences, Amphoe Muang, Phitsanolk 65000, Thailand

ABSTRACT Dengue infection still remains one of the major public health problems in Thailand. Dengue virus, a causative pathogen, is classified into 4 serotypes: DEN-1, DEN-2, DEN-3 and DEN-4. All serotypes, transmitted by *Aedes* mosquitoes, can cause disease in humans. This study was to investigate serotypes of dengue virus circulating in Health Region 2. A total of 1,284 plasma samples were collected from suspected cases with initial diagnosis as dengue infection during January 2012 until December 2016. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to determine serotypes of all specimens. Six hundred and ninety-six samples were found positive for DEN-1, DEN-2, DEN-3 and DEN-4 at percentages of 11.5 (148 cases), 13.8 (177 cases), 21.5 (276 cases) and 7.4 (95 cases), respectively. All 4 serotypes could be demonstrated throughout each year with higher rates ranging from May to July. Our findings also indicated that a group with a high percentage of dengue infection was in the age group from 15 to 24 years. Our study suggested that all serotypes of dengue virus could be transmitted within Health Region 2 with possibilities of severe symptoms resulting from re-infection. Laboratory surveillance for dengue virus serotypes should be considered to obtain important data for planning and preparedness of possible outbreaks that might occur in Health Region 2.

Keywords: Dengue virus serotypes, RT-PCR technique



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

ซอยโรงพยาบาลบำราศนราดรุณ 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	Sukhum Karnchanapimai	Phichet Banyati
	Worawit Kittiwongsunthorn	Somlerk Jeungsamarn
Technical Advisor	Prasert Thongcharoen	Panadda Silva
	Amara Vongbuddhapitak	Mayura Kusum
	Jongdee Wongpinairat	Pimjai Naigowit
	Supatra Im-Erb	Sumol Pavittranon
Editor	Teeranart Jivapaisarnpong	Department of Medical Sciences
Assistant Editor	Laojana Chowanadisai	Independent scholar
Editorial Board	Prasert Auewarakul	Siriraj Hospital, Mahidol University
	Orasa Suthienkul	Thammasart University
	Pilaipan Puthavathana	Siriraj Hospital, Mahidol University
	Punnee Pitisuttithum	Mahidol University
	Pintip Pongpech	Chulalongkorn University
	Suchada Chaisawadi	King Mongkut's Institute of Technology Thonburi
	Danai Tiwawech	Naresuan University
	Suwanna Charunut	Huachiew Chalermprakiet University
	Hansa Chaivanit	Independent scholar
	Pathom Sawanpanyalert	Office of the Permanent Secretary, Ministry of Public Health
	Usavadee Thavara	Independent scholar
	Salakchit Chutipongvivate	Office of the Permanent Secretary, Ministry of Public Health
	Duanthanorm Promkhatkaew	Department of Medical Sciences
	Punthip Teeyapant	Department of Medical Sciences
	Busarawan Sriwanthana	Department of Medical Sciences
	Kanokporn Atisook	Department of Medical Sciences
	Siri Srimanoroth	Department of Medical Sciences
	Wichuda Jariyapan	Department of Medical Sciences
	Supanee Duangteraprecha	Department of Medical Sciences
Administration	Namfon Noiprasert	Department of Medical Sciences
	Prasan Julwong	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	Aroonkarpim Ltd., Part. 457/6-7 Phra Sumen Road, Bangkok 10200 Tel. 0-2282-6033-4	



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

มุ่งมั่นพัฒนา คำนึงวิจัย จับไวบริการ มาตรฐานสากล

www.dmsc.moph.go.th