

วารสาร



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 58 ฉบับที่ 3 กรกฎาคม - กันยายน 2559 Vol. 58 No.3 July - September 2016

ISSN 0125-684X

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จัดทำโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เพื่อเผยแพร่
ผลงานวิจัยและแลกเปลี่ยนความรู้ด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ทุกสาขา

เจ้าของ ที่ปรึกษาด้านบริหาร	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข นพ.อภิชัย มงคล พญ.วารุณี จินารัตน์	นางจุรีภรณ์ บุญวงศ์โรจน์ นพ.พิเชษฐ บัญญัติ
ที่ปรึกษาด้านวิชาการ	ศ.เกียรติคุณ นพ.ประเสริฐ ทองเจริญ ภญ.อมรา วงศ์พุทธพิทักษ์ ภญ.ดร.จงดี ว่องพินัยรัตน์ ภญ.สุภัทรา อิ่มเอิบ	ดร.ปนัดดา ชิลวา พญ.มยุรา กุสุมภ์ นางพิมพ์ใจ นัยโกวิท ภญ.ดร.สุมล ปวีตรานนท์
บรรณาธิการ	นางธีรนาถ จิระไพศาลพงศ์	
ผู้ช่วยบรรณาธิการ	ดร.เลาจนา เขาวนาดีสัย	
คณะบรรณาธิการ	ศ.ดร. นพ.ประเสริฐ เอื้อวรากุล ศ.ดร.พิไลพันธ์ พุฒินะ รศ.ดร. ภญ.พิณทิพย์ พงษ์เพชร ดร.दनัย ทิวาเวช นางหรรษา ไชยวานิช ดร.เดือนถนอม พรหมขัติแก้ว ดร.สลักจิต ชูติพงษ์วิเวท ดร.บุษราวรรณ ศรีวรรณะ นางกนกพร อธิสุข ภญ. ดร.สุภาณี ดวงธีรปรีชา	ศ.ดร.อรษา สุตเธียรกุล ศ. พญ.พรรณี ปิตุสทธิธรรม ผศ.สุชาดา ไชยสวัสดิ์ นางสุวรรณา จารุณูช ดร.นพ.ปฐม สวรรค์ปัญญาเลิศ นางสาวพรรณทิพย์ ตียพันธุ์ ดร.อุษาวดี ถาวระ นายศิริ ศรีมนโรธ นางวิษชุดา จริยะพันธ์
ฝ่ายจัดการ	นางสาวน้ำฝน น้อยประเสริฐ นางสาวประสาน จุลวงษ์	
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 58 ฉบับที่ 3 กรกฎาคม - กันยายน 2559

Vol. 58 No. 3 July - September 2016

สารบัญ

หน้า

นิพนธ์ต้นฉบับ

- คุณลักษณะของอุปกรณ์วัดรังสีไอเอสแอลชนิดนาโนดอทสำหรับงานรังสีวินิจฉัย 141
จินดา ทองเรือง สิริชัย เอียร์รัตนกุล และวีรชัย ดิสุวรรณ
- การตรวจหาสารพันธุกรรมตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ในผลิตภัณฑ์วัคซีนไวรัส 149
โดยวิธี Real-time Polymerase Chain Reaction
สุกัลยาณี ไชยมี สมปอง ทรัพย์สุทธิภาสน์ จิรเดช ปัจฉิม และสุภาพร ภูมิอมร
- การศึกษาฤทธิ์คงทนของทรายอะเบทในการควบคุมลูกน้ำยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* 161
ในสภาพธรรมชาติและกึ่งจำลองธรรมชาติ
อัครงค์ ผลชีวิน สุนัยนา สหกันไทรภาพ อำนาจ บุญเครือพันธ์ และสมชาย แสงกิจพร
- การทดสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจวิเคราะห์ความแรงของอิมมูโนโกลบูลิน 169
ที่ทำจากมนุษย์สำหรับป้องกันโรคบาดทะยักด้วยชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูป
กนิษฐา ภูวนาถนรานานกุล วิชชุดา จริยะพันธ์ และสายวรุฬ จตุรกิตตินันท์

รายงานจากห้องปฏิบัติการ

- ผลการพัฒนาห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัยในโรงพยาบาลสังกัดกระทรวงสาธารณสุข 180
ในเขตสุขภาพที่ 9
สุภาวดี สยมภูจินันท์ อุมาวดี สังข์ทอง และอรุณรัตน์ ปัตถาทุม
- การประเมินความสามารถการทดสอบ *Salmonella* spp. ของห้องปฏิบัติการ 189
ตรวจวิเคราะห์อาหารโดยใช้ผลการทดสอบความชำนาญ
ลดาวลีย์ จิงสมานกุล อัจฉรา อยู่คง กมลวรรณ กันแต่ และกนกชน สุภาพรหม
- การสำรวจการปนเปื้อน *Listeria monocytogenes*, *Salmonellae* และ *E. coli* 197
O157:H7 ในเนื้อสัตว์ดิบที่จำหน่ายในตลาดสด เขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล
รัชฎาพร สุวรรณรัตน์ และดวงดาว วงศ์สมมาตร
- การตรวจพิสูจน์และยืนยันเอกลักษณ์ยานอนหลับชนิดใหม่ในประเทศไทย : ฟินาซีแพมในขงกลาง 208
ณปภา สิริศุภกฤตกุล ชมพูนุท นุตสถาปนา และบงกช พันธุ์บูรณานนท์

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 58 ฉบับที่ 3 กรกฎาคม - กันยายน 2559

Vol. 58 No. 3 July - September 2016

CONTENTS

Page

Original Articles

- Characterization of an Optically Stimulated Luminescence NanoDot Dosimeters for Diagnostic Radiology** 141

Chinda Tongruang Sirichai Theirrattanakul and Werachai Diswath

- Determination of Residual Vero Cell DNA in Viral Vaccine Products by Real-time PCR** 149

*Sukanlayanee Chaimee Sompong Sapsutthipas Jiradej Patchim
and Supaporn Phumiamorn*

- The Persistence of Temephos (Abate) on *Aedes aegypti* L. Larvae Under Field and Simulated Conditions** 161

*Thumrong Phonchevin Sunaiyana Sathantriphop Amnaj Bunkruaphan
and Somchai Sangkitporn*

- Method Validation for Potency Test of Human Tetanus Immunoglobulin by Commercial Test Kit** 169

Kanitta Phuwanartnaranubarn Wichuda Jariyapan and Saywarul Jadoonkittinan

Laboratory Findings

- Development for Radiation Diagnostic Laboratory in the Hospitals Under the Ministry of Public Health in Health Regional 9** 180

Supakee Sayumpoorujinan Aumawadee Sangtong and Arunrat Patthartum

- Laboratory Performance Assessment of *Salmonella* spp. in a Food Microbiology Proficiency Testing Scheme** 189

*Ladawan Chungsamakool Atchara Ukong Kamonwan Kantaeng
and Kanokchon Supaprom*

- Survey of *Listeria monocytogenes*, *Salmonellae* and *E. coli* O157:H7 Contaminations in Raw Meats from Fresh Markets in Bangkok and Circumferences** 197

Ratchadaporn Suwannarat and Duangdao Wongsommart

- Identification of a Newfound Sedative Drug of Abuse in Thailand: Phenazepam in Seized Material** 208

Napapha Sirisupakritkul Chompoonut Nutsathapana and Bongkot Phanburananont



บทบรรณาธิการ



เมื่อวันที่ 28-29 สิงหาคม พ.ศ. 2559 นี้ บรรณาธิการมีโอกาสดำเนินการประชุมวิชาการของ Asia Pacific Association of Medical Journal Editors (APAME) Convention 2016: Quality, Collaboration and Public Access ที่โรงแรมเซ็นทาราแกรนด์ เซ็นทรัล พลาซ่า ลาดพร้าว โดยมี Thai Society of Medical Journal Editors (ThaMJE) เป็นเจ้าภาพจัดประชุมร่วมกับห้องสมุดของ WHO South East Asia and Western Pacific Regional Offices โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เป็นเวทีในการสร้างความร่วมมือและแลกเปลี่ยนความรู้ ประสบการณ์ระหว่างบรรณาธิการ ผู้นิพนธ์ นักวิจัย บรรณาธิการ และผู้จัดทำวารสารวิชาการด้านการแพทย์ รวมทั้งยกระดับคุณภาพของบทความด้านการแพทย์และวิทยาศาสตร์สาธารณสุขที่ตีพิมพ์ในวารสารในเขตภูมิภาคเอเชียแปซิฟิกด้วย ในการประชุมนี้มีการบรรยายที่น่าสนใจหลายเรื่องโดยผู้เชี่ยวชาญจากประเทศต่างๆ ซึ่งนอกจากได้รับความรู้เกี่ยวกับการยกระดับคุณภาพของวารสาร และระบบต่างๆ ที่ใช้ในการประเมินคุณภาพวารสารแล้ว หัวข้อหนึ่งที่วารสารระดับนานาชาติทั้งหลายให้ความสำคัญได้แก่ เรื่องระบบการดูแลด้านจริยธรรมที่วารสารทั้งหลายควรมี โดยครอบคลุมทั้งในส่วนของกระบวนการที่ได้มาซึ่งบทความของผู้นิพนธ์ เช่น ถ้าเป็นผลงานจากการวิจัยทางคลินิก ก็ต้องมีหลักฐานว่างานวิจัยนั้นได้ผ่านการอนุญาตจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคนแล้ว หรือหากเป็นผลงานที่ต้องมีการทดสอบในสัตว์ทดลอง ก็ต้องมีหลักฐานว่าได้รับอนุญาตจากคณะกรรมการจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลอง เป็นต้น ตลอดจนการวางระบบเพื่อให้ผู้เชี่ยวชาญทบทวนบทความ แจ้งเรื่องข้อขัดแย้งทางผลประโยชน์ หรือลงนามในข้อตกลงกับทางวารสารเรื่องการรักษาความลับ ก็มีการดำเนินการในบางวารสารเช่นกัน นอกจากนี้ยังมีการแลกเปลี่ยนประสบการณ์เรื่องจรรยาบรรณของบรรณาธิการวารสาร ผู้ทบทวนเอกสาร และผู้นิพนธ์บทความที่พึงมี ซึ่งข้อมูลเหล่านี้ทางกองบรรณาธิการวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์จะนำมาใช้ในการพัฒนาระบบบริหารจัดการของวารสารฯ ต่อไป

นางธีรนารถ จิระไพศาลพงศ์

บรรณาธิการ

คุณลักษณะของอุปกรณ์วัดรังสีไอเอสแอล ชนิดนาโนดอทสำหรับงานรังสีวินิจฉัย

จินดา ทองเรือง สิริชัย เจริญรัตนกุล และวีรชัย ดิสุวรรณ

สำนักรังสีและเครื่องมือแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ได้ดำเนินการศึกษาเพื่อประเมินคุณสมบัติของอุปกรณ์วัดรังสีไอเอสแอลชนิดนาโนดอท (nanoDot) เพื่อใช้ในงานรังสีวินิจฉัยจากเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทั่วไป โดยทำการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของอุปกรณ์วัดรังสี ความเป็นเชิงเส้น การสนองตอบต่อพลังงานด้วยเครื่องเอกซเรย์มาตรฐาน ความเป็นเชิงเส้นทดสอบที่พลังงาน 2 ค่า โดยตั้งค่า mAs อยู่ในช่วง 30-400 และวัดค่าปริมาณรังสีที่ผู้ป่วยได้รับด้วยเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทั่วไป พบว่าความเป็นเนื้อเดียวกันของอุปกรณ์วัดรังสีมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนน้อยกว่าร้อยละ 5 ความเป็นเชิงเส้นทั้ง 2 พลังงานอยู่ในเกณฑ์ที่ดี ($R^2 > 0.99$) การสนองตอบต่อพลังงานที่พลังงาน 60-120 kV มีค่าอยู่ระหว่าง 1.07-0.86 เมื่อเทียบกับที่พลังงาน 80 kV ค่าปริมาณรังสีที่ผิวหนังผู้ป่วยจากการวัดโดยใช้อุปกรณ์วัดรังสีไอเอสแอล ชนิด nanoDot เปรียบเทียบกับปริมาณรังสีจากการวัดและคำนวณตามวิธีการของทบวงการพลังงานปรมาณูระหว่างประเทศ พบว่ามีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังนั้น อุปกรณ์วัดรังสีไอเอสแอลชนิด nanoDot สามารถนำมาใช้ในงานรังสีวินิจฉัยได้

บทนำ

ในแต่ละปีการนำเครื่องรังสีวินิจฉัยและเครื่องรังสีรักษาไปใช้ทางการแพทย์มีปริมาณเพิ่มขึ้น ปริมาณรังสีที่ให้แก่ผู้ป่วยบางครั้งอาจจะเกินค่าที่กำหนด ปริมาณรังสีที่เกินความจำเป็นอาจเป็นอันตรายต่อทั้งบุคลากรผู้ปฏิบัติงานทางด้านรังสี ผู้ป่วย ประชาชนทั่วไป อาจมีผลทำให้ผมร่วง ผิวหนังเป็นผื่นแดง หรืออาจจะมีผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์ได้ ดังนั้น การวัดปริมาณรังสีที่ให้แก่ผู้ป่วยจึงมีความจำเป็น ซึ่งอาจจะเป็นการวัดปริมาณรังสีโดยการวัดโดยตรงและทางอ้อม⁽¹⁾

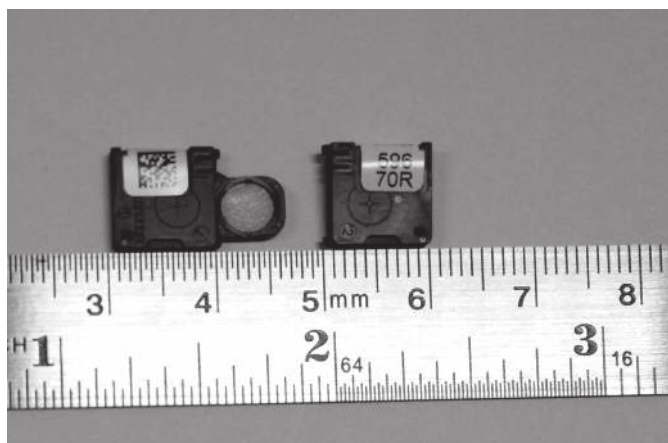
ปัจจุบันเครื่องวัดรังสีมีมากมายหลายชนิด เครื่องอ่านและหัววัดรังสีชนิดต่าง ๆ อาทิ หัววัดรังสีชนิดอากาศแตกตัว (ionization chamber) ไดโอด เซมิคอนดักเตอร์ ทีแอลดี และอุปกรณ์วัดรังสี Optically stimulated luminescence detector (OSLD) ซึ่งอุปกรณ์วัดรังสี Optically stimulated luminescence detector (OSLD) ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการป้องกันรังสีบุคคลมานานหลายปี และปัจจุบันนำมาใช้อย่างแพร่หลายในทางการแพทย์และทางด้านสิ่งแวดล้อม เช่น การใช้ทางด้านรังสีรักษา^(2, 3, 4) และรังสีในสิ่งแวดล้อม⁽⁵⁾ แต่มีจำนวนน้อยที่นำมาใช้ในงานรังสีวินิจฉัย⁽⁶⁾ ข้อดีของอุปกรณ์วัดรังสีโอเอสแอลชนิด nanoDot คือ มีขนาดเล็ก สะดวกในการใช้งาน มีความไวต่อรังสีสูง สามารถวิเคราะห์ค่าปริมาณรังสีซ้ำได้^(7, 8) และราคาถูก การวัดปริมาณรังสีจากเครื่องรังสีวินิจฉัยเพื่อเป็นการป้องกันไม่ให้ผู้ป่วยได้รับปริมาณรังสีเกินความจำเป็น ในการฉายรังสีแต่ละครั้งผู้ป่วยต้องได้รับปริมาณรังสีน้อยที่สุด แต่คุณภาพของภาพถ่ายทางรังสีต้องดีเพื่อที่แพทย์จะวินิจฉัยได้ถูกต้อง^(1, 9)

การศึกษาคุณลักษณะของอุปกรณ์วัดรังสีโอเอสแอลชนิด nanoDot ในงานรังสีวินิจฉัยนั้นมีวัตถุประสงค์เพื่อนำอุปกรณ์วัดรังสีโอเอสแอลชนิด nanoDot มาวัดปริมาณรังสีที่ผู้ป่วยได้รับจากเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทั่วไป โดยใช้อุปกรณ์วัดรังสีโอเอสแอลชนิด nanoDot และเครื่องอ่านปริมาณรังสีโอเอสแอล micro Star ซึ่งจะพิจารณาความเป็นเนื้อเดียวกันของอุปกรณ์วัดรังสีโอเอสแอลชนิด nanoDot (homogeneity study) ความเป็นเชิงเส้น (linearity) การสนองตอบต่อพลังงาน (energy response) เป็นสำคัญ

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือ

1. ระบบโอเอสแอล เป็นของบริษัท Landauer ประกอบด้วย อุปกรณ์วัดรังสีโอเอสแอลชนิด nanoDot ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร หนา 0.3 มิลลิเมตร (ภาพที่ 1) มีปลอกหุ้มกันแสง เครื่องอ่าน micro Star ซึ่งได้รับการควบคุมคุณภาพ และได้รับการสอบเทียบ โดยใช้อุปกรณ์วัดรังสีโอเอสแอลชนิด nanoDot ที่ได้รับการฉายปริมาณรังสีที่ทราบค่า ที่พลังงาน 80 kV อุปกรณ์วัดรังสีโอเอสแอล เป็นผลึกของสารประกอบ $Al_2O_3:C$ (aluminium oxide doped with carbon) ซึ่งมีคุณสมบัติที่เมื่อได้รับพลังงานจากรังสีแล้วจะสะสมพลังงานเอาไว้ เมื่อมีการกระตุ้น ด้วยแสงในความเข้มที่เหมาะสม จากเครื่องอ่าน ผลึกจะคายพลังงานที่ได้รับออกมาในรูปของแสง ปริมาณของแสงที่ปล่อยออกมาจะแปรตามปริมาณรังสีที่ได้รับ อุปกรณ์วัดรังสีโอเอสแอลชนิด nanoDot หลังการฉายรังสีแล้ว 24 ชั่วโมงจะอ่านค่าปริมาณรังสีแต่ละแผ่นจำนวน 3 ครั้ง แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 อุปกรณ์วัดรังสีโอเอสแอลชนิด nanoDot

2. เครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยมาตรฐาน G E Model: Isovolt Titan ซึ่งมีคุณสมบัติของรังสี ที่ RQR2-RQR10 ตาม IAEA TRS no 457 (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของรังสีเอกซ์จากเครื่องเอกซเรย์ GE: Isovolt Titan GE ซึ่งสอดคล้องตาม IAEA TRS no 457

Radiation Quality	X ray tube voltage (kV)	First HVL (mm Al)	Homogeneity Coefficient (h)
RQR2	40	1.42	0.80
RQR3	50	1.78	0.76
RQR4	60	2.20	0.73
RQR5	70	2.58	0.69
RQR6	80	3.00	0.68
RQR7	90	3.48	0.67
RQR8	100	3.95	0.67
RQR9	120	5.00	0.68
RQR10	150	6.57	0.69

3. เครื่องเอกซเรย์วินิจฉัย Toshiba Model: KXO-15 พลังงาน 70-120 kV

4. ชุดตรวจสอบคุณภาพเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัย Unfors Xi External Detector Model: R/F & Mammo

5. solid water phantom ขนาด 30 × 30 เซนติเมตร

วิธีการศึกษา

การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน

นำอุปกรณ์วัดรังสีไอเอสแอล ชนิด nanoDot ที่จะใช้ในการทดสอบจำนวน 40 แผ่น ไปฉายรังสีด้วยเครื่องเอกซเรย์มาตรฐาน G E Model: Isovolt Titan วางบน solid water phantom โดยตั้งที่ 80 kV 50 mAs ที่ระยะ 100 เซนติเมตร จากหลอดเอกซเรย์ แล้วนำไปอ่านค่าปริมาณรังสีด้วยเครื่องอ่านรังสี micro Star และหาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน

การทดสอบความเป็นเชิงเส้น

นำอุปกรณ์วัดรังสีไอเอสแอลชนิด nanoDot ที่จะใช้ในการทดสอบไปฉายรังสีด้วยเครื่องเอกซเรย์มาตรฐาน G E Model: Isovolt Titan ที่ระยะ 100 เซนติเมตร จากหลอดเอกซเรย์ วางบน solid water phantom โดยตั้งที่พลังงาน 80 kV และ 100 kV และตั้งที่ 30, 60, 100, 150, 200, 300 และ 400 mAs แล้วนำไปอ่านค่าปริมาณรังสีด้วยเครื่องอ่านรังสี micro Star แต่ละ kV ใช้นำอุปกรณ์วัดรังสีไอเอสแอล ชนิด nanoDot จำนวน 3 แผ่น

การทดสอบการสนองตอบต่อพลังงาน

นำอุปกรณ์วัดรังสีไอเอสแอลชนิด nanoDot ที่จะใช้ในการทดสอบไปฉายรังสีด้วยเครื่องเอกซเรย์มาตรฐาน GE Model: Isovolt Titan ที่ระยะ 100 เซนติเมตร จากหลอดเอกซเรย์ โดยปริมาณรังสีที่ให้แก่อุปกรณ์วัดรังสีไอเอสแอล ชนิด nanoDot คือ 5 mGy และตั้งที่พลังงาน 60, 70, 80, 90, 100 และ 120 kV แล้วนำอุปกรณ์วัดรังสีไอเอสแอลที่ฉายรังสีแต่ละพลังงานไปอ่านค่าปริมาณรังสีด้วยเครื่องอ่านรังสี micro Star แต่ละ kV ใช้นำอุปกรณ์วัดรังสีไอเอสแอลชนิด nanoDot จำนวน 3 แผ่น

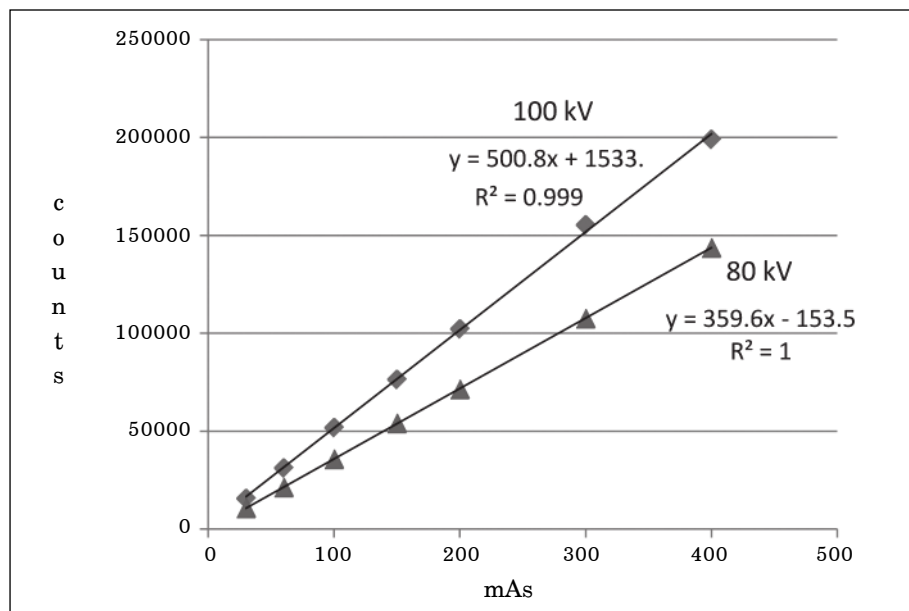
การวัดและเปรียบเทียบปริมาณรังสีที่ผิวหนังผู้ป่วย

นำอุปกรณ์วัดรังสีโอเอสแอล ชนิด nanoDot ที่ใช้ในการทดสอบไปฉายรังสีด้วยเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัย Toshiba Model: KXO-15 ซึ่งผ่านการตรวจสอบคุณภาพตามข้อปฏิบัติการควบคุมคุณภาพเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัย⁽¹⁰⁾ โดยใช้ solid water phantom ขนาด 30 × 30 เซนติเมตร เพื่อให้ได้ค่าปริมาณรังสีที่เทคนิคต่าง ๆ 5 เทคนิค คือ 70 kV 50 mAs, 76 kV 24 mAs, 80 kV 28 mAs, 82 kV 6 mAs และ 90 kV 10 mAs โดยแต่ละเทคนิคจะใช้อุปกรณ์วัดรังสีโอเอสแอล ชนิด nanoDot จำนวน 3 แผ่น แล้วนำไปอ่านค่าปริมาณรังสีด้วยเครื่องอ่านรังสี microStar แล้วหาค่าเฉลี่ย และเทคนิคเดียวกันก็ใช้ชุดตรวจสอบคุณภาพเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัย Unfors วัดและคำนวณปริมาณรังสีที่ผิวหนังผู้ป่วยตามวิธีการของ IAEA⁽¹⁾ นำค่าปริมาณรังสีที่ได้จากทั้ง 2 วิธีมาเปรียบเทียบกัน โดยใช้ paired t-test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผล

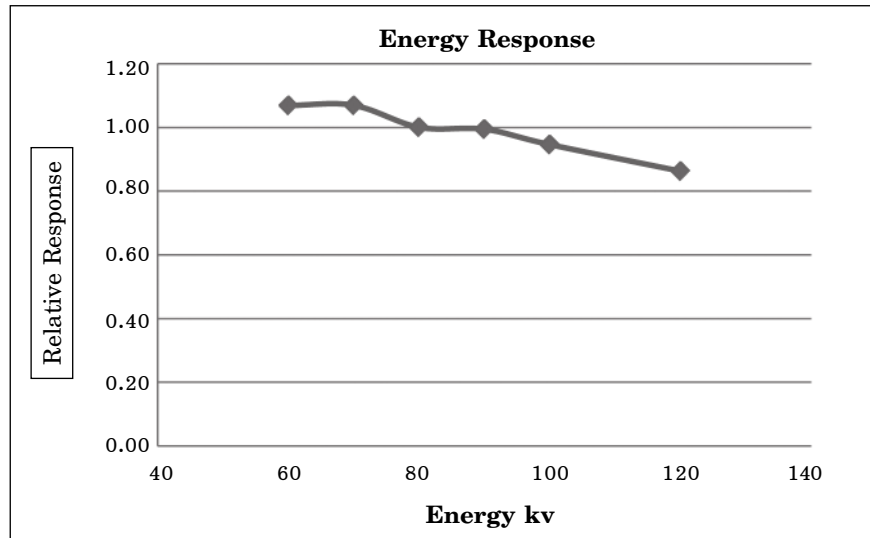
ผลจากการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน โดยทดสอบที่ พลังงาน 80 kV จากการทดสอบอุปกรณ์วัดรังสีโอเอสแอล ชนิด nanoDot จำนวน 40 แผ่น ได้ค่าเฉลี่ย 39,388 counts ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 618.89 และได้ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนร้อยละ 1.57

ในการทดสอบความเป็นเชิงเส้น อุปกรณ์วัดรังสีโอเอสแอล ชนิด nanoDot ที่พลังงาน 80 kV และ 100 kV พบว่า อยู่ในเกณฑ์ที่ดี ได้ค่า $R^2 > 0.99$ (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 ความเป็นเชิงเส้นของอุปกรณ์วัดรังสีโอเอสแอล ชนิด nanoDot ที่พลังงาน 80 และ 100 kV

การทดสอบการสนองตอบต่อพลังงานด้วยการทดสอบอุปกรณ์วัดรังสีโอเอสแอล ชนิด nanoDot ที่พลังงาน 60, 70, 80, 90, 100 และ 120 kV ได้ค่า relative response ต่าง ๆ คืออยู่ระหว่าง 1.07-0.86 เมื่อเทียบกับที่พลังงาน 80 kV แสดงไว้ใน (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 แสดงการตอบสนองต่อพลังงานของอุปกรณ์วัดรังสีโอเอสแอล ชนิด nanoDot

สำหรับการวัดและเปรียบเทียบปริมาณรังสีที่ผิวผู้ป่วย จากการวัดปริมาณรังสีที่ผิวผู้ป่วยตามเทคนิคต่าง ๆ ด้วยอุปกรณ์วัดรังสีโอเอสแอล ชนิด nanoDot เมื่อนำค่าปริมาณรังสีมาเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการวัดโดยใช้ชุดตรวจสอบคุณภาพเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัย Unfors และคำนวณค่าปริมาณรังสีตามวิธีการของ IAEA⁽¹⁾ จะได้ค่าปริมาณรังสีแตกต่างกันไม่เกินร้อยละ 6 (ตารางที่ 2) และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางที่ 2 ค่าปริมาณรังสีที่ผิวผู้ป่วยตามแต่ละเทคนิค

kV	mAs	ESD _{OSL} (mGy)	ESAK _{IAEA} (mGy)	ESD _{OSL} /ESAK _{IAEA}
70	50	3.635	3.47	1.048
76	24	1.976	1.96	1.007
80	28	2.702	2.52	1.058
82	6	0.574	0.55	1.044
90	10	1.151	1.10	1.046

วิจารณ์

การศึกษาคูณลักษณะของอุปกรณ์วัดรังสีโอเอสแอลชนิด nanoDot เพื่อที่จะนำมาใช้ในงานรังสีวินิจฉัย โดยการศึกษาความเป็นเนื้อเดียวกันของอุปกรณ์วัดรังสี ความเป็นเชิงเส้น การตอบสนองต่อพลังงานและปริมาณรังสีที่ผิวผู้ป่วยนั้น ความเป็นเนื้อเดียวกันของอุปกรณ์มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนน้อยกว่าร้อยละ 5 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Al Senan RM, Hatab MR⁽¹¹⁾ ความเป็นเชิงเส้นที่พลังงานทั้ง 2 ระดับ คือ พลังงาน 80 และ 100 kV พบว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ดีมีค่า $R^2 > 0.99$ สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Muhammad Yusuf *et al.*⁽⁶⁾ Al Senan RM, Hatab MR⁽¹¹⁾ และ Denzer *et al.*⁽¹²⁾ ซึ่งได้ศึกษาในงานรังสีรักษา สำหรับการตอบสนองต่อพลังงานของอุปกรณ์วัดรังสีเมื่อทำการทดสอบที่พลังงาน 60-120 kV แล้วเทียบกับพลังงาน 80 kV จะได้ค่า relative response (ภาพที่ 3) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Christopher A Perks *et al.*⁽⁸⁾

เมื่อนำอุปกรณ์วัดรังสีไอเอสแอล ชนิด nanoDot มาวัดปริมาณรังสีจากเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทั่วไปหัตถ์โตชิบา ซึ่งผ่านการตรวจสอบคุณภาพตามข้อปฏิบัติการควบคุมคุณภาพเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัย แล้วเปรียบเทียบกับปริมาณรังสีที่ได้จากการคำนวณตามวิธีการ IAEA นั้น จะพบว่าค่าปริมาณรังสีที่ได้มีความแตกต่างกันไม่เกินร้อยละ 6 (ตารางที่ 2) และเมื่อนำค่าปริมาณรังสีทั้ง 2 วิธีมาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้ paired t-test แล้วพบว่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ซึ่งปริมาณรังสีที่ต่างกันนั้นอาจเนื่องมาจากวิธีการของ IAEA นั้นมีค่า back scatter factor (BSF) ที่ได้มาจากการศึกษาที่ระยะโฟกัสถึงผิวหนังผู้ป่วยที่ 100 เซนติเมตร⁽¹⁾ แต่การใช้อุปกรณ์วัดรังสีไอเอสแอล ชนิด nanoDot จะเป็นการวัดโดยตรงซึ่งค่าปริมาณรังสีที่วัดได้เป็นค่าที่รวมค่า back scatter factor (BSF) แล้ว และยังพบว่าปริมาณรังสีที่ได้จากการวัดโดยตรงจะมีค่ามากกว่าที่ได้จากการคำนวณ อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาคุณลักษณะของอุปกรณ์วัดรังสีไอเอสแอล ชนิด nanoDot แล้ว สามารถนำมาใช้ในการวัดปริมาณรังสีในงานรังสีวินิจฉัยจากเครื่องเอกซเรย์ทั่วไปได้

ในอนาคตอาจจะใช้อุปกรณ์วัดรังสีชนิดนี้ ในการประกันคุณภาพหรือยืนยันปริมาณรังสีที่ให้แก่ผู้ป่วยจากเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทั่วไป เพื่อเป็นการยืนยันว่าประชาชนที่มารับบริการจากเครื่องเอกซเรย์เหล่านั้นได้รับปริมาณรังสีที่เหมาะสม ไม่มากเกินไปจนเป็นอันตราย ซึ่งก็จะเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคอีกด้วย นอกจากนี้อาจจะใช้อุปกรณ์วัดรังสีไอเอสแอล ชนิด nanoDot นี้ เพื่อดำเนินการทดสอบความชำนาญในการวัดปริมาณรังสีจากเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยได้เช่นกัน

สรุป

อุปกรณ์วัดรังสีไอเอสแอล ชนิด nanoDot มีคุณสมบัติความเป็นเนื้อเดียวกัน ความเป็นเชิงเส้น ในช่วงพลังงานงานรังสีวินิจฉัยที่ดี และเมื่อนำมาวัดปริมาณรังสีที่ผิวหนังผู้ป่วยโดยเทียบกับวิธีการวัดและคำนวณตามวิธีของ IAEA พบว่าปริมาณรังสีที่ได้จากทั้ง 2 วิธีมีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้น อุปกรณ์ชนิดนี้สามารถนำมาใช้ในงานรังสีวินิจฉัยเพื่อวัดปริมาณรังสีที่ผิวหนังผู้ป่วยจากเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยโรคทั่วไปได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนักฟิสิกส์รังสีกลุ่มรังสี กลุ่มมาตรวิทยาทางรังสี และเจ้าหน้าที่สำนักรังสีและเครื่องมือแพทย์ทุกท่านที่ทำให้การดำเนินการครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. International Atomic Energy Agency. Dosimetry in diagnostic radiology: an international code of practice. Technical reports series no. 457. Vienna: IAEA; 2007.
2. Jursinic PA. Characterization of optically stimulated luminescent dosimeters, OSLDs, for clinical dosimetric measurements. Med Phys 2007; 34(12): 4594-604.
3. Lehmann J, Dunn L, Lye JE, Kenny JW, Alves AD, Cole A, et al. Angular dependence of the response of the nanoDot OSLD system for measurements at depth in clinical megavoltage beams. Med Phys 2014; 41(6): 061712 [1-9].
4. Viamonte A, da Rosa LA, Buckley LA, Cherpak A, Cygler JE. Radiotherapy dosimetry using a commercial OSL system. Med Phys 2008; 35(4):1261-6.
5. Kobayashi I, Okazaki T, Yajima K, Yasuda H. Environmental radiation dosimetry by the small OSL reader. Progress Nucl Sci Technol 2012; 3: 79-81.

6. Yusuf M, Saoudi A, Alothmany N, Alothmany D, Natto H, Natto S, et al. Characterization of the optically stimulated luminescence nanoDot for CT dosimetry. *Life Sci J* 2014; 11(2): 445-50.
7. Endo A, Katoh T, Vasudeva SB, Kobayashi I, Okano T. A preliminary study to determine the diagnostic reference level using dose-area product for limited-area cone beam CT. *Dentomaxillofac Radiol* 2013; 42(4): 20120097 [1-6].
8. Perks CA, Yahnke C, Million M. Medical dosimetry using optically stimulated luminescence dots and micro Star reader. [online]. [10 screens]. Available from: URL: http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/40/108/40108739.pdf
9. International Commission on Radiological Protection. Recommendations of the international commission on radiological protection, ICRP publication 103. UK: ICRP; 2007.
10. กองรังสีและเครื่องมือแพทย์. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. ประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เรื่อง ข้อปฏิบัติการควบคุมคุณภาพเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัย. [ออนไลน์]. 2550 [22 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <http://www.dmsc.moph.go.th/dmsc/userfiles/files/QAXray.pdf>
11. Al-Senan RM, Hatab MR. Characteristics of an OSLD in the diagnostic energy range. *Med Phys* 2011; 38(7): 4396-405.
12. Danzer J, Dudney C, Seibert R, Robinson B, Harris C, Ramsey C. Optically stimulated luminescence of aluminum oxide detectors for radiation therapy quality assurance. 49th Annual Meeting of the AAPM; 2007 Jul 22-26. Minneapolis, Minnesota: AAPM; 2007.

Characterization of an Optically Stimulated Luminescence NanoDot Dosimeters for Diagnostic Radiology

Chinda Tongruang Sirichai Theirrattanakul and Werachai Diswath

Bureau of Radiation and Medical Devices, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand.

ABSTRACT Characterization of an optically stimulated luminescence, nanoDot dosimeters, using in conventional diagnostic radiology was evaluated. The homogeneity, linearity and energy response of the nanoDot dosimeters were tested by using GE standard x-ray generator. For the linearity, two energies were tested with a range of mAs from 30 to 400. The entrance skin dose was measured and compared with the data obtained with detector, IAEA protocol, using diagnostic conventional x-ray generator. Batch homogeneity showed a coefficient of variation of < 5%. Linearity results at both energies showed good linearity ($R^2 > 0.99$). Energy response study showed a range of ratios between 1.07 and 0.86, at the energies investigated 60–120 kV. Dose difference between the dose measurements using nanoDot dosimeters and the dose calculated by using IAEA protocol showed no significant variation at a confidence level of 95%. The optically stimulated luminescence nanoDot dosimeters can be used in diagnostic radiography.

การตรวจหาสารพันธุกรรมตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ในผลิตภัณฑ์วัคซีนไวรัสโดยวิธี Real-time Polymerase Chain Reaction

สุกัลยาณี ไชยมี สมปอง ทรัพย์สุทธิภาสน์ จิรเดช ปัจฉิม และสุภาพร ภูมิอมร

สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ เซลล์เพาะเลี้ยง Vero เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่อเนื่องที่นำมาใช้ในการผลิตวัคซีนไวรัสหลายชนิดเนื่องจากมีความปลอดภัย ไม่ก่อให้เกิดมะเร็งและการติดเชื้อไวรัสแอบแฝง ทั้งนี้ขึ้นกับกระบวนการผลิต การทำให้บริสุทธิ์ และการตรวจสอบควบคุมคุณภาพที่ดี โดยปัจจุบันองค์การอนามัยโลกให้การยอมรับปริมาณ DNA ตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยงไม่เกิน 10 นาโนกรัมต่อโดสในผลิตภัณฑ์วัคซีน สถาบันชีววัตถุจึงได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์หา DNA ตกค้างในวัคซีนด้วยวิธี Real-time PCR โดยตรวจหาปริมาณ DNA ตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ในตัวอย่างวัคซีนไวรัสสำเร็จรูปจำนวน 16 ตัวอย่าง และตรวจสอบความถูกต้องของวิธีในพารามิเตอร์ต่างๆ ผลการศึกษาพบว่าทุกตัวอย่างมีปริมาณ DNA ตกค้างอยู่ระหว่าง 0.49-4.48 นาโนกรัมต่อโดส ซึ่งต่ำกว่าเกณฑ์กำหนด เมื่อตรวจสอบความถูกต้องของวิธีพบว่า การทดสอบความเป็นเส้นตรง และช่วงการวิเคราะห์มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มากกว่า 0.990 ในทุกชุดการทดสอบ โดยช่วงวิเคราะห์ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 0.03-3,000 พิกोगรามต่อปฏิกิริยา วิธีมีความแม่นยำที่ดี สามารถตรวจหา DNA ตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ที่เติมลงไปในตัวทำลายวัคซีนได้ โดยมีค่าการคืนกลับที่ร้อยละ 87 มีความเที่ยงของวิธีดีเมื่อทำการทดสอบในวันและเวลาเดียวกัน มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนไม่เกินร้อยละ 25 และในการทดสอบความคงทนของวิธี ซึ่งใช้ผู้วิเคราะห์ 2 คน พบว่าผลในการวิเคราะห์หาปริมาณสารพันธุกรรมตกค้างมีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนรวมไม่เกินร้อยละ 25 แสดงว่าวิธีมีความคงทนดี สรุปได้ว่าวิธี Real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้ เมื่อนำมาใช้ตรวจวิเคราะห์หา DNA ตกค้างในผลิตภัณฑ์วัคซีนเป็นวิธีที่มีความเป็นเส้นตรง ความแม่นยำ ความเที่ยง และความคงทนของวิธีดี

บทนำ

เซลล์เพาะเลี้ยง Vero เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่อเนื่อง (Continuous cell lineage) ที่เตรียมมาจากเซลล์ไต (kidney epithelial cell) ลิง African green monkey⁽¹⁾ สามารถเพาะเลี้ยงได้ง่ายในห้องปฏิบัติการ เซลล์เพาะเลี้ยงชนิดนี้ได้ถูกนำมาใช้ในการผลิตวัคซีนไวรัสเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1980 และองค์การอนามัยโลกได้รับรองว่าเป็นเซลล์ที่สามารถนำมาใช้เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงในการผลิตวัคซีนสำหรับมนุษย์ได้⁽²⁾ ปัจจุบันเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ได้ถูกนำมาใช้ในการผลิตวัคซีนไวรัสอย่างแพร่หลาย ได้แก่ วัคซีนป้องกันโรคโปลิโอ วัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า วัคซีนป้องกันโรคไขสมองอักเสบเจอี วัคซีนไวรัสโรตา และวัคซีนป้องกันโรคไวรัสตับอักเสบบี เป็นต้น วัคซีนไวรัสต่างๆ เหล่านี้บางชนิดมีการนำมาจำหน่ายภายในประเทศไทยและใช้ในแผนสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคในปัจจุบัน เช่น วัคซีนป้องกันโรคไขสมองอักเสบเจอีทั้งชนิดเชื้อตาย บางชนิดกำลังพัฒนาเพื่อการผลิตและจำหน่ายในอนาคต เช่น วัคซีนป้องกันโรคไขสมองอักเสบเจอีชนิดเชื้อเป็น อย่างไรก็ตาม ถือว่าประเทศไทยยังไม่มีประสบการณ์ในการผลิตวัคซีนโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อจำหน่ายตั้งแต่ต้นน้ำจนถึงปลายน้ำ และเนื่องจากเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดนี้เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่อเนื่อง ในดีเอ็นเอ (Deoxyribonucleic acid, DNA) ของเซลล์จึงมียีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งอยู่ ซึ่งหากในกระบวนการผลิตมีการกำจัดออกได้ไม่หมด และมีปริมาณ DNA ของเซลล์ตกค้าง (Residual DNA) ในผลิตภัณฑ์วัคซีนมากเกินไปอาจทำให้ผู้รับวัคซีนมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งได้⁽³⁾ นอกจากนี้ยังมีความเสี่ยงจากการติดเชื้อไวรัสแอบแฝง ซึ่งเป็นไวรัสประเภทที่มีการเพิ่มจำนวนโดยการแทรกสารพันธุกรรมเข้ากับเซลล์เจ้าบ้าน เช่น ไวรัสก่อโรคเอดส์ ไวรัสก่อโรคเริม ซึ่งอาจแฝงมากับ DNA ตกค้างจากเซลล์เพาะเลี้ยงได้ ดังนั้น ในการผลิตวัคซีนไวรัสผู้ผลิตจึงมีความจำเป็นต้องตรวจสอบการปนเปื้อน DNA ตกค้างทั้งในขั้นตอนการผลิตจนถึงผลิตภัณฑ์วัคซีนสำเร็จรูปเพื่อให้มั่นใจว่าในผลิตภัณฑ์วัคซีนมีปริมาณ DNA ตกค้างจากเซลล์เพาะเลี้ยงไม่มากเกินไปเกินที่กำหนด โดยองค์การอนามัยโลกได้กำหนดมาตรฐานของปริมาณ DNA ตกค้างไว้ที่ไม่เกิน 10 นาโนกรัมต่อโดส⁽⁴⁾ สำหรับวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารพันธุกรรมตกค้างในกระบวนการผลิต และในผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปมีหลายวิธี เช่น วิธี Pico Green method⁽⁵⁾ วิธี hybridization⁽⁶⁾ วิธี Threshold⁽⁷⁾ และวิธีปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรสในสภาพจริง (Real-time Polymerase Chain Reaction, Real-time PCR)⁽⁸⁾ ซึ่งวิธีการเหล่านี้เป็นวิธีการที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในผู้ผลิตวัคซีนที่มีการใช้เซลล์เพาะเลี้ยงในการผลิต (cell-based vaccine) โดยผู้ผลิตจะเลือกใช้วิธีที่มีความไว (sensitivity) และเหมาะสมกับขั้นตอนการผลิต จนได้เป็นผลิตภัณฑ์วัคซีนสำเร็จรูป⁽⁸⁾ อย่างไรก็ตาม วิธีการเหล่านี้ยังไม่ได้ถูกกำหนดเป็นวิธีมาตรฐานของประเทศ และยังไม่ได้มีการนำมาใช้ในการควบคุมคุณภาพวัคซีนในหน่วยงานควบคุมกำกับภาครัฐ สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณ DNA ตกค้างโดยวิธี Real-time PCR มีผู้ทำการศึกษาไว้โดยมีการศึกษาความถูกต้องของวิธีในพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ การตรวจสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (linearity and range) การทดสอบความแม่นยำ (accuracy) การทดสอบความเที่ยง (precision) การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) และขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) ในการตรวจหา DNA ตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง CHO (Chinese Hamster Ovary cells) และเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ในผลิตภัณฑ์ชีววัตถุเพื่อการรักษา (biopharmaceutical products)^(9, 10) พบว่าเป็นวิธีที่มีความถูกต้องสามารถใช้ได้ดี มีความไว มีความจำเพาะ และใช้ระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์สั้น และสามารถตรวจวิเคราะห์ได้หลายตัวอย่างในเวลาเดียวกัน การศึกษาวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะพัฒนาวิธีการตรวจหา DNA ตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ในผลิตภัณฑ์วัคซีนไวรัส และศึกษาความถูกต้องของวิธี Real-time PCR เพื่อนำวิธีดังกล่าวมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานของประเทศต่อไป

วัสดุและวิธีการ

วัคซีนตัวอย่าง

ตัวอย่างวัคซีนที่นำมาทดสอบเป็นวัคซีนไวรัสสำเร็จรูปซึ่งมีการใช้เซลล์ Vero เป็นวัตถุดิบในการผลิต และนำมาส่งตรวจเพื่อขอรับรองรุ่นการผลิตในประเทศกับสถาบันชีววัตถุทั้งหมดจำนวน 16 ตัวอย่าง ได้แก่ วัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าจำนวน 11 ตัวอย่าง ในจำนวนนี้เป็นวัคซีนที่ผลิตในประเทศ 10 ตัวอย่าง และนำเข้า 1 ตัวอย่าง วัคซีนป้องกันโรคไข้มองอึกเสบเจือชนิดเชื้อเป็นซึ่งเป็นวัคซีนนำเข้าจำนวน 4 ตัวอย่าง และวัคซีนรวม คอตีบ บาดทะยัก ไอกรณชนิดไม่มีเซลล์ โปลิโอชนิดฉีด อีบี และดับอักเสบบี (DTaP+IPV+HIB+HBV) ซึ่งเป็นวัคซีนนำเข้าจำนวน 1 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นวัคซีนที่มีการใช้เซลล์ Vero ในการผลิต และนำมาส่งตรวจเพื่อขอรับรองรุ่นการผลิตในประเทศกับสถาบันชีววัตถุ

การสกัด DNA ของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero จากตัวอย่างวัคซีน

ละลายตัวอย่างวัคซีนด้วยตัวทำละลายสำหรับวัคซีนชนิดนั้น ๆ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วสกัด DNA ของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero โดยใช้ชุดน้ำยาสกัด DNA สำเร็จรูป PrepSEQ® Residual DNA sample preparation kit (Life Technologies, Applied biosystems®, USA) โดยนำตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับ proteinase K buffer/proteinase K mix ปริมาตร 70 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ปลอຍให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง เติมน lysis buffer ปริมาตร 360 ไมโครลิตร เติมน magnetic particle ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และ binding solution ปริมาตร 400 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นปั่นผสม นาน 5 นาที นำไปปั่นตกอย่างรวดเร็ว เป็นเวลา 15 วินาที นำหลอดตัวอย่างไปตั้งบน magnetic stand นาน 5 นาที ดูดส่วนใส (supernatant) ทิ้ง หลังจากนั้นล้าง DNA ด้วย wash solution ปริมาตร 300 ไมโครลิตร จำนวน 2 ครั้ง และใส่ elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที จากนั้นปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที ดูดส่วนใส (eluted DNA) ซึ่งเป็นสารสกัด DNA นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ในการทดสอบต่อไป

การตรวจหาปริมาณ DNA ตกค้างของเซลล์ Vero โดยวิธี Real-time PCR

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารพันธุกรรมตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero โดยใช้ resDNASEQ® Quantitative DNA kits (Life Technologies, Applied biosystems®, USA) ซึ่งการเตรียมปฏิกิริยาทำโดยผสม DNA ตัวอย่างที่ได้จากการสกัด ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงใน reaction mix (ประกอบด้วย 10x primer/probe mix, 2x environmental master mix และน้ำกลั่น) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน MicroAmp® Fast optical 96-well reaction plates โดย 1 ตัวอย่างจะทำ 3 ซ้ำ (หยอดตัวอย่างจำนวน 3 หลุมต่อ 1 ตัวอย่าง) จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม Applied Biosystems 7500 Fast instrument (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) และวิเคราะห์ผลการทดสอบโดยใช้ Applied Biosystems® 7500 System SDS Software ค่าจากการคำนวณโดยโปรแกรมที่ได้จะเป็นค่าเฉลี่ยจากจำนวน 3 ซ้ำของตัวอย่าง

การสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) เพื่อใช้หาปริมาณ DNA ตกค้างของเซลล์ Vero ในผลิตภัณฑ์วัคซีนไวรัสสำเร็จรูป

การสร้างกราฟมาตรฐานทำโดยเจือจาง DNA ควบคุมของเซลล์ Vero (Vero cell DNA control) ที่มีอยู่ในชุดน้ำยาสกัด resDNASEQ® Quantitative DNA Kits Part No. 4458444, Applied Biosystems ตั้งแต่ 3 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา - 30 เฟมโตกรัมต่อปฏิกิริยา โดยทำปฏิกิริยาของ DNA ควบคุมทุกครั้งที่มีการทดสอบ และ

จะต้องมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; R^2) มากกว่า 0.98 สำหรับผลลบควบคุมจาก Negative Extraction Control (NEG) ใช้เป็น blank sample ซึ่งในการทดสอบนี้ใช้ตัวทำละลายวัคซีน (vaccine diluent) โดยการสกัดด้วย PrepSEQ® Residual DNA sample preparation kit (Life Technologies, Applied biosystems®, USA) ไปพร้อมกับตัวอย่าง เพื่อยืนยันว่าในน้ำยาที่ใช้สกัด DNA ไม่มี DNA ปนเปื้อนมา ส่วน Extraction/Recovery Control (ERC) ทำโดยเติม DNA ควบคุม ปริมาตร 10 พิโคกรัม ลงในตัวทำละลายวัคซีน จากนั้นทำการสกัดและทำปฏิกิริยาไปพร้อมกับตัวอย่าง เพื่อดูประสิทธิภาพของการสกัด DNA และการคืนกลับ (recovery) ของ DNA นอกจากนี้ในชุดทดสอบ resDNASEQ® Quantitative DNA kits ยังมี Internal Positive Control (IPC) ซึ่งเป็น DNA ที่มีลำดับเบสไม่ซ้ำกับ DNA ของเซลล์ Vero ผสมรวมอยู่ใน 2x environmental master mix ซึ่งจะควบคุมการทำปฏิกิริยาทุกครั้งของการทดสอบว่ามีประสิทธิภาพหรือไม่

การทดสอบความถูกต้องของวิธี

การตรวจสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (Linearity and Range)

การตรวจสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบของวิธี ทำการทดสอบใน MicroAmp® Fast Optical 96-well Reaction Plates โดยเริ่มจากเตรียม DNA ควบคุม ที่มีความเข้มข้น 3,000, 300, 30, 3, 0.3 และ 0.03 พิโคกรัมต่อหลุม ตามลำดับ จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารพันธุกรรมตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ด้วยวิธี Real-time PCR โดยแต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 3 ครั้ง เครื่องจะทำการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่า cycle threshold (Ct) กับความเข้มข้นของ DNA ควบคุม และวิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ออกมา ซึ่งต้องมีค่ามากกว่า 0.990

การตรวจสอบความแม่นยำของวิธี (Accuracy)

เพื่อตรวจสอบความแม่นยำของวิธี โดยตรวจสอบค่าการคืนกลับ (% recovery) ซึ่งดำเนินการทดสอบโดยวิธีเติม Vero cell DNA control จำนวน 10 พิโคกรัม ลงในตัวทำละลายวัคซีน โดยทำการทดสอบ 3 ซ้ำ ที่เป็นอิสระต่อกัน ผสมให้เข้ากัน จากนั้นทำการสกัด DNA และตรวจหาปริมาณ Vero cell DNA ผลที่ได้นำมาวิเคราะห์หาค่าการคืนกลับ ซึ่งควรมีค่าอยู่ในช่วง 80-120% โดยคำนวณค่าการคืนกลับ ดังนี้

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(\text{ปริมาณ Vero cell DNA ที่วัดได้} - \text{ปริมาณ Vero cell DNA จากตัวทำละลายวัคซีน}) \times 100}{\text{ค่าจริงของปริมาณ Vero DNA control}}$$

การตรวจสอบความเที่ยงของวิธี (Precision)

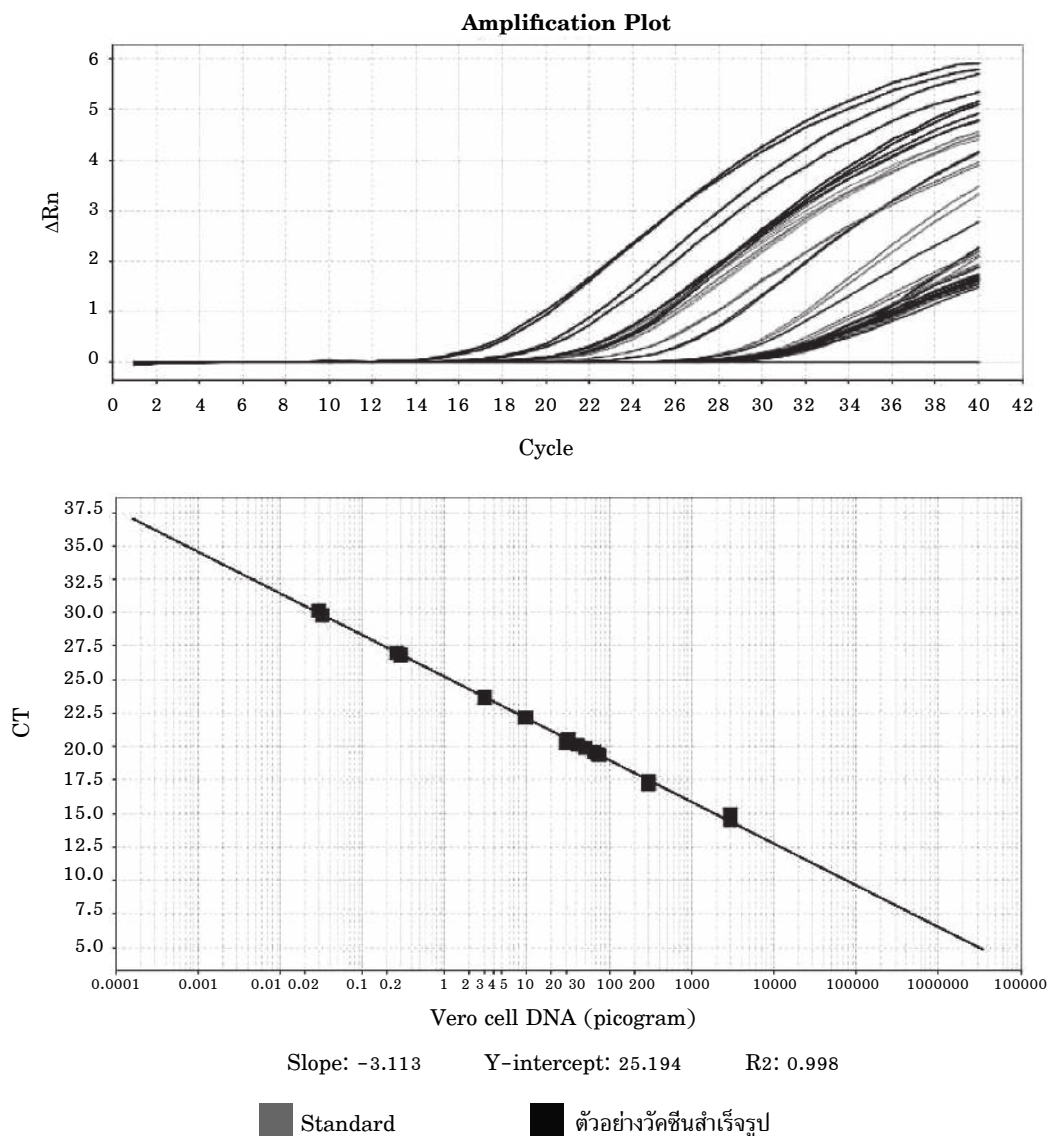
การตรวจสอบความเที่ยงของวิธี โดยทำการตรวจหา DNA ตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ในผลิตภัณฑ์วัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าจำนวน 3 รุ่นการผลิต ในวันและเวลาเดียวกัน 3 ครั้ง แล้วนำผลการทดสอบที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% geometric coefficient of variation, GCV) ซึ่งควรมีค่าไม่เกิน 25%

การทดสอบความคงทนของวิธี (Robustness)

การทดสอบความคงทนของวิธี ทำโดยการทดสอบหาปริมาณ Vero cell DNA ในผลิตภัณฑ์วัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าจำนวน 1 รุ่นการผลิต โดยผู้วิเคราะห์ 2 คน คนละ 3 ซ้ำ แล้วนำผลการทดสอบมาวิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน ซึ่งควรมีค่าไม่เกิน 25%

ผล

จากการตรวจหาปริมาณ DNA ตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ในผลิตภัณฑ์วัคซีนไวรัสสำเร็จรูป จำนวน 16 ตัวอย่าง ได้แก่ วัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า วัคซีนป้องกันโรคไข้มองอักเสบเชื้อเป็น และวัคซีนรวม คอตีบ บาดทะยัก ไอกรน ชนิดไม่มีเซลล์ โปลิโอชนิดฉีด อีบ ตั้วอักเสบบี (DTaP+IPV+HIB+HBV) ด้วยวิธี Real-time PCR ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ปริมาณ DNA ตกค้างจากกราฟมาตรฐาน (ภาพที่ 1) จากผลการทดลองพบว่าปริมาณสารพันธุกรรมที่ตรวจพบในทุกตัวอย่างมีปริมาณที่ต่ำมากอยู่ระหว่าง 0.49 – 4.48 นาโนกรัม/โดส (ตารางที่ 1) และปริมาณของ DNA ที่ตรวจพบในแต่ละรุ่นการผลิตของวัคซีนชนิดเดียวกัน หรือต่างชนิดกันให้ปริมาณสารพันธุกรรมตกค้างที่แตกต่างกันไป แต่ค่าที่ได้ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดโดยองค์การอนามัยโลก



ภาพที่ 1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ตรวจวัดได้ (ΔRn) กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา (บน) และผลการวิเคราะห์ปริมาณ DNA ตกค้าง ของวัคซีนไวรัสสำเร็จรูป จำนวน 16 ตัวอย่าง จากกราฟมาตรฐานซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า cycle threshold (C_t) กับปริมาณของ Vero cell DNA control ที่ระดับความเข้มข้น 3,000, 300, 30, 3, 0.3 และ 0.03 พิโคกรัมต่อปฏิกิริยา ด้วยวิธี Real-time PCR (ล่าง)

ตารางที่ 1 การตรวจหาปริมาณ DNA ตกค้างของเซลล์ Vero ในผลิตภัณฑ์วัคซีนไวรัสสำเร็จรูปโดยวิธี Real-time PCR

ลำดับที่	ตัวอย่าง	แหล่งผลิต**	ปริมาณ DNA ตกค้างของเซลล์ เพาะเลี้ยง Vero (นาโนกรัมต่อโดส)
1	วัคซีนพิษสุนัขบ้า 1	L	1.15
2	วัคซีนพิษสุนัขบ้า 2	L	0.68
3	วัคซีนพิษสุนัขบ้า 3	L	1.85
4	วัคซีนพิษสุนัขบ้า 4	L	1.73
5	วัคซีนพิษสุนัขบ้า 5	L	0.49
6	วัคซีนพิษสุนัขบ้า 6	L	1.76
7	วัคซีนพิษสุนัขบ้า 7	L	3.36
8	วัคซีนพิษสุนัขบ้า 8	L	0.24
9	วัคซีนพิษสุนัขบ้า 9	L	0.67
10	วัคซีนพิษสุนัขบ้า 10	L	1.84
11	วัคซีนพิษสุนัขบ้า 11	I	<0.0015*
12	วัคซีนไขสมองอักเสบเจอี 1	I	< 0.00075
13	วัคซีนไขสมองอักเสบเจอี 2	I	< 0.00075
14	วัคซีนไขสมองอักเสบเจอี 3	I	0.0015
15	วัคซีนไขสมองอักเสบเจอี 4	I	0.0042
16	วัคซีนรวมคอตีบ บาดทะยัก ไอกรณชนิดไม่มีเซลล์ โพลีโอชนิดฉีด อีบี และตับอักเสบบี (DTaP+IPV+HIB+HBV)	I	<0.00075

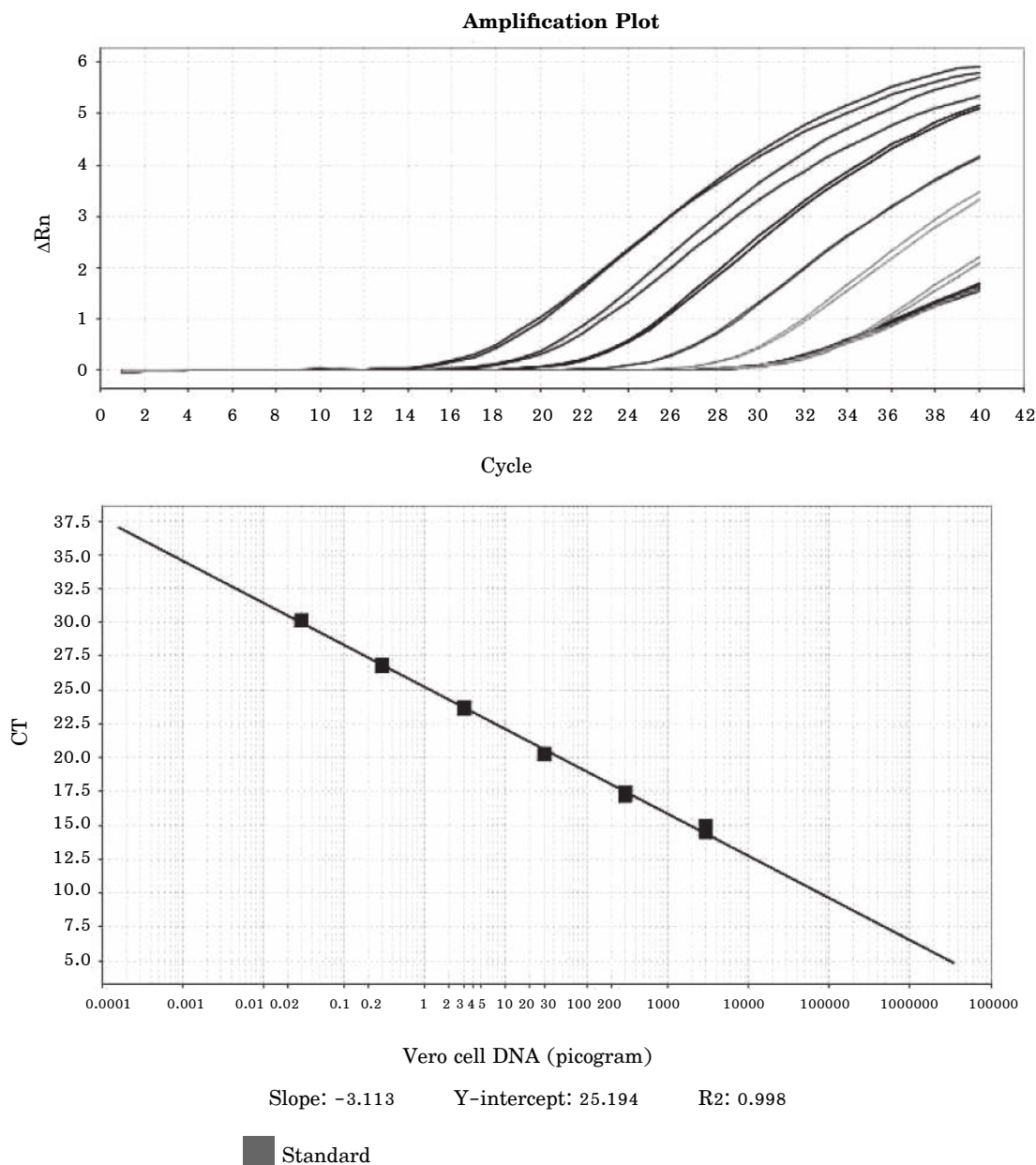
* ตัวอย่างวัคซีนทุกตัวอย่างมีปริมาตรบรรจุ 500 ไมโครลิตรต่อโดส ยกเว้นตัวอย่างที่ 15 มีปริมาตรบรรจุ 1 มิลลิลิตรต่อโดส และขีดจำกัดของการวิเคราะห์ (limit of detection: LOD) ของชุดทดสอบ resDNASEQ® Quantitative Vero DNA เท่ากับ 0.0015 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

** L: หมายถึงวัคซีนที่ผลิตในประเทศ (Local vaccine) และ I: หมายถึงวัคซีนที่นำเข้าจากต่างประเทศ (Imported vaccine)

ผลการตรวจสอบความถูกต้องวิธี

การตรวจสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์

จากการตรวจสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ของกราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณ DNA ตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero โดยใช้ DNA ควบคุม ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โปรแกรมจะคำนวณและสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ตรวจวัดได้ (ΔR_n) กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา (amplification plot) และสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่า cycle threshold (Ct) กับความเข้มข้นของ DNA ควบคุม (ภาพที่ 2) พบว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของวิธีอยู่ที่ 0.998, 0.999 และ 0.999 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) เครื่องจะทำการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่า cycle threshold (Ct) กับความเข้มข้นของ DNA ควบคุม และวิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ออกมา ซึ่งต้องมีค่ามากกว่า 0.990



ภาพที่ 2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ตรวจวัดได้ (ΔR_n) กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา (บน) และกราฟมาตรฐานซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า cycle threshold (Ct) กับปริมาณของ Vero cell DNA control ที่ระดับความเข้มข้น 3,000, 300, 30, 3, 0.3 และ 0.03 พิโคกรัมต่อปฏิกิริยา ด้วยวิธี Real-time PCR (ล่าง)

ตารางที่ 2 ผลการศึกษาการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ โดยวิธี Real-time PCR ในการหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์จากการสร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้ DNA ควบคุมที่มีความเข้มข้น 3,000, 300, 30, 3, 0.3 และ 0.03 พิโคกรัมต่อหลอด ตามลำดับ

ครั้งที่ทำการทดสอบ	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์
1	0.998
2	0.999
3	0.999

การตรวจสอบความแม่นยำของวิธี

เมื่อทำการเติม DNA ควบคุมของเซลล์ Vero ปริมาณ 10 พิโคกรัม ลงในตัวอย่างละลายวัคซีน แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณ DNA ของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero จำนวน 3 ซ้ำ พบว่าวิธีสามารถตรวจพบปริมาณของ DNA ได้โดยมีค่าเฉลี่ยเรขาคณิต (Geometric Mean, GM) ที่ 8.76 พิโคกรัม มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเรขาคณิต (Geometric Standard Deviation, GSD) ที่ 1.24 และค่าการคืนกลับที่ 87.6% (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลการตรวจสอบความแม่นยำของวิธี Real-time PCR ในการวิเคราะห์หาปริมาณ DNA ควบคุมของเซลล์ Vero ปริมาณ 10 พิโคกรัม ที่เติมลงในตัวอย่างละลายวัคซีน

ตัวอย่างที่	ปริมาณสารพันธุกรรมตกค้าง (นาโนกรัมต่อโดส)	GM	GSD	% Recovery
1	10.94	8.76	1.24	87.6 %
2	7.06			
3	8.70			

การตรวจสอบความเที่ยงของวิธี

เมื่อทำการตรวจหา DNA ตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ในผลิตภัณฑ์วัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าจำนวน 3 รุ่นการผลิต ในวันและเวลาเดียวกัน 3 ครั้งต่อรุ่นการผลิต พบว่าในวัคซีนตัวอย่างที่ 1 ตรวจพบปริมาณของ DNA จากเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ตกค้างอยู่ในผลิตภัณฑ์ โดยมีค่าเฉลี่ยเรขาคณิตอยู่ที่ 2.56 นาโนกรัมต่อโดส มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเรขาคณิตที่ 1.31 นาโนกรัมต่อโดส และมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนที่ 27.14% ในวัคซีนตัวอย่างที่ 2 ตรวจพบปริมาณของ DNA จากเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ตกค้างอยู่ในผลิตภัณฑ์ โดยมีค่าเฉลี่ยเรขาคณิตอยู่ที่ 3.59 นาโนกรัมต่อโดส มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเรขาคณิตที่ 1.19 นาโนกรัมต่อโดส และมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนที่ 17.16% และในวัคซีนตัวอย่างที่ 3 ตรวจพบปริมาณของ DNA จากเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ตกค้างอยู่ในผลิตภัณฑ์ โดยมีค่าเฉลี่ยเรขาคณิตอยู่ที่ 4.58 นาโนกรัมต่อโดส มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเรขาคณิตที่ 1.12 นาโนกรัมต่อโดส และมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนที่ 11.40% (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลการตรวจสอบความเที่ยงของวิธี Real-time PCR ในการตรวจหา DNA ตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ในผลิตภัณฑ์วัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าจำนวน 3 รุ่นการผลิต

ตัวอย่าง	ชุดที่	ปริมาณ DNA ตกค้าง (นาโนกรัมต่อโดส)	GM	GSD	%GCV
วัคซีนพิษสุนัขบ้า รุ่นการผลิตที่ 1	1	1.91	2.56	1.31	27.14
	2	3.21			
	3	2.75			
วัคซีนพิษสุนัขบ้า รุ่นการผลิตที่ 2	1	3.37	3.59	1.19	17.16
	2	4.36			
	3	3.16			
วัคซีนพิษสุนัขบ้า 3 รุ่นการผลิตที่ 3	1	5.18	4.58	1.12	11.40
	2	4.48			
	3	4.14			

การทดสอบความคงทนของวิธี

จากการทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารพันธุกรรมตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ในผลิตภัณฑ์วัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า จำนวน 1 รุ่นการผลิต โดยผู้ตรวจวิเคราะห์ 2 คน คนละ 3 ซ้ำ ในวันและเวลาเดียวกัน พบว่ามีผลการวิเคราะห์ที่ใกล้เคียงกัน คือ มีค่าเฉลี่ยเรขาคณิตอยู่ที่ 3.99 และ 4.85 นาโนกรัมต่อโดส มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเรขาคณิตที่ 1.12 และ 1.11 และมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนที่ 11.25 และ 10.54 ในผู้วิเคราะห์คนที่ 1 และคนที่ 2 ตามลำดับ และเมื่อนำมาคำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเรขาคณิตรวมของการทดสอบ จะมีค่าเท่ากับ 1.11 และมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนเท่ากับ 10.42% (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความคงทนของวิธี Real-time PCR โดยทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารพันธุกรรมตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ในผลิตภัณฑ์วัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้ารุ่นการผลิตเดียวกัน

ครั้งที่	ปริมาณสารพันธุกรรมตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero (นาโนกรัมต่อโดส)	
	ผู้วิเคราะห์คนที่ 1	ผู้วิเคราะห์คนที่ 2
1	4.03	4.96
2	4.44	5.31
3	3.55	4.32
G.M.	3.99	4.85
Geo S.D.	1.12	1.11
Geo C.V.	11.25	10.54
G.M. (รวม)	4.40	
Geo S.D. (รวม)	1.11	
% Geo C.V. (รวม)	10.42	

วิจารณ์

ปัจจุบันวัคซีนไวรัสหลายชนิดมีการผลิตโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่อเนื่อง ซึ่งคุณสมบัติของเซลล์เพาะเลี้ยงเหล่านี้ได้ได้รับการศึกษาแล้วว่าสามารถนำมาใช้ในการผลิตวัคซีนได้ มีความปลอดภัย ไม่ก่อให้เกิดมะเร็งและการติดเชื้อไวรัสโดยไม่พึงประสงค์ โดยเฉพาะถ้าในการผลิตนั้นมีกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ (purification) มีกระบวนการตรวจสอบควบคุมคุณภาพที่ดี และมี DNA ของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ผลิตในผลิตภัณฑ์วัคซีนเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้โดยองค์การอนามัยโลก⁽¹¹⁾

เซลล์เพาะเลี้ยง Vero เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่อเนื่องที่ผู้ผลิตนำมาใช้ในการผลิตวัคซีนไวรัสอย่างแพร่หลายมากกว่า 80% ของวัคซีนไวรัสที่มีการจำหน่าย และใช้ในการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันของประชากรทั่วโลกผลิตจากเซลล์ชนิดนี้⁽³⁾ ซึ่งถือเป็นเซลล์ที่ทั่วโลกรู้จักกันดี และมีการศึกษาถึงความปลอดภัย สามารถนำมาใช้ในการผลิตวัคซีนได้

เพื่อเป็นการตรวจสอบผลิตภัณฑ์วัคซีนไวรัสที่ผลิตจากเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดนี้และมีการขอรับรองรุ่นการผลิตในประเทศ รวมถึงได้พัฒนาวิธีการตรวจหา DNA ตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ในผลิตภัณฑ์วัคซีนไวรัสสำเร็จรูปด้วยวิธี Real-time PCR การศึกษานี้จึงได้ทำการตรวจหาปริมาณ DNA ของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ที่ตกค้างอยู่ในตัวอย่างวัคซีนไวรัสสำเร็จรูปจำนวน 16 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นวัคซีนที่มีการใช้เซลล์ Vero ในการผลิต และนำมาส่งตรวจเพื่อขอรับรองรุ่นการผลิตในประเทศกับสถาบันชีววัตถุโดยวิธีดังกล่าว ผลการทดลองพบ DNA ตกค้างในปริมาณ

ต่ำกว่าเกณฑ์ที่กำหนดไว้โดยองค์การอนามัยโลกในทุกตัวอย่างที่นำมาทดสอบ แม้ว่าค่าปริมาณ DNA จะมีความแตกต่างกันในแต่ละผลิตภัณฑ์และต่างกันในแต่ละรุ่นการผลิต ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการสกัดเอาสารพันธุกรรมออกจากผลิตภัณฑ์ในแต่ละรุ่น หรือแม้แต่นับแต่รุ่นเดียวกันในกระบวนการผลิตวัคซีนนั้นไม่สามารถกำหนดค่าที่แน่นอนได้ จึงทำให้ปริมาณที่ตรวจพบมีความแตกต่างกัน

เพื่อเป็นการยืนยันว่าวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็นวิธีที่เหมาะสม ให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง จึงได้ทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีในพารามิเตอร์ที่สำคัญ ได้แก่

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์พบว่า มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ มากกว่า 0.990 ในทุกชุดการทดสอบ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าค่า cycle threshold (Ct) กับปริมาณของ Vero cell DNA control มีความสัมพันธ์กัน และสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ DNA ตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ได้ โดยช่วงวิเคราะห์ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 0.03–3,000 พิโคกรัมต่อปฏิกิริยา

ในการตรวจสอบความแม่นยำของวิธี โดยการวิเคราะห์หาปริมาณ DNA ควบคุมของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero จำนวน 10 พิโคกรัม ที่เติมลงในตัวอย่างวัคซีนนั้น คณะผู้ศึกษาวิจัยเลือกใช้ปริมาณ DNA นี้ เนื่องจากเป็นปริมาณที่ต่ำ ใกล้เคียงกับค่าที่ตรวจพบจริงในตัวอย่างวัคซีน และอยู่ในช่วงวิเคราะห์ที่เหมาะสม คือ อยู่ระหว่าง 0.03–3,000 พิโคกรัม จากการศึกษาพบว่า วิธีนี้สามารถตรวจหา DNA ควบคุมของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ที่เติมลงไปในตัวทำละลายวัคซีนได้ โดยมีค่าการคืนกลับที่ 87% ซึ่งอยู่ในช่วง 80–120% จึงถือว่าวิธีมีความแม่นยำดี

ส่วนการตรวจสอบความเที่ยงของวิธีนั้น ใช้ตัวอย่างวัคซีนในการทดสอบเพื่อให้มีสภาวะใกล้เคียงกับเมื่อต้องการทำการทดสอบในตัวอย่างวัคซีนจริง ๆ โดยคัดเลือกจากวัคซีนตัวอย่างจำนวน 16 ตัวอย่าง ที่ทำการศึกษามาแล้ว ในขั้นต้น และมีปริมาณของ DNA ตกค้างในระดับที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้จำนวน 3 รุ่นการผลิต เมื่อทำการทดสอบในวันและเวลาเดียวกัน (within-day variation) มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนที่ 27.14%, 17.16% และ 11.40% ตามลำดับ ซึ่งตามที่กำหนดไว้ควรมีค่าไม่เกิน 25% แต่จะเห็นว่าในตัวอย่างที่ 1 ของวัคซีนพิษสุนัขบ้าที่นำมาใช้ในการศึกษาความเที่ยงนั้นมีค่าเกินกว่าเกณฑ์ที่กำหนดไว้ ในขณะที่อีกสองตัวอย่างมีค่าไม่เกินเกณฑ์กำหนด อย่างไรก็ตามในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ DNA ตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ในผลิตภัณฑ์วัคซีนนี้ เป็นการวิเคราะห์หาสารซึ่งมีปริมาณน้อยมากในผลิตภัณฑ์วัคซีน มีหน่วยเป็นพิโคกรัม และนาโนกรัม ทำให้มีผลต่อการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนได้ แต่จากผลการทดสอบมีค่าไม่ต่างจากเกณฑ์กำหนดมากนัก และ 2 ใน 3 ตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์มีค่าผ่านเกณฑ์ จึงถือว่าเป็นวิธีมีความแปรปรวนของผลการทดสอบน้อย แสดงว่าวิธีมีความเที่ยงดี

ในการทดสอบความคงทนของวิธี ซึ่งใช้ผู้วิเคราะห์ 2 คนในการทดสอบ พบว่าผลในการวิเคราะห์หาปริมาณ DNA ตกค้างมีค่าใกล้เคียงกัน แสดงว่าวิธีมีความคงทนดี

การศึกษาความถูกต้องของวิธี Real-time PCR ในการตรวจหา DNA ตกค้างนี้เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้⁽¹²⁾ และเป็นไปในแนวทางเดียวกันกับการศึกษาที่ผ่านมา ซึ่งทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีในการตรวจหา DNA ตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง CHO (Chinese Hamster Ovary cells) และเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ในผลิตภัณฑ์ชีววัตถุเพื่อการรักษา (biopharmaceutical products)^(9, 10) แต่ยังคงขาดการตรวจสอบความถูกต้องในบางพารามิเตอร์ ได้แก่ การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) และขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) แต่เนื่องจากชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปที่ใช้ในการศึกษานี้ได้มีการกำหนดขีดจำกัดของการตรวจพบไว้ที่ 0.0015 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งต่ำกว่าเกณฑ์ที่กำหนดไว้โดยองค์การอนามัยโลก ทางคณะผู้ทำการศึกษายังจึงไม่ได้ทำการศึกษาในสองพารามิเตอร์นี้ อย่างไรก็ตามในการศึกษาต่อไป หากมีการศึกษาเพิ่มเติมในสองพารามิเตอร์นี้ ก็จะช่วยให้การศึกษาความถูกต้องของวิธีมีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

สรุป

จากการศึกษาการตรวจวิเคราะห์หา DNA ตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัคซีนไวรัสสำเร็จรูป และการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีในพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ การตรวจสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ ความแม่นยำ ความเที่ยง และความคงทนของวิธีแสดงให้เห็นว่าวิธี Real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นวิธีที่ดี มีความเหมาะสม สามารถนำมาใช้สำหรับตรวจหา DNA ตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยง Vero ในผลิตภัณฑ์วัคซีนไวรัสได้ หากในอนาคตมีการศึกษาในสองพารามิเตอร์ ได้แก่ การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ และขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณเพิ่มเติมอาจนำมากำหนดเป็นวิธีมาตรฐานภายในห้องปฏิบัติการเพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคได้ และการศึกษาสามารถใช้เป็นแนวทางในการขยายขอบข่ายการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์หา DNA ตกค้างของเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดอื่นๆ ในผลิตภัณฑ์ชีววัตถุต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันวัคซีนแห่งชาติที่สนับสนุนงบประมาณเพื่อนำมาใช้ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Yasumura Y, Kawakita M. The research for the SV40 by means of tissue culture technique. Nippon Rinsho 1963; 21(6): 1201-19.
2. Requirements for the use of animal cells as in vitro substrates for the production of biologicals. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. World Health organ Tech Rep Ser 1998; 878: i-vi, 1-101.
3. Cao S, Dong G, Tang J, Li J, Liu J, Shi L, et al. Development of a Vero cell DNA reference standard for residual DNA measurement in China. Hum Vaccin Immunother 2012; 9(2): 413-9.
4. Yang H. Establishing acceptable limits of residual DNA. PDA J Pharm Sci Technol 2013; 67(2): 155-63.
5. DiPaolo B, Pennetti A, Nugent L, Venkat K. Monitoring impurities in biopharmaceuticals produced by recombinant technology. Pharm Sci Technol Today 1999; 2(2): 70-82.
6. Mehta S, Keer JT. Performance characteristics of host-cell DNA quantification methods. BioProcess Int 2007; 5(9): 44-58.
7. Kung VT, Panfili PR, Sheldon EL, King RS, Nagainis PA, Gomez B, et al. Picogram quantitation of total DNA using DNA-binding proteins in a silicon sensor-based system. Anal Biochem 1990; 187(2): 220-7.
8. Wang X, Morgan DM, Wang G, Mozier NM. Residual DNA analysis in biologics development: review of measurement and quantitation technologies and future directions. Biotechnol Bioeng 2012; 109(2): 307-17.
9. Hu B, Sellers J, Kupec J, Ngo W, Fenton S, Yang TY, et al. Optimization and validation of DNA extraction and real-time PCR assay for the quantitative measurement of residual host cell DNA in biopharmaceutical products. J Pharm Biomed Anal 2014; 88: 92-5.
10. Lee DH, Bae JE, Lee JH, Shin JS, Kim IS. Quantitative detection of residual E. coli host cell DNA by real-time PCR. J Microbiol Biotechnol 2010; 20(10), 1463-70.
11. Yang H, Zhang L, Galinski M. A probabilistic model for risk assessment of residual host cell DNA in biological products. Vaccine 2010; 28(19): 3308-11.
12. Broeders S, Huber I, Grohmann L, et al. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR Methods. Trends in Food Science & Technology 2014; 37: 115-26.

Determination of Residual Vero Cell DNA in Viral Vaccine Products by Real-time PCR

**Sukanlayanee Chaimee Sompong Sapsutthipas Jiradej Patchim
and Supaporn Phumiamorn**

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

ABSTRACT Vero cells are continuous cell lines which are used as a substrate for producing many viral vaccines because of their safety, non-tumorigenicity and non-latent viruses. However, the safety of the vaccines using the Vero cell also depends on the production, purification, and quality control processes. The World Health Organization currently recommends 10 ng/dose as an upper limit of DNA residue for any vaccines produced from continuous cell lines. Institute of Biological Products had validated the Real-time PCR method to determine residual DNA of Vero cells in viral vaccine. Sixteen Vero cell-based vaccine samples were employed. The testing results showed that small amounts of residual DNA were present in all samples from 0.49 to 4.48 ng/dose, which is lower than WHO's specification. From the analysis of linearity and range, it was found that the appropriate working range was 0.03–3,000 pg/reaction and the correlation coefficient was more than 0.990. For the accuracy, the recovery rate was 87% which was within the acceptance limit (80–120%). This method showed good repeatability when the test was conducted in the same day and at the same time and the coefficient of variance was less than 25%. For the analysis of robustness using two different analysts, it was found that the results were very close to each other and the coefficient of variance was less than 25%. Therefore, this method also showed good robustness. In conclusion, this developed real-time PCR when had been used for determination of residual Vero cell DNA in viral vaccines showed good results in linearity, accuracy, precision and robustness.

Key words: Vero cell, residual DNA, Real-time PCR

การศึกษาฤทธิ์คงทนของทรายอะเบทในการควบคุม ลูกน้ำยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* ในสภาพธรรมชาติ และกึ่งจำลองธรรมชาติ

อัครงค์ ผลชีวิน สุนัยนา สหกันไทรภพ อำนาจ บุญเครือพันธ์ และสมชาย แสงกิจพร
สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การศึกษาฤทธิ์คงทนของทรายอะเบท 1% SG ในการควบคุมลูกน้ำยุงลายบ้านในสภาพธรรมชาติและกึ่งจำลองธรรมชาติ โดยทดสอบกับลูกน้ำยุงลายบ้าน สายพันธุ์มาตรฐานที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ผลิตภัณฑ์ทรายอะเบทในอัตรา 1 กรัมต่อน้ำ 10 ลิตร หรือ 1 ppm ลงในตุ่มน้ำขนาด 200 ลิตร ใส่ลูกน้ำยุงลาย ระยะ 4 จำนวน 20 ตัว และเช็กผลการตายที่ 24 ชั่วโมง ทดสอบต่อเนื่องทุกสัปดาห์ จนกระทั่งอัตราการตายของลูกน้ำยุงลายน้อยกว่าร้อยละ 50 ผลการศึกษาพบว่าในสภาพธรรมชาติระยะเวลาที่ทำให้ลูกน้ำยุงลายบ้านตายร้อยละ 50 และ 90 มีค่าเท่ากับ 18.20 และ 16.81 สัปดาห์ ตามลำดับ และการทดสอบแบบกึ่งจำลองธรรมชาติ ระยะเวลาที่ทำให้ลูกน้ำยุงลายบ้านตายร้อยละ 50 และ 90 มีค่าเท่ากับ 25.93 และ 24.13 สัปดาห์ ตามลำดับ

บทนำ

ปัจจุบันปัญหาโรคไข้เลือดออกมีความรุนแรงเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยในปี 2558 มีผู้ป่วยไข้เลือดออก 123,169 ราย และตาย 116 ราย⁽¹⁾ สาเหตุหนึ่งอาจเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ โลกมีอุณหภูมิสูงขึ้น ส่งผลให้ยุงลายเกิดการปรับตัว และมีวงจรชีวิตที่สั้นลง ส่งผลให้ยุงสามารถเพิ่มประชากรได้มากยิ่งขึ้น⁽²⁾ และมีรายงานว่ายุงลายมีการพัฒนาสร้างความต้านทานต่อสารเคมีที่ใช้ควบคุม เช่น deltamethrin permethrin alphacypermethrin เป็นต้น ในหลายพื้นที่ของประเทศไทย^(3, 4) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่ายุงที่มียีนดื้อต่อสารเคมีกำจัดแมลง สามารถถ่ายทอดยีนดื้อยาไปสู่รุ่นลูกได้ ยุงพาหะที่สำคัญของโรคไข้เลือดออกในประเทศไทย คือ ยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti* L.) และพาหะรอง คือ ยุงลายสวน (*Aedes albopictus* L.) ยุงลายบ้านมีนิสัยชอบออกหากินในเวลากลางวัน ชอบกัดกินเลือดคน และมักอาศัยอยู่ตามบ้านเรือน หรือบริเวณรอบๆ บ้าน แหล่งเพาะพันธุ์ของยุงลายบ้าน ได้แก่ ตุ่มน้ำ แจกัน จานรองขาตู้ และภาชนะที่มีน้ำขัง⁽⁵⁾ การควบคุมยุงลายสามารถทำได้หลายวิธี แต่วิธีที่ง่ายและได้ผลดี คือการควบคุมยุงลายในระยะที่เป็นตัวอ่อน (larvae) เนื่องจากการอยู่อาศัยของลูกน้ำยุงลายจะอยู่ในแหล่งเพาะพันธุ์ที่มีบริเวณจำกัด จึงง่ายต่อการควบคุม การใส่ผลิตภัณฑ์กำจัดลูกน้ำลงในภาชนะที่มีน้ำขัง เช่น ทราเยอะเบท (Abate) สารยับยั้งการเจริญเติบโต สารป้องกันการลอกคราบของลูกน้ำ แบคทีเรียกำจัดลูกน้ำ (*Bacillus thuringiensis israelensis* หรือ Bti) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ทราเยกำจัดลูกน้ำยุงลาย หรือทราเยเทมิฟอส มีชื่อทางการค้าคือ อะเบท มีความนิยม และใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีประสิทธิภาพดีในการกำจัดลูกน้ำยุงลายและราคาไม่แพง โดยหน่วยงานของรัฐจะเป็นผู้แจกจ่ายให้กับประชาชน เพื่อนำไปควบคุมยุงลายในบ้านของตนเอง และมีรายงานว่าสารเคมีเทมิฟอสยังมีประสิทธิภาพดีในการควบคุมลูกน้ำยุงลาย⁽⁶⁾

ทราเยอะเบท หรือทราเยที่เคลือบด้วยสารเทมิฟอส (temephos) ซึ่งเป็นสารเคมีสังเคราะห์ในกลุ่มออกาโนฟอสเฟต (organophosphate) มีฤทธิ์ต่อระบบประสาทของแมลง โดยจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cholinesterase ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถไปย่อยสลายสารสื่อประสาท acetylcholine ทำให้เกิดการสะสมของ acetylcholine และมีผลทำให้แมลงตายในที่สุด⁽⁷⁾ อย่างไรก็ตาม สารเคมีเทมิฟอสถือว่าปลอดภัยต่อคนและสัตว์ ถ้าใช้ในปริมาณที่กำหนด คือ 1 กรัมต่อน้ำ 10 ลิตร หรือมีสารเคมีเทมิฟอส 1 ส่วนในล้านส่วน (part per million, ppm) คือ มีสารเคมีเทมิฟอส 1 ส่วนต่อน้ำ 1 ล้านส่วน ซึ่งมีสารเคมีในปริมาณที่น้อยมาก ดังนั้น จึงสามารถใส่ทราเยอะเบทได้ทั้งในน้ำดื่ม และน้ำใช้ องค์การอนามัยโลกได้แนะนำให้ใช้ทราเยอะเบทใส่ในแหล่งน้ำ เพื่อกำจัดลูกน้ำยุงลาย เพื่อเป็นการป้องกันการแพร่ระบาดของโรคไข้เลือดออก⁽⁸⁾ ผลิตภัณฑ์อะเบทมีการผลิตอยู่ในรูปแบบต่างๆ เช่น สูตร Emulsifiable concentrate (EC) ซึ่งต้องผสมน้ำก่อนนำไปฉีดพ่นตามแหล่งน้ำ มีการศึกษาการใช้ผลิตภัณฑ์ Abate 500E ซึ่งเป็นสูตร EC ฉีดพ่นลงแหล่งน้ำ ผลทดสอบพบว่าผลิตภัณฑ์นี้สามารถกำจัดลูกน้ำยุงลาย 100% ได้นาน 6-7 สัปดาห์⁽⁹⁾ และปัจจุบันได้มีนวัตกรรมใหม่ในการเคลือบสารเคมีเทมิฟอสกับทราเยภูเขาไฟ เรียกว่า ลาวาซีโอไลท์ ซึ่งช่วยลดปัญหาเรื่องกลิ่นเหม็นของสารเทมิฟอส และปัญหาน้ำขุ่น โดยมีการวิจัยถึงประสิทธิภาพของทราเยซีโอไลท์ ในภาคสนามพบว่าสามารถกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้านในตุ่มน้ำได้อย่างน้อย 3 เดือน⁽¹⁰⁾ ผลิตภัณฑ์อะเบทมีหลากหลายรูปแบบให้เลือกใช้ตามความเหมาะสมของการใช้งานและให้ตรงตามความต้องการของผู้ใช้ในการควบคุมลูกน้ำยุงลาย สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ คณะผู้วิจัยต้องการศึกษาถึงประสิทธิภาพและฤทธิ์คงทนของผลิตภัณฑ์ทราเยอะเบท (Abate 1% SG) ในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้าน โดยทำการศึกษาทั้งในสภาพธรรมชาติจริง และกึ่งจำลองธรรมชาติเปรียบเทียบกัน เพื่อให้ทราบระยะเวลาที่แท้จริงของผลิตภัณฑ์ Abate 1% SG ที่สามารถออกฤทธิ์ในการกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้านในสภาพธรรมชาติอย่างได้ผลดี และเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการเลือกใช้ผลิตภัณฑ์ทราเยอะเบทในการควบคุมลูกน้ำยุงลายบ้านต่อไป

วัสดุและวิธีการ

ทรายอะเบท

ผลิตภัณฑ์ทรายอะเบท 1% เอสจี (Abate 1% SG) เป็นทรายเคลือบสารเคมีฟอส (temephos) 1% (ทรายหนัก 99 กรัม มีสารออกฤทธิ์อยู่ 1 กรัม) สารออกฤทธิ์ คือ temephos 1% W/W SG ผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นทรายเม็ดละเอียดสีน้ำตาลเทา (วันที่ผลิต 8 ส.ค. 57)

ลูกน้ำยุงลาย

ลูกน้ำยุงลายบ้าน สายพันธุ์มาตรฐาน ระยะ 4 ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการจากฝ่ายฟิสิกส์แม่ลงและอนุกรมวิธานและสนับสนุนงานกีฏวิทยา

สถานที่ทดสอบ

1. ทดสอบแบบสภาพธรรมชาติ

พื้นที่ใส่ทรายอะเบท (Treatment) : ชุมชนใต้ทางด่วนทิมแลนด์ หมู่ 9 ฝั่งตะวันตก ตำบลลาดข้วย อำเภอมืองนนทบุรี จังหวัดนนทบุรี

พื้นที่เปรียบเทียบ (Control) : ชุมชนใต้ทางด่วนทิมแลนด์ หมู่ 9 ฝั่งตะวันออก ตำบลลาดข้วย อำเภอมืองนนทบุรี จังหวัดนนทบุรี

2. ทดสอบแบบกึ่งจำลองธรรมชาติ

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข นนทบุรี

วิธีทดสอบแบบสภาพธรรมชาติ

- คัดเลือกบ้านในชุมชนที่ทำการทดสอบ เลือกบ้านที่มีตุ่มน้ำ ขนาด 200 ลิตร บ้านละ 1 ตุ่ม จำนวน 10 หลังคาเรือน ทั้งชุมชนที่ใส่ทรายอะเบท และชุมชนเปรียบเทียบ

- ก่อนทำการทดสอบ ต้องตรวจสอบการปนเปื้อนสารเคมีของตุ่มน้ำก่อน โดยนำลูกน้ำยุงลายบ้าน ระยะ 4 จำนวน 20 ตัว ใส่ในกรงสำหรับลอยลูกน้ำ หย่อนกรงพร้อมลูกน้ำ จำนวน 1 กรง ลงในตุ่มน้ำ และบันทึกผลการตายของลูกน้ำยุงลาย เมื่อครบ 24 ชั่วโมง

- หลังการตรวจสอบตุ่มน้ำเรียบร้อยแล้ว ใส่ผลิตภัณฑ์ทรายอะเบท 1% SG จำนวน 20 กรัม ลงในตุ่มน้ำ ที่มีปริมาณน้ำ 200 ลิตร ตามอัตราการใช้ที่แนะนำ คือ 1 กรัมต่อน้ำ 10 ลิตร หรือ 1 ส่วนในล้านส่วน และให้ชาวบ้านมีการใช้น้ำในตุ่มน้ำตามปกติ

- ประเมินประสิทธิภาพและความคงฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์ทรายอะเบท สัปดาห์ละ 1 ครั้ง โดยใส่ลูกน้ำยุงลาย ระยะ 4 จำนวน 20 ตัว ลงในกรงลอยลูกน้ำลงในตุ่มทดสอบ และบันทึกผลการตายของลูกน้ำยุงลาย เมื่อครบ 24 ชั่วโมง การทดสอบจะดำเนินการอย่างต่อเนื่องทุกสัปดาห์ ทั้งในชุมชนที่ใส่ทรายอะเบท และชุมชนเปรียบเทียบ จนอัตราการตายของลูกน้ำยุงลายในตุ่มน้ำที่ใส่ทรายอะเบทน้อยกว่าร้อยละ 50

วิธีทดสอบแบบกึ่งจำลองธรรมชาติ

- คัดเลือกพื้นที่ที่ใส่ทรายอะเบท (treatment) และพื้นที่เปรียบเทียบที่ไม่ใส่ทรายอะเบท (control) โดยทั้งสองพื้นที่อยู่ในบริเวณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข

- เตรียมตุ่มน้ำ ขนาด 200 ลิตร โดยนำไปวางไว้ในพื้นที่ทดสอบ และพื้นที่เปรียบเทียบ พื้นที่ละ 3 ตุ่ม

- ก่อนทำการทดสอบ ต้องตรวจสอบการปนเปื้อนสารเคมีของตุ่มน้ำที่นำมาทดสอบก่อน โดยนำลูกน้ำยุงลายบ้าน ระยะ 4 จำนวน 20 ตัว ใส่ในกรงสำหรับล่อยลูกน้ำ หย่อนกรงลงในตุ่มน้ำ และบันทึกผลการตายของลูกน้ำยุงลาย เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ถ้าไม่พบสิ่งผิดปกติ จึงเริ่มต้นการทดสอบ
- ใส่ผลิตภัณฑ์ทรายอะเบท 1% SG จำนวน 20 กรัม ลงในตุ่มน้ำที่มีปริมาณน้ำ 200 ลิตร ตามอัตราการใช้ที่แนะนำ คือ 1 กรัมต่อน้ำ 10 ลิตร หรือ 1 ppm และมีการตักน้ำออก และเติมน้ำสะอาดกลับเข้าไปในปริมาณร้อยละ 20 ของความจุในตุ่ม ทำสัปดาห์ละ 2 ครั้ง
- ประเมินประสิทธิภาพความคงฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์ทรายอะเบท สัปดาห์ละ 1 ครั้ง โดยใส่ลูกน้ำยุงลาย ระยะ 4 จำนวน 20 ตัว ลงในกรงล่อยลูกน้ำลงในตุ่มทดสอบ และบันทึกผลการตายของลูกน้ำยุงลาย เมื่อครบ 24 ชั่วโมง การทดสอบจะดำเนินการอย่างต่อเนื่องทุกสัปดาห์ ทั้งในชุมชนที่ใส่ทรายอะเบท และชุมชนเปรียบเทียบ จนอัตราการตายของลูกน้ำยุงลายในตุ่มน้ำที่ใส่ทรายอะเบทน้อยกว่าร้อยละ 50

วิเคราะห์ผล

คำนวณหาอัตราการตายของลูกน้ำยุงลาย กรณีที่ลูกน้ำยุงลายในตุ่มเปรียบเทียบมีอัตราการตายมากกว่าร้อยละ 5 ถึงร้อยละ 20 ให้ปรับอัตราการตายด้วย Abbott's formula⁽¹¹⁾ เพื่อคำนวณหาอัตราการตายที่แท้จริงของลูกน้ำยุงลาย แต่ถ้าอัตราการตายมากกว่าร้อยละ 20 ต้องทำการทดสอบใหม่ และวิเคราะห์ค่า probit analysis เพื่อหาค่า LT_{50} (Lethal time 50) และ LT_{90} (Lethal time 90) หรือเวลาที่ทำให้ลูกน้ำยุงลายตายร้อยละ 50 และ 90 ของลูกน้ำยุงลายทดสอบ ตามลำดับ และเปรียบเทียบหาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอัตราการตายของลูกน้ำยุงลายบ้านในแต่ละสัปดาห์ โดยใช้วิธีของดินแคน (Duncan's multiple range test)⁽¹²⁾

ผล

ผลการศึกษาฤทธิ์คงทนของผลิตภัณฑ์ทรายอะเบท 1% SG ในสภาพธรรมชาติ ที่มีการใช้น้ำอุปโภคบริโภคตามปกติ พบว่าลูกน้ำยุงลายมีอัตราการตายร้อยละ 100 นาน 15 สัปดาห์ และมีอัตราการตายลดลงอย่างต่อเนื่องทุกสัปดาห์ คือ สัปดาห์ที่ 16, 17, 18 และ 19 มีอัตราการตายอยู่ที่ร้อยละ 98.50 ± 4.74 , 87.37 ± 15.32 , 51.02 ± 31.99 และ 26.77 ± 21.63 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) และในการทดลองในสภาพธรรมชาติพบว่ามี LT_{50} เท่ากับ 18.20 สัปดาห์ (95% CL: 18.08 – 18.34 สัปดาห์) และ LT_{90} เท่ากับ 16.81 สัปดาห์ (95% CL: 16.62 – 16.97 สัปดาห์) และผลการศึกษาในสภาพกึ่งธรรมชาติ ซึ่งมีการถ่ายน้ำเข้าและออกจากตุ่มน้ำทดสอบ สัปดาห์ละ 2 ครั้ง พบว่าลูกน้ำยุงลายมีอัตราการตายร้อยละ 100 หลังใส่ทรายอะเบทนานถึง 23 สัปดาห์ และอัตราการตายของลูกน้ำยุงลายลดลงในสัปดาห์ต่อมา คือ สัปดาห์ที่ 24, 25, 26 และ 27 มีอัตราการตายอยู่ที่ร้อยละ 90.00 ± 5.00 , 73.33 ± 22.55 , 45.00 ± 18.03 และ 26.67 ± 4.51 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) และมีค่า LT_{50} เท่ากับ 25.93 สัปดาห์ (95% CL: 25.68 – 26.22 สัปดาห์) และ LT_{90} เท่ากับ 24.13 สัปดาห์ (95% CL: 23.67 – 24.46 สัปดาห์) อุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของน้ำในตุ่มทดสอบทั้งสองวิธีพบว่าอุณหภูมิของน้ำเฉลี่ยอยู่ที่ 25 ถึง 29 องศาเซลเซียส และค่า pH อยู่ในช่วง 6-7

ตารางที่ 1 แสดงอัตราการตายเฉลี่ยของลูกน้ำยุงลายหลังใส่ผลิตภัณฑ์ทรายอะเบท 1% SG ในสภาพธรรมชาติ

ระยะเวลาหลังการใส่ ผลิตภัณฑ์ทรายอะเบท (สัปดาห์)	จำนวนลูกน้ำทดสอบ (ตัว) (10 ตุ่ม × 20 ตัว)	อัตราการตายเฉลี่ยของ ลูกน้ำยุงลาย (%) ± SD*	ความแตกต่าง**
15	200	100.00 ± 0.00	A
16	200	98.50 ± 4.74	A
17	200	87.50 ± 15.32	A
18	200	52.00 ± 24.97	B
19	200	27.50 ± 21.64	C

* อัตราการตายของลูกน้ำยุงลายมีการปรับค่าด้วย Abbott's formula

** ตัวอักษรที่เหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (Duncan's multiple range test)⁽¹²⁾

ตารางที่ 2 แสดงอัตราการตายเฉลี่ยของลูกน้ำยุงลายหลังใส่ผลิตภัณฑ์ทรายอะเบท 1% SG ในสภาพกึ่งจำลองธรรมชาติ

ระยะเวลาหลังการใส่ ผลิตภัณฑ์ทรายอะเบท (สัปดาห์)	จำนวนลูกน้ำทดสอบ (ตัว) (10 ตุ่ม × 20 ตัว)	อัตราการตายเฉลี่ยของ ลูกน้ำยุงลาย (%) ± SD*	ความแตกต่าง**
23	60	100.00 ± 0.00	A
24	60	90.00 ± 5.00	A
25	60	73.33 ± 22.55	AB
26	60	45.00 ± 18.03	BC
27	60	28.33 ± 20.21	C

* อัตราการตายของลูกน้ำยุงลายมีการปรับค่าด้วย Abbott's formula

** ตัวอักษรที่เหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (Duncan's multiple range test)⁽¹²⁾

วิจารณ์

การศึกษาฤทธิ์คงทนของผลิตภัณฑ์ทรายอะเบท 1% SG มีสารออกฤทธิ์ temephos 1% W/W SG ในการควบคุมลูกน้ำยุงลายบ้านในตุ่มน้ำ พบว่าในสภาพธรรมชาติมีระยะเวลาในการกำจัดลูกน้ำยุงลายสั้นกว่าในสภาพแบบกึ่งจำลองธรรมชาติ โดยในการทดสอบในสภาพธรรมชาติผลิตภัณฑ์ทรายอะเบทสามารถกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้านได้ 100% นาน 15 สัปดาห์ ในขณะที่การทดสอบในแบบกึ่งจำลองธรรมชาติผลิตภัณฑ์ทรายอะเบทสามารถกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้านได้ 100% นานถึง 23 สัปดาห์ ซึ่งการทดสอบแบบกึ่งจำลองธรรมชาติให้ผลทดสอบใกล้เคียงกับงานวิจัยหนึ่งที่ได้ทดสอบทรายอะเบท 1% SG ในตุ่มน้ำขนาด 200 ลิตร พบว่าสามารถควบคุมลูกน้ำยุงลายได้นานถึง 6 เดือน หรือ 24 สัปดาห์⁽¹³⁾ สาเหตุที่ทำให้ระยะเวลาในการควบคุมลูกน้ำยุงลายในตุ่มน้ำในสภาพธรรมชาติสั้นกว่าการทดสอบแบบกึ่งจำลองธรรมชาติ เนื่องจากการใช้น้ำในตุ่มน้ำเป็นประจำทุกวัน จึงทำให้ประสิทธิภาพของทรายอะเบทลดลง

ในขณะที่แบบกึ่งจำลองธรรมชาติมีการถ่ายน้ำเข้าออกจากตุ่มน้ำเพียงสัปดาห์ละ 2 ครั้ง ดังนั้น การใช้น้ำในตุ่มน้ำที่มีการใส่ทรายอะเบท จึงมีผลต่อประสิทธิภาพของทรายอะเบทในการควบคุมลูกน้ำยุงลายในตุ่มน้ำ อย่างไรก็ตาม นอกจากปัจจัยการใช้น้ำที่ทำให้ประสิทธิภาพความคงฤทธิ์ของทรายอะเบทลดลง ยังมีปัจจัยอื่นๆ อีก เช่น ชนิดของน้ำในภาชนะสารอินทรีย์ที่อยู่ในน้ำ อุณหภูมิของน้ำ และตุ่มน้ำ/ภาชนะที่ใส่ทรายอะเบทมีการโดนแสงแดดซ้ำๆ⁽¹⁴⁾

อย่างไรก็ตาม การควบคุมและกำจัดลูกน้ำยุงลายให้ได้ผลดีนั้นต้องอาศัยวิธีการหลายๆ วิธีร่วมกัน เรียกว่าการจัดการพาหะนำโรคแบบผสมผสาน (Integrated Vector Management หรือ IVM) เช่น การกำจัดแหล่งเพาะพันธุ์ลูกน้ำยุง ปิดฝาตุ่มน้ำ หรือภาชนะที่ใช้เก็บกักน้ำ ใส่ทรายอะเบทตามภาชนะใส่น้ำ หรือมีน้ำขัง จานรองขาตู้แจกัน หรือใช้ทรายอะเบทสลับกับผลิตภัณฑ์แบคทีเรียกำจัดลูกน้ำ Bti เพื่อป้องกันการสร้างความต้านทานของลูกน้ำยุงลาย และหมั่นทำความสะอาดบ้านเรือน เพื่อไม่ให้เป็นที่แหล่งเกาะพัก หรือเพาะพันธุ์ของยุงลาย และสำรวจลูกน้ำยุงลายตามตุ่มน้ำ/ภาชนะใส่น้ำเป็นประจำ

การใช้ผลิตภัณฑ์ทรายอะเบทต้องใช้ตามอัตราที่กำหนด และใส่ทรายอะเบทซ้ำทุก ๆ 3 เดือน สำหรับตุ่มน้ำที่ไม่ค่อยมีการใช้น้ำ แต่ตุ่มน้ำที่มีการใช้เป็นประจำ ถ้าตรวจพบลูกน้ำยุงก่อนครบเวลา 3 เดือน ให้ใส่ทรายอะเบทเพิ่มลงในตุ่มน้ำ

สรุป

ผลิตภัณฑ์ทรายอะเบท 1% SG (temephos 1% W/W SG) พบว่ามีประสิทธิภาพในการควบคุมลูกน้ำยุงลายบ้านในสภาพธรรมชาติที่มีการใช้น้ำจริงได้ 100% นานถึง 15 สัปดาห์ และผลการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์คงทนของผลิตภัณฑ์ทรายอะเบท 1%SG ที่ได้ สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลประกอบในการตัดสินใจเลือกใช้ผลิตภัณฑ์ทรายอะเบทในการควบคุมลูกน้ำยุงลายบ้าน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณฝ่ายสนับสนุนงานกีฏวิทยาฝ่ายพิพิธภัณฑ์แมลงและอนุกรมวิธานและสนับสนุนงานกีฏวิทยา กลุ่มงานกีฏวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ที่สนับสนุนลูกน้ำยุงลายสายพันธุ์มาตรฐานสำหรับการทดสอบ จึงทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Bureau of Vector Borne Disease, Department of Disease Control, Ministry of Public Health. An Annual report of dengue cases 2015, Thailand. [online]. 2015 [cited 2015 Dec 31]; Available from URL: <http://www.thaivbd.org/n/home>
2. Morin CW, Comrie AC, Ernst K. Climate and dengue transmission: evidence and implications. *Environ Health Perspect.* 2013; 121(11-12): 1264-1272. [สืบค้น 31 ธันวาคม 2558]; [9 หน้า]. เข้าถึงได้ที่ URL:<http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1306556>.
3. Thanispong K, Sathantriphop S, Chareonviriyaphap T. Insecticide resistance of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* in Thailand. *J. Pestic Sci.* 2008; 33(4): 351-356.
4. Chareonviriyaphap T, Bangs MJ, Suwonkerd W, Kongmee M, Corbel V, Ngoen-Klan R. Review of insecticide resistance and behavioral avoidance of vectors of human diseases in Thailand. *Parasites & Vectors.* 2013; 6: 280. [28 p.] [online]. 2013 [cited 2016 Jan 1]; Available from URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3850650/>

5. Chareonviriyaphap T, Akwatanakul P, Nettanomsak S, Huntamai S. Larval habitats and distribution patterns of *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Aedes albopictus* (Skuse), in Thailand. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. 2003; 34(3): 529-535.
6. Thongwat D, Bunchu N. Susceptibility to temephos, permethrin and deltamethrin of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Muang district, Phitsanulok Province, Thailand. Asian Pac. J. Trop. Med. 2015; 8(1): 14-8.
7. สุธรรม อารีกุล. บทปฏิบัติการกีฏวิทยาและโรคพืช. กรุงเทพฯ : บุรพาติสปีการพิมพ์; 2010.
8. World Health Organization. Safe use of pesticides: ninth report of the WHO expert committee on vector biology and control. WHO technical report series 720. Geneva: World Health Organization; 1985.
9. Hassan AA, Salmah MRC, Ngumbang J, Ramli SA, El-badri AM. Mosquitoes of urban areas of Penang abundance and control. Proceedings of the fifth international conference on urban pests. 2005; 257-263.
10. Thavara U, Tawatsin A, Kong-ngamsuk W, Mulla MS. Efficacy and longevity of a new formulation of temephos larvicide tested in village-scale trials against larvae *Aedes aegypti* larvae in water storage containers. J. Am. Mosq. Control Assoc. 2004; 20(2): 176-182.
11. Abbott WS. A method for computing the effectiveness of an insecticide. 1925. J. Am. Mosq. Control Assoc. 1987; 3(2): 302-3.
12. Lek-Uthai U, Rattanapreechachai P, Chohanadisai L. Bioassay and effective concentration of Tmephos against *Aedes aegypti* larvae and the adverse effect upon indigenous predators: *Toxorhynchites splendens* and *Micronecta* sp. Asia Pac. J. Public Health 2011; 2(2): 67-77.
13. Mulla MS, Thavara U, Tawatsin A, Chompoosri J. Procedures for evaluation of field efficacy of slow release formulations of larvicides against *Aedes aegypti* in water storage containers. J. Am. Mosq. Control Assoc. 2004; 20(1): 64-73.
14. George L, Lenhart A, Toledo J, Lazaro A, Han WW, Velayudhan R, et al. Community-effectiveness of temephos for dengue vector control: a systematic literature review. PloS Negl. Trop. Dis. 2015; 9(9): e0004006. [22 p.].

The Persistence of Temephos (Abate) on *Aedes aegypti* L. Larvae Under Field and Simulated Conditions

Thumrong Phonchevin Sunaiyana Sathantriphop Amnaj Bunkruaphan
and Somchai Sangkitporn

National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand.

ABSTRACT The persistence of larvicide product (Abate 1% SG) were evaluated for controlling *Aedes aegypti* L. larvae under field and simulated conditions. Laboratory strain of *Ae. aegypti* larvae were used in this study. Abate 1% SG was applied 1g per 10 liters of contained water or 1 ppm in a 200-litre jar. Twenty fourth-instar larvae of *Ae. aegypti* were added into the jar. Mortality of the larvae was recorded after 24 hours. Tests were performed continue weekly until the mortality rate of the larvae with less than 50% was observed. Results showed that under field conditions, the lethal times to kill 50% (LT₅₀) and 90% (LT₉₀) of the tested mosquitoes were 18.20 and 16.81 weeks, respectively while those LT₅₀ and LT₉₀ in simulated conditions were 25.93 and 24.13 weeks, respectively.

Key words: *Aedes aegypti* L. larvae, Abate, persistence, LT₅₀ and LT₉₀

การทดสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจวิเคราะห์ ความแรงของอิมมูโนโกลบูลินที่ทำจากมนุษย์สำหรับ ป้องกันโรคบาดทะยักด้วยชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูป

กนิษฐา ภูวนาถนรานบาล วิชชุดา จริยะพันธุ์ และสายวรุฬ จตุรภิตตินันท์

สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ โรคบาดทะยักเป็นโรคติดเชื้อในกลุ่มโรคทางประสาทและกล้ามเนื้อ เกิดจากสารพิษของ *Clostridium tetani* ซึ่งป้องกันได้ด้วยการฉีดวัคซีน หากผู้ติดเชื้อไม่มีภูมิคุ้มกันจะรักษาโดยใช้ยาปฏิชีวนะและเซรุ่มแกโรคบาดทะยักหรืออิมมูโนโกลบูลินที่ทำจากมนุษย์สำหรับป้องกันโรคบาดทะยัก ดังนั้น คุณภาพของผลิตภัณฑ์ดังกล่าวจึงเป็นปัจจัยสำคัญในการรักษา วิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ความแรงของอิมมูโนโกลบูลินที่ทำจากมนุษย์สำหรับป้องกันโรคบาดทะยัก เป็นชีววิธีที่ใช้สัตว์ทดลองทำให้มีต้นทุนและความแปรปรวนสูง ตำรายายุโรปฉบับปัจจุบันได้กำหนดวิธี enzyme-linked immunosorbent assay เป็นวิธีมาตรฐานทางเลือกในการตรวจวิเคราะห์ การทดสอบความถูกต้องของวิธีดังกล่าวนี้ใช้น้ำยาทดสอบสำเร็จรูปสำหรับการตรวจหาแอนติบอดีต่อสารพิษซึ่งเป็นแอนติเจนของเชื้อบาดทะยักในเลือด ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีพบว่าวิธีที่ใช้ผ่านเกณฑ์การทดสอบในหัวข้อความเที่ยง ความแม่นยำ ความเหมาะสมของระบบและความสัมพันธ์เชิงเส้น และมีขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณเท่ากับ 0.00208 IU/ml รวมทั้งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงหลังการหยุดปฏิกิริยาได้นานถึง 2.30 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าวิธีการตรวจวิเคราะห์ความแรงของอิมมูโนโกลบูลินที่ทำจากมนุษย์สำหรับป้องกันโรคบาดทะยักด้วยชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปโดยวิธี ELISA มีความถูกต้องและเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานของประเทศ

บทนำ

โรคบาดทะยักเป็นโรคติดเชื้อที่จัดอยู่ในกลุ่มของโรคทางประสาทและกล้ามเนื้อเกิดจากการได้รับสารพิษของเชื้อแบคทีเรีย *Clostridium tetani* ซึ่งป้องกันได้ด้วยวัคซีนป้องกันโรคบาดทะยัก หากไม่มีภูมิคุ้มกันสารพิษจะทำลายเส้นประสาทที่ควบคุมการทำงานของกล้ามเนื้อ ทำให้มีอาการปวดกล้ามเนื้อทั่วร่างกาย อาจทำให้กล้ามเนื้อช่วยหายใจไม่ทำงานเกิดภาวะหายใจลำบาก และอาจจะเสียชีวิตได้ ในการรักษาโรคบาดทะยัก นอกจากจะรักษาโดยให้ยาปฏิชีวนะเพื่อฆ่าเชื้อโรค แพทย์จะพิจารณาให้วัคซีนป้องกันโรคบาดทะยัก และให้เซรุ่มหรืออิมมูโนโกลบูลินที่ทำจากมนุษย์สำหรับป้องกันโรคบาดทะยัก ซึ่งเป็นแอนติบอดีต่อสารพิษหรือแอนติเจนของเชื้อบาดทะยัก โดยเซรุ่มหรืออิมมูโนโกลบูลินจะจับกับสารพิษที่อยู่ในกระแสเลือดทำให้ผู้ป่วยรอดชีวิตได้ ดังนั้น ประสิทธิภาพของเซรุ่มหรืออิมมูโนโกลบูลิน จึงเป็นปัจจัยสำคัญ^(1, 2, 3) เนื่องจากความสามารถในการทำลายจะขึ้นอยู่กับความแรงของเซรุ่มหรืออิมมูโนโกลบูลินในการจับกับสารพิษที่เป็นแอนติเจน ดังนั้น จึงต้องมีการตรวจสอบความแรงหรือแอนติบอดีของเซรุ่มหรืออิมมูโนโกลบูลินว่าเป็นไปตามที่ระบุในฉลากยาที่ได้รับอนุมัติขึ้นทะเบียนเพื่อให้การบริหารยาเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพในการรักษาผู้ป่วยได้

วิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจวิเคราะห์ความแรงของอิมมูโนโกลบูลินที่ทำจากมนุษย์สำหรับป้องกันโรคบาดทะยักตามตำราของยุโรปเป็นการตรวจสอบโดยใช้สัตว์ทดลอง (หนูถีบจักร) ซึ่งเป็นวิธีที่มีความยุ่งยากต้องจัดหาสัตว์ทดลองที่เหมาะสมและใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์นานถึง 4 วัน รวมทั้งต้นทุนจากการใช้สถานที่และการดูแลสัตว์ทดลองที่ต้องควบคุมสภาวะมีค่าใช้จ่ายสูง ซึ่งการตรวจวิเคราะห์โดยใช้สัตว์ทดลองจะมีความแปรปรวนเนื่องจากการทดสอบในสิ่งมีชีวิตจึงควบคุมได้ยากโอกาสที่จะมีความเบี่ยงเบนสูง และบางครั้งขาดแคลนสัตว์ทดลอง ผู้ผลิตอิมมูโนโกลบูลินและหน่วยงานภาครัฐทั่วโลกจึงมีความพยายามที่จะพัฒนาวิธีทดแทนการใช้สัตว์ทดลองโดยเฉพาะอย่างยิ่งการทดสอบในหลอดทดลอง (*in vitro assay*) เพื่อให้สอดคล้องกับจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองที่เป็นพื้นฐานสากลและมีการใช้กันทั่วโลกตามหลักการของ 3 Rs⁽⁴⁾ คือ การหลีกเลี่ยงการใช้สัตว์โดยใช้วิธีอื่นทดแทน (*replacement*) การใช้จำนวนสัตว์ทดลองให้น้อยที่สุด โดยยังคงความแม่นยำ (*reduction*) เมื่อจำเป็นต้องใช้ต้องมีวิธีปฏิบัติต่อสัตว์ให้ทรมาณน้อยที่สุด (*refinement*)⁽⁴⁾ ตำราสากลของยุโรปฉบับที่ 8 (*European Pharmacopoeia edition 8.0*) ได้ยอมรับ immunoassay เป็นวิธีมาตรฐานทั้งเทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และ Toxoid inhibitory assay (TIA)^(2, 5) ซึ่งเป็นที่ยอมรับว่าเป็นเทคนิคที่มีความไว เหมาะสมในการตรวจสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ซึ่งได้มีการศึกษาโดยการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA โดยเตรียมสารต่าง ๆ ขึ้นใช้เองในห้องปฏิบัติการและให้ผลน่าเชื่อถือ อย่างไรก็ตาม การเตรียมน้ำยาสำหรับ ELISA ให้มีคุณภาพสม่ำเสมอขึ้นต้องการความรู้ความชำนาญ ซึ่งห้องปฏิบัติการนั้น ๆ ต้องมีประสบการณ์ด้านเทคนิคนี้เพียงพอเพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องเชื่อถือได้

ปัจจุบันมีชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปด้วยวิธี ELISA สำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อบาดทะยักเมื่อได้รับวัคซีนในเลือดคนหลายยี่ห้อจากหลายประเทศ เช่น ชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปของบริษัท Genzyme Virotech GmbH บริษัท Euroimmun และบริษัท Serion-Verion ประเทศเยอรมนี ชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปของบริษัท Scimedx ของประเทศอเมริกา ชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปของบริษัท The Binding Site ประเทศสหราชอาณาจักร เป็นต้น^(3, 6, 7) ซึ่งเกณฑ์ในการเลือกใช้นั้นมาจากการทบทวนวรรณกรรมโดยเลือกชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปที่มีหลักฐานเชื่อถือได้ที่มีความเหมาะสมทั้งคุณภาพ ราคา และมีตัวแทนจำหน่ายในประเทศไทย การศึกษานี้จึงดำเนินการโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบเปรียบเทียบเบื้องต้นเพื่อเลือกชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปที่มีความเหมาะสมกับตัวอย่างที่ใช้วัด จากนั้นจึงนำชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปนั้นมาทดสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจวิเคราะห์ความแรงของอิมมูโนโกลบูลินที่ทำจากมนุษย์สำหรับป้องกันโรคบาดทะยักเพื่อลดการใช้งานสัตว์ทดลองและเป็นไปตามหลักการ 3Rs

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (microplate reader) รุ่น ELx 808 ของบริษัท BioTek สำหรับใช้ในการวัดค่าการดูดกลืนแสง
2. เครื่องบ่มเพาะเชื้อ (incubator) แบบควบคุมอุณหภูมิที่ 37 ± 1 องศาเซลเซียส

ชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูป สารมาตรฐาน และตัวอย่าง

ชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูป tetanus IgG ELISA (Genzyme Virotech GmbH, Germany) เป็นชุดน้ำยาทดสอบที่มีความไวเหมาะสมต่อตัวอย่างที่วิเคราะห์^(6, 7) เมื่อเทียบกับชุดน้ำยาทดสอบจากแหล่งผลิตอื่น โดยชุดน้ำยาทดสอบนี้ประกอบด้วย 96-well plate ที่เคลือบด้วยแอนติเจน น้ำยาสำหรับเจือจาง (sample diluents) น้ำยาสำหรับล้างเพลท (washing solution) tetanus IgG low positive รวมทั้งแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (anti-immunoglobulin conjugate) สารตั้งต้น (substrate) เพื่อทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ (3, 3', 5, 5' tetramethylbenzidine; TMB) และน้ำยาหยุดปฏิกิริยา (stop solution)⁽⁸⁾

สารมาตรฐานสากลที่ใช้เป็น 1st International standard for human tetanus immunoglobulin (code: TE-3) ได้จากหน่วยงาน National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) ประเทศสหราชอาณาจักรที่มีค่าความแรงเท่ากับ 120 IU/มิลลิลิตร⁽⁹⁾

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบเป็น Human tetanus immunoglobulin จำนวน 2 ยี่ห้อ (A และ B) ที่นำเข้าจำหน่ายในประเทศไทย โดยทำการทดสอบ 3 รุ่นการผลิตในแต่ละยี่ห้อ ซึ่งระบุเป็น 1A, 2A, 3A และ 1B, 2B, 3B

การเตรียมสารมาตรฐานและตัวอย่าง

เตรียมสารมาตรฐานและตัวอย่างโดยการเจือจางด้วย normal saline เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้มีความเข้มข้น 0.125, 0.25, 0.5 และ 1 IU/มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางในอัตราส่วน 1:50 ด้วย sample diluent ของชุดน้ำยาทดสอบ

การคำนวณ

ในการคำนวณค่าความแรงใช้โปรแกรม parallel line assay โดยกำหนดเกณฑ์มาตรฐานดังนี้ ค่าความสัมพันธ์ของการเตรียมสารมาตรฐานและตัวอย่าง (preparation) ต้องไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ค่าความสัมพันธ์ระหว่างสารมาตรฐานและตัวอย่างในลักษณะของ dose-response (regression) ต้องอยู่ในเกณฑ์ของความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ และกราฟที่ได้ต้องมีความสัมพันธ์ระหว่างสารมาตรฐานและตัวอย่างในลักษณะคู่ขนาน (parallelism) และเชิงเส้นตรง (linearity) นำผลของค่าความแรงจากโปรแกรมมาหาค่าเฉลี่ยทางชีวิตเพื่อมาคำนวณค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation, CV) ต่อไป^(10, 11)

วิธีวิเคราะห์

นำสารมาตรฐานสากลและตัวอย่างที่เตรียมไว้ในแต่ละความเข้มข้นใส่ลงในหลุมของ 96-well plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร และใส่น้ำยาสำหรับเจือจางปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม สำหรับใช้เป็น negative control (blank) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นล้างเพลทด้วยน้ำยาสำหรับล้างเพลทปริมาตร 350 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 4 ครั้ง โดยแต่ละครั้งล้างเพลทด้วยเครื่องล้างเพลทแบบอัตโนมัติ แล้วทำให้เพลทแห้ง

โดยการซับด้วยกระดาษกรองซับน้ำ จากนั้นเติมแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ล้างเพลทจำนวน 4 ครั้ง และเติมสารตั้งต้น TMB ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม ลงในแต่ละหลุม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จะเห็นสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน จากนั้นเติมน้ำยาหยุดปฏิกิริยาปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม ในทุกหลุม สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีเหลือง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร และความยาวคลื่นอ้างอิง (reference wavelength) 630 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท⁽⁹⁾ คำนวณผลโดยใช้โปรแกรม parallel line ระหว่างความเข้มข้นของ log anti-tetanus antibodies (log dose) และค่าการดูดกลืนแสง (response) เปรียบเทียบผลระหว่างค่าของสารมาตรฐานสากลและตัวอย่าง โดยกำหนดให้ค่ามาตรฐานมีค่าเท่ากับ 1 IU/มิลลิลิตร

การทดสอบความถูกต้องของวิธี (Method of Validation)

1. การทดสอบความเที่ยง (Precision)

1.1 การวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกัน (Repeatability)

ทดสอบหาค่าความแรงของตัวอย่างจำนวน 2 ยี่ห้อ ยี่ห้อละ 1 รุ่นการผลิต จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ ในวันเดียวกัน และนำค่าที่ได้มาคำนวณ %CV ซึ่งจะต้องมีค่า $\leq 10^{(12)}$

1.2 การวิเคราะห์ซ้ำต่างวัน (Intermediate precision: between-day variation)

ทดสอบหาค่าความแรงของตัวอย่างจำนวน 2 ยี่ห้อ ยี่ห้อละ 3 รุ่นการผลิต จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ ต่างวันกัน นำค่าที่ได้มาคำนวณค่า %CV ซึ่งจะต้องมีค่า $\leq 10^{(12)}$

1.3 การทดสอบโดยนักวิเคราะห์ 2 คน (Intermediate precision: between-analyst variation)

ทดสอบหาค่าความแรงของตัวอย่างจำนวน 1 ยี่ห้อ 1 รุ่นการผลิต จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ โดยนักวิเคราะห์ 2 คน และเปรียบเทียบค่าความแรงที่วัดได้โดยใช้ Student's t-test ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

2. การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

ทดสอบโดยนำตัวอย่างที่ได้จากการหาค่าเฉลี่ยของตัวอย่างในการทดสอบหาค่าความเที่ยง จำนวน 0.5 มิลลิลิตร เติมน้ำยามาตรฐานสากล 1st International standard ที่ทราบค่าความเข้มข้น ลงในตัวอย่างจำนวน 0.5 มิลลิลิตร และทำการทดสอบหาค่าความแรงของตัวอย่างจำนวน 2 ยี่ห้อ ยี่ห้อละ 1 รุ่นการผลิต จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ โดยแต่ละครั้งเป็นอิสระต่อกัน แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่า % recovery ที่ต้องอยู่ในช่วง 80-120 และค่า %CV ต้องมีค่าเท่ากับหรือน้อยกว่า 20

3. การทดสอบความคงทนของวิธี (Robustness)

ทดสอบหาค่าความแรงของตัวอย่างจำนวน 2 ยี่ห้อ ยี่ห้อละ 1 รุ่นการผลิต จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ วัดค่าการดูดกลืนแสง ณ เวลา 0, 20, 60, 105 และ 150 นาที หลังใส่น้ำยาหยุดปฏิกิริยา เพื่อตรวจสอบว่ามีความเปลี่ยนแปลงไปจากเกณฑ์กำหนดหรือไม่

4. การทดสอบความเหมาะสมของระบบและความสัมพันธ์เชิงเส้น (System suitability and linearity)

ตรวจสอบผลการทดสอบในแต่ละพารามิเตอร์ของการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีว่าค่าความสัมพันธ์ของการเตรียมสารมาตรฐานและตัวอย่าง (preparation) ต้องไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ค่าความสัมพันธ์

ระหว่างสารมาตรฐานและตัวอย่างในลักษณะของ dose-response (regression) ต้องอยู่ในเกณฑ์ของความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซนต์ และกราฟที่ได้ต้องมีความสัมพันธ์ระหว่างสารมาตรฐานและตัวอย่างในลักษณะคู่ขนาน (parallelism) และเชิงเส้นตรง (linearity)

5. ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation; LOQ)

ทดสอบโดยนำ tetanus IgG low positive ของชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปมาทำการทดสอบหาความแรงจำนวน 11 ครั้ง ครั้งละ 3 ขั้ว แล้วนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยและค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD)

ผล

1. การทดสอบความเที่ยง (Precision)

1.1 การวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกัน (Repeatability)

การทดสอบหาความแรงของตัวอย่าง 2 ยี่ห้อ (A และ B) ยี่ห้อละ 1 รุ่น การผลิต จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ขั้ว ในวันเดียวกัน โดยนักวิเคราะห์คนเดียว ผลการตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่าง A เท่ากับ 273.64, 264.13 และ 271.59 IU/มิลลิลิตร ตามลำดับ และผลการวิเคราะห์ตัวอย่าง B เท่ากับ 239.74, 226.46 และ 239.90 IU/มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยพบว่าค่า %CV จากการทดสอบในตัวอย่าง 2 ยี่ห้อ เท่ากับ 1.50 และ 1.77 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ซึ่งมีค่า %CV น้อยกว่า 10 เป็นไปตามเกณฑ์การทดสอบ

ตารางที่ 1 การทดสอบความเที่ยงโดยการวิเคราะห์ซ้ำภายในวันเดียวกัน (Repeatability)

ครั้งที่	ตัวอย่าง A (IU/มิลลิลิตร)	ตัวอย่าง B (IU/มิลลิลิตร)
1	273.64	239.74
2	264.13	226.46
3	271.59	239.90
Weighted geometric mean (WGM)	271.28	236.93
Geometric standard deviation (GSD)	1.02	1.02
%CV	1.50	1.77

1.2 การวิเคราะห์ซ้ำต่างวัน (Intermediate precision: between-day variation)

การทดสอบหาความแรงของตัวอย่าง 2 ยี่ห้อ ยี่ห้อละ 3 รุ่นการผลิต จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ขั้ว ต่างวันกัน โดยนักวิเคราะห์คนเดียว พบว่าตัวอย่าง A รุ่นการผลิตที่ 1A, 2A และ 3A มีค่า %CV ในแต่ละรุ่นการผลิต เท่ากับ 2.16, 1.18 และ 1.65 ตามลำดับ ในขณะที่ตัวอย่าง B รุ่นการผลิตที่ 1B, 2B และ 3B มีค่า %CV ในแต่ละรุ่นการผลิต เท่ากับ 2.06, 1.85 และ 1.46 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าผลการทดสอบดังกล่าวมีค่า %CV น้อยกว่า 10 เป็นไปตามเกณฑ์การทดสอบ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 การทดสอบความเที่ยงโดยการวิเคราะห์ซ้ำต่างวัน (Intermediate precision: between-day variation)

ครั้งที่	รุ่นการผลิตของตัวอย่าง A (IU/มิลลิลิตร)			รุ่นการผลิตของตัวอย่าง B (IU/มิลลิลิตร)		
	1A	2A	3A	1B	2B	3B
1	282.38	245.48	309.44	246.91	160.80	176.91
2	273.54	270.21	300.98	234.19	184.29	204.02
3	272.22	278.57	302.50	217.07	187.33	190.37
WGM	275.53	271.15	303.11	232.37	179.55	197.60
GSD	1.02	1.01	1.02	1.02	1.02	1.01
%CV	2.16	1.18	1.65	2.06	1.85	1.46

1.3 การทดสอบโดยนักวิเคราะห์ 2 คน (Intermediate precision: between-analyst variation)

การทดสอบหาความแรงของตัวอย่างจำนวน 1 ยี่ห้อ 1 รุ่นการผลิต จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ โดยนักวิเคราะห์ 2 คน พบว่านักวิเคราะห์คนที่ 1 เป็นผลวิเคราะห์ที่ได้จากการทำการวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกัน (ข้อ 1.1) และการวิเคราะห์ซ้ำต่างวัน (ข้อ 1.2) ซึ่งได้ผลการวิเคราะห์เท่ากับ 273.64, 264.13, 271.59, 282.38, 273.54 และ 272.22 IU/มิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 272.91 IU/มิลลิลิตร สำหรับนักวิเคราะห์คนที่ 2 ทำการวิเคราะห์ 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ โดยแต่ละครั้งเป็นอิสระต่อกันได้ผลการวิเคราะห์เท่ากับ 222.24, 253.19 และ 209.57 IU/มิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 228.33 IU/มิลลิลิตร และเมื่อนำมาเปรียบเทียบค่าความแรงที่วัดได้โดยใช้ Student's t-test ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($P = 0.071$) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าผลการวิเคราะห์ของนักวิเคราะห์ทั้ง 2 คน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 การทดสอบความเที่ยงโดยนักวิเคราะห์ 2 คน (Intermediate precision: between-analyst variation)

	ผลการทดสอบ (IU/ml)	ค่าเฉลี่ย	Sig. (2-tailed)
นักวิเคราะห์ 1	271.59	272.91	0.071*
	264.13		
	273.64		
	282.38		
	273.54		
	272.22		
นักวิเคราะห์ 2	222.24	228.33	
	253.19		
	209.57		

*อักษรแสดงความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ Student's t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

2. การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

ทดสอบโดยนำตัวอย่าง 2 ยี่ห้อ มาเติมสารมาตรฐาน 1st International standard ที่ความเข้มข้น 1 IU/มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างจำนวน 0.5 มิลลิลิตร แล้วนำมาผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน และทำการทดสอบหาความแรงของตัวอย่างจำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ โดยแต่ละครั้งเป็นอิสระต่อกัน ผลการตรวจวิเคราะห์ ผลการทดสอบของตัวอย่าง A และ B มีค่า %recovery เท่ากับ 85.71 และ 85.57 และมีค่า %CV เท่ากับ 2.02 และ 2.28 ตามลำดับ

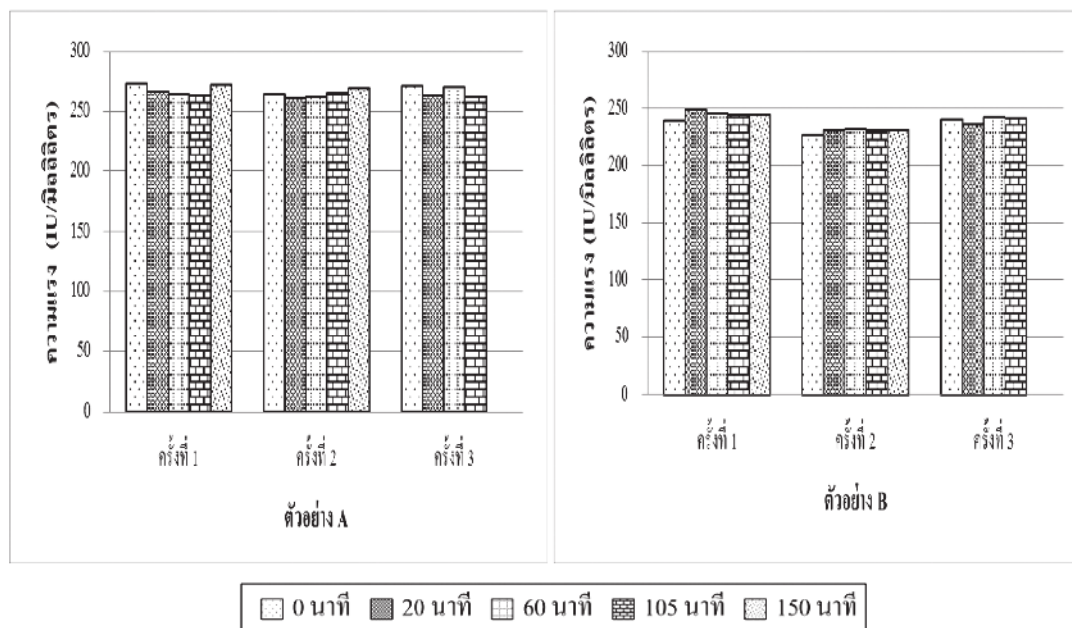
ซึ่งแสดงให้เห็นว่าผลการทดสอบดังกล่าวเป็นไปตามเกณฑ์การทดสอบโดยมีค่า % recovery อยู่ในช่วง 80-120 และ %CV มีค่าน้อยกว่า 20 (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

ครั้งที่	ค่าความแรง เฉลี่ยของ ตัวอย่าง (IU/ มิลลิลิตร)	ค่าความแรงที่ ทราบค่าของ สารมาตรฐาน (IU/ มิลลิลิตร)	ค่าความแรง ของสารมาตรฐาน และตัวอย่าง (IU/ มิลลิลิตร)	ผลการ วิเคราะห์ (IU/ มิลลิลิตร)	WGM	GSD	%CV	% recovery
ตัวอย่าง A								
1	0.55	0.50	1.05	0.93	0.90	1.02	2.02	85.71
2	0.55	0.50	1.05	0.94				
3	0.55	0.50	1.05	0.86				
ตัวอย่าง B								
1	0.47	0.50	0.97	0.84	0.83	1.02	2.28	85.57
2	0.47	0.50	0.97	0.90				
3	0.47	0.50	0.97	0.79				

3. การทดสอบความคงทนของวิธี (Robustness)

จากการวิเคราะห์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ระยะเวลาต่าง ๆ หลังใส่น้ำยาหยุดปฏิกิริยาเพื่อหยุดปฏิกิริยา ณ เวลา 0, 20, 60, 105 และ 150 นาที โดยทดสอบในตัวอย่าง 2 ยี่ห้อ จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ข้ำ ผลการทดสอบแสดงดังภาพที่ 1 พบว่าตัวอย่าง A ได้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีค่า %CV เท่ากับ 0.73, 1.78 และ 1.08 ตามลำดับ ในขณะที่ตัวอย่าง B ได้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีค่า %CV เท่ากับ 1.04, 1.84 และ 1.37 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าผลการทดสอบดังกล่าวมีค่า %CV น้อยกว่า 10 ตามเกณฑ์การทดสอบ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 แนวโน้มของค่าความแรงของ Human tetanus immunoglobulin 2 ยี่ห้อ (A และ B) เมื่อทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงหลังใส่น้ำยาหยุดปฏิกิริยาที่เวลา 0, 20, 60, 105 และ 150 นาที

4. การทดสอบความเหมาะสมของระบบและความสัมพันธ์เชิงเส้น (System suitability and linearity)

จากการทดสอบทุกหัวข้อของการทดสอบความถูกต้องของวิธี พบว่ามีค่าที่ยอมรับได้อยู่ในเกณฑ์ทั้งหมด

5. ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation; LOQ)

เป็นการหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบและสามารถรายงานค่าได้ โดยเป็นระดับความเข้มข้นของสารที่ให้สัญญาณเป็น 10 เท่าของ SD ซึ่งจากการตรวจวิเคราะห์โดยใช้ low positive ของชุดทดสอบเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานจำนวน 11 ครั้ง และนำผลที่ได้มาหาค่า SD และนำมาหาค่า LOQ ได้เท่ากับ 0.00208 IU/มิลลิลิตร (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 การทดสอบขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation)

No.	1	2	3	4	5	6
Result	0.00249	0.00233	0.00245	0.00280	0.00237	0.00238
No.	7	8	9	10	11	
Result	0.00233	0.00261	0.00299	0.00262	0.00254	
Mean	0.00254					
SD	0.000208					
10SD	0.00208					

วิจารณ์

จากการตรวจวิเคราะห์หาค่าความแรงของ Human tetanus immunoglobulin โดยใช้ชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปด้วยวิธี ELISA พบว่าผลการทดสอบความเที่ยงจากการวิเคราะห์ซ้ำภายในวันเดียวและต่างวัน มีค่า %CV น้อยกว่า 3 จากเกณฑ์กำหนด 10 แสดงให้เห็นว่าวิธีการทดสอบมีความเที่ยงในการตรวจวัดแม้จะตรวจวิเคราะห์คนละครั้งหรือต่างวันกันค่าที่ได้มีความแปรปรวนน้อยมาก และเมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์เทียบระหว่างนักวิเคราะห์ 2 คน ด้วยสถิติ Student's t-test ที่ความเชื่อมั่น 95 % พบว่า P-value มีค่าเท่ากับ 0.071 แสดงให้เห็นว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างนักวิเคราะห์ รวมทั้งวิธีดังกล่าวมีความแม่นยำเหมาะสมต่อการทดสอบ เนื่องจากค่า % recovery จากการใส่สารมาตรฐานลงในตัวอย่าง และ %CV มีค่าอยู่ในเกณฑ์กำหนด สามารถตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงหลังใส่น้ำยาหยุดปฏิกิริยาได้นานถึง 150 นาที หรือ 2.30 ชั่วโมง และสามารถวัดปริมาณความแรงได้น้อยที่สุดถึง 0.00208 IU/มิลลิลิตร ในขณะที่ค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐานของชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปที่น้อยที่สุดที่สามารถวัดได้ตามเอกสารกำกับชุดน้ำยาทดสอบคือ 0.001 IU/มิลลิลิตร⁽⁸⁾ ซึ่งพบว่ามีค่าใกล้เคียงกันถึงแม้จะใช้ชนิดของตัวอย่างและสารมาตรฐานต่างกัน โดยชุดน้ำยาทดสอบนี้ใช้สำหรับตรวจวิเคราะห์หาปริมาณแอนติบอดีในซีรัมผู้ป่วยที่มีปริมาณน้อยมาก ซึ่งผู้วิเคราะห์ได้นำมาประยุกต์ใช้สำหรับการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดีในตัวอย่างที่มีปริมาณแอนติบอดีสูง และใช้สารมาตรฐานสากลของ NIBSC แทนการใช้สารมาตรฐานที่มาพร้อมกับชุดน้ำยาทดสอบ

นอกจากนี้ วิธีดังกล่าวยังแสดงให้เห็นถึงความเหมาะสมต่อการตรวจวิเคราะห์และความเชื่อถือได้ตามหลักวิชาการ เนื่องจากค่าที่ได้จากการคำนวณด้วยโปรแกรม parallel line จะต้องมีความที่ยอมรับได้ทางสถิติจึงจะสามารถ

นำไปรายงานผลวิเคราะห์ โดยพิจารณาจากลักษณะความสัมพันธ์ของเส้นกราฟระหว่าง log dose และค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานและตัวอย่างที่มีความสัมพันธ์ในลักษณะที่เป็นเส้นตรงและคู่ขนาน และตรวจสอบผลการคำนวณทางสถิติของแต่ละแฟคเตอร์ ได้แก่ preparation, regression, parallelism, linearity และ homogeneity of variance พบว่าค่า F-value ของแฟคเตอร์ในการคำนวณจากโปรแกรมในทุกหัวข้อของการทดสอบความถูกต้องของวิธีมีค่าที่ยอมรับได้อยู่ในเกณฑ์ทั้งหมด

การใช้ชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปด้วยวิธี ELISA สำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อบาดทะยักเมื่อได้รับวัคซีนในเลือดคนมาตรวจวิเคราะห์ความแรงของ Human tetanus immunoglobulin ให้ผลที่น่าเชื่อถือเป็นวิธีที่มีต้นทุนต่ำกว่าการใช้สัตว์ทดลอง ใช้เวลาในการวิเคราะห์เพียง 1 วัน เมื่อเทียบกับการใช้สัตว์ทดลองที่ต้องใช้เวลาจนถึง 4 วัน และมีความแปรปรวนของการทดสอบน้อยกว่าเนื่องจากไม่ต้องใช้สิ่งมีชีวิตที่ควบคุมการทดสอบได้ยากกว่า ที่สำคัญทำให้ไม่ต้องฆ่าสัตว์ และวิธีนี้ยังคงให้ผลการตรวจประสิทธิภาพที่เชื่อถือได้ จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นวิธีทางเลือก และหากห้องปฏิบัติการต่างๆ เลือกใช้วิธีนี้จะทำให้ลดการใช้สัตว์ทดลองเป็นจำนวนมาก ดังนั้นชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปที่ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีนี้ จะสามารถลดความแปรปรวนของผลการตรวจสอบได้โดยไม่ต้องเตรียมน้ำยาสำหรับ ELISA เอง

สรุป

วิธีการตรวจวิเคราะห์ความแรงของเซรัมแก้โรคบาดทะยักด้วยวิธี ELISA โดยใช้ชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูปมีความเที่ยง ความแม่นยำ ความทนทาน และมีความเหมาะสมให้ผลการตรวจวิเคราะห์ได้ถูกต้อง เชื่อถือได้ สามารถลดขั้นตอน ระยะเวลา ต้นทุน และยกเลิกการใช้สัตว์ทดลองได้ จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการตรวจหาประสิทธิภาพ Human tetanus immunoglobulin ที่ใช้ในประเทศในการควบคุมกำกับประสิทธิภาพของอิมมูโนโกลบูลินที่ทำจากมนุษย์สำหรับป้องกันโรคบาดทะยัก

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ดำเนินการโดยใช้งบประมาณของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข และขอขอบคุณนายธีระพล คชาชีวะ นางนพพร อนันตสินกุล และนายอัศจรรย์ อาเมน ที่ให้ความรู้และคำแนะนำสถิติที่ใช้ในงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค. โรคบาดทะยัก. [ออนไลน์]. 2548. [เข้าถึงเมื่อ 4 พฤษภาคม 2559]; [3 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: <http://www.boe.moph.go.th/fact/Tetanus.htm>
2. Gross S, Janssen SWJ, de Vries B, Terao E, Daas A, Buchheit KH. Collaborative study for the validation of alternative in vitro potency assays for human tetanus immunoglobulins. *Biologicals* 2010; 38(4): 501–10.
3. Aybay C, Karakus R, GÜndoğdu AG. Development of a diagnostic and screening Elisa system for measuring tetanus antitoxoid levels. *Turk J Med Sci* 2003; 33(5): 289–94.
4. Animal Ethics Infolink. Three Rs. [online]. 2015. [cited 2016 May 4]. Available from: <http://www.animaethics.org.au/three-rs>
5. European Pharmacopoeia. Human tetanus immunoglobulin. 8th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2014. p. 2432–4.

6. Perry AL, Hayes AJ, Cox HA, Alcock F, Parker AR. Comparison of five commercial anti-tetanus toxoid immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assays. *Clin Vaccine Immunol* 2009; 16(12): 1837-9.
 7. van Hoeven KH, Dale C, Foster P, Body B. Comparison of three enzyme-linked immunosorbent assays for detection of immunoglobulin G antibodies to tetanus toxoid with reference standards and the impact on clinical practice. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15(12): 1751-4.
 8. Tetanus ELISA IgG Testkit: EC 124.00 REV 18. Rüsselsheim: Sekisul Virotech GmbH [online]. 2014. [cited 2016 May 4]; [10 screens]. Available from: http://www.sekisuidiagnostics.com/writable/product_documents/files/tetanus_elisa_igg_ec124.00_gb.pdf
 9. National Institute for Biological Standards and Control. WHO international standard 1st international standard for tetanus immunoglobulin, human.: TE-3 Version 8.0. Hertfordshire: NIBSC; 2013.
 10. National Institute of Infectious Diseases. Biostatistics program 2006: how to use the statistical quality control program [CD-ROM]. Tokyo: Ministry of Health, Labour and Welfare; 2006.
 11. Tierney R, Stickings P, Hockley J, Rigsby P, Iwaki M, Sesardic D. Collaborative study for the calibration of a replacement International Standard for Tetanus Toxoid Adsorbed. *Biologicals* 2011; 39(6): 404-16.
 12. European Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2. [online]. 2015. [cited 2016 May 4]; [23 screens]. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf
-

Method Validation for Potency Test of Human Tetanus Immunoglobulin by Commercial Test Kit

Kanitta Phuwanartnaranubarn Wichuda Jariyapan and Saywarul Jadoonkittinan
*Institute of Biological Products, Department of Medical Science, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000,
Thailand.*

ABSTRACT Tetanus is an infectious disease in neuromuscular diseases group caused by *Clostridium tetani*. Tetanus can be prevented by vaccination. If any patient has no immunity against tetanus, antibiotics and tetanus antiserum or human tetanus immunoglobulin are required for treatment. Therefore, the quality of the product is an important factor for effective treatment. The standard method for potency testing of human tetanus immunoglobulin is in vivo method which is high variation and costly. For this reason, the current European Pharmacopoeia has adopted Enzyme-linked Immunosorbent Assay as an alternative standard method. In this study, the commercial ELISA test kit for tetanus immunoglobulin in specimen was used. The results showed that the precision, accuracy, linearity and system suitability meet the validation criteria. The LOQ was 0.00208 IU/ml; and the absorbance after the reaction stopped could be measured up to 2.30 hours. In conclusion, the potency testing of human tetanus immunoglobulin by the commercial ELISA test kit is suitable to adopt as a national standard method.

Key words: tetanus immunoglobulin, ELISA test kit, potency

ผลการพัฒนาห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัยในโรงพยาบาล สังกัดกระทรวงสาธารณสุขในเขตสุขภาพที่ 9

สุภา ศิ สยมภูจินันท์ อุมวดี สังข์ทอง และอรุณรัตน์ ปิตาทุม

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 9 นครราชสีมา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อำเภอเมือง นครราชสีมา 30000

บทคัดย่อ ภาพถ่ายทางรังสีเป็นกุญแจสำคัญที่ช่วยในการวินิจฉัยโรค แต่การถ่ายภาพเอกซเรย์ต้องเป็นไปอย่างมีคุณภาพมาตรฐาน เพื่อป้องกันไม่ให้ผู้รับบริการได้รับปริมาณรังสีเกินความจำเป็น ดังนั้น จึงต้องนำระบบคุณภาพมาควบคุมกำกับ การปฏิบัติงาน กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้จัดทำเกณฑ์และแนวทางการพัฒนางานรังสีวินิจฉัยในโรงพยาบาลสังกัดกระทรวงสาธารณสุขขึ้นตั้งแต่ปี พ.ศ. 2555 เพื่อตรวจประเมินคุณภาพงานรังสีวินิจฉัยของโรงพยาบาล โดยมีการประเมิน 3 ส่วน คือ ความปลอดภัย บริการรังสีวินิจฉัย และคุณภาพบริการ ได้ดำเนินการต่อเนื่อง สำหรับปีงบประมาณ 2558 ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 9 นครราชสีมา ได้ตรวจประเมินโรงพยาบาลสังกัดกระทรวงสาธารณสุขในเขตสุขภาพที่ 9 (นครราชสีมา, ชัยภูมิ, บุรีรัมย์ และสุรินทร์) จำนวน 56 แห่ง พบว่า ผ่านเกณฑ์การประเมิน 25 แห่ง (ร้อยละ 44.64) โดยผ่านเกณฑ์ขั้นพื้นฐาน 1 แห่ง (ร้อยละ 1.79) ผ่านเกณฑ์ขั้นดี 16 แห่ง (ร้อยละ 28.57) และผ่านเกณฑ์ขั้นดีเด่น 8 แห่ง (ร้อยละ 14.29) โดยส่วนที่มีการพัฒนามากที่สุดคือ ส่วนที่ 3 คุณภาพบริการ คะแนนเฉลี่ยร้อยละ 87.21 รองลงมาคือ ส่วนที่ 1 ความปลอดภัย คะแนนเฉลี่ยร้อยละ 72.92 ต่ำสุดคือ ส่วนที่ 2 บริการรังสีวินิจฉัย คะแนนเฉลี่ยร้อยละ 70.53 ข้อบกพร่องที่พบมากที่สุดคือ ไม่มีการควบคุมคุณภาพตู้ส่งดูฟิล์มหรือจอภาพ ไม่มีแผนการควบคุมคุณภาพเครื่องมือทางรังสี ขาดการประเมินค่าปริมาณรังสีที่ผู้ป่วยได้รับจากการถ่ายภาพรังสีวินิจฉัยและบุคลากรทางด้านรังสีไม่เพียงพอตามภาระงาน ทั้งนี้ ได้นำปัญหาที่พบนำเสนอให้โรงพยาบาลเพื่อวางแผนในการพัฒนาต่อไป

Accepted for publication, 2 June 2016

บทนำ

เครื่องเอกซเรย์เป็นเครื่องมือพื้นฐานที่แพทย์ใช้ในการวินิจฉัยโรค แต่การถ่ายภาพเอกซเรย์ต้องเป็นไปอย่างมีคุณภาพมาตรฐาน ผู้ป่วยที่จำเป็นต้องได้รับการถ่ายภาพรังสี ต้องได้รับปริมาณรังสีที่เหมาะสม การใช้รังสีต้องเกิดประโยชน์สูงสุดและใช้ในปริมาณน้อยที่สุดเท่าที่จะทำได้ตามหลักสากลที่เรียกว่า ALARA (As Low As Reasonably Achievable) ตามคำแนะนำของคณะกรรมการว่าด้วยการป้องกันรังสีระหว่างประเทศ (International Commission on Radiological Protection)⁽¹⁾ ทั้งนี้ ประเทศไทยมีการจัดทำมาตรฐานงานบริการรังสีไว้ในมาตรฐานบริการสาธารณสุขของกรมสนับสนุนบริการสุขภาพ กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2550⁽²⁾ การจัดทำแนวทางการตรวจประเมินบริการรังสีวิทยาในสถานพยาบาลประเภทที่รับผู้ป่วยไว้ค้างคืนของกองการประกอบโรคศิลปะ กรมสนับสนุนบริการสุขภาพ กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2551⁽³⁾ ที่เน้นการตรวจประเมินโรงพยาบาลเอกชน แต่ยังไม่ครอบคลุมในทุกด้าน

สำหรับกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้ดำเนินโครงการพัฒนางานรังสีวินิจฉัยในโรงพยาบาลตั้งแต่ปี 2550-2554 โดยจัดการฝึกอบรมถ่ายทอดความรู้เรื่องงานประกันคุณภาพงานรังสีวินิจฉัยให้กับเจ้าหน้าที่รังสีของโรงพยาบาลทั่วประเทศ ต่อมาในปี 2555 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้ผลักดันการพัฒนาคุณภาพห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัยอย่างเป็นรูปธรรมและได้จัดทำหนังสือเกณฑ์และแนวทางการพัฒนาคุณภาพงานรังสีวินิจฉัย โรงพยาบาลในสังกัดกระทรวงสาธารณสุข⁽⁴⁾ ขึ้น โดยนำเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลกมาใช้เป็นต้นแบบ⁽⁵⁾ และในปีงบประมาณ 2557 คุณภาพและมาตรฐานในการบริการของห้องปฏิบัติการทางรังสีวินิจฉัยได้ถูกนำไปเป็นตัวชี้วัดในระดับกระทรวงสาธารณสุข และได้มีการนำเกณฑ์ดังกล่าวไปใช้ในการประเมินห้องปฏิบัติการทางรังสีวินิจฉัย แต่เนื่องจากเกณฑ์การประเมินบางข้อไม่สอดคล้องกับบริบทของพื้นที่ ดังนั้น กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้ทำการปรับปรุงขึ้นใหม่ในปี 2558⁽⁶⁾ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาคุณภาพห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัยร่วมกัน ประกอบด้วยสาระสำคัญ 3 ส่วน คือ ด้านความปลอดภัย บริการรังสีวินิจฉัย และคุณภาพการบริการ ดังนั้น กิจกรรมที่สำคัญที่โรงพยาบาลจะต้องดำเนินการคืองานประกันคุณภาพรังสีวินิจฉัย ซึ่งไม่เพียงแต่การควบคุมคุณภาพเครื่องมือ ยังรวมถึงการบริหารจัดการการพัฒนาความรู้บุคลากร และการพัฒนาระบบบริการ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 9 นครราชสีมา มีโรงพยาบาลที่ให้บริการด้านรังสีวินิจฉัยทั้งสิ้น 82 แห่ง และได้รับการรับรองทางห้องปฏิบัติการไปในปี 2557 แล้วจำนวน 26 แห่ง คงเหลือที่จะต้องพัฒนาจำนวน 56 แห่ง

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินผลการพัฒนาคุณภาพห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัยในโรงพยาบาลสังกัดกระทรวงสาธารณสุขในเขตสุขภาพที่ 9 ประจำปี 2558 หลังจากมีการนำเกณฑ์และแนวทางในการพัฒนางานรังสีฯ ที่มีการปรับปรุงใหม่ไปใช้งาน เพื่อเป็นข้อมูลในการวางแผนพัฒนาคุณภาพห้องปฏิบัติการของงานรังสีวินิจฉัยต่อไป

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. แบบประเมินคุณภาพงานรังสีวินิจฉัยโรงพยาบาลสังกัดกระทรวงสาธารณสุขประกอบด้วย 3 ส่วน คือ
 - ส่วนที่ 1 ความปลอดภัย เป็นการประเมินเกี่ยวกับคุณภาพเครื่องมืออุปกรณ์ ความปลอดภัยของผู้ปฏิบัติงานและผู้รับบริการ (โรงพยาบาลศูนย์ และโรงพยาบาลทั่วไป 35 ข้อ โรงพยาบาลชุมชน 31 ข้อ)
 - ส่วนที่ 2 บริการรังสีวินิจฉัย เป็นการประเมินเกี่ยวกับบุคลากร สถานที่ สิ่งแวดล้อม และการประกันคุณภาพ จัดการตามมาตรฐานการบริการรังสีวินิจฉัย (โรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไป 50 ข้อ โรงพยาบาลชุมชน 50 ข้อ)

ส่วนที่ 3 คุณภาพบริการ เป็นการประเมินเกี่ยวกับเรื่องที่ทำให้บริการผู้ป่วย ได้แก่ ห้องเปลี่ยนเสื้อผ้า ที่พักรอ วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้กับผู้ป่วย สิ่งของที่มอบให้กับผู้ป่วย คุณภาพการให้บริการ การประเมินความเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับผู้ป่วย และการสำรวจความพึงพอใจในการให้บริการ (โรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไป 28 ข้อ โรงพยาบาลชุมชน 26 ข้อ) โดยแต่ละข้อจะแบ่งคะแนนตามเกณฑ์เป็นเป็น 2 ระดับ คือ

เกณฑ์ระดับพื้นฐาน (The Must) หมายถึง ข้อปฏิบัติที่งานรังสีวินิจฉัยจำเป็นต้องมี ต้องดำเนินการ ข้อละ 1-2 คะแนน

เกณฑ์ระดับดีเด่น (The Best) หมายถึง ข้อปฏิบัติที่งานรังสีวินิจฉัยดำเนินการเพิ่มเติมจากเกณฑ์ระดับพื้นฐาน ข้อละ 2 คะแนน

2. คณะทำงานห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัยในระดับจังหวัด ประกอบด้วยเจ้าหน้าที่รังสีจากโรงพยาบาลภายในจังหวัด

3. คณะทำงานห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัยในระดับเขต ประกอบด้วยเจ้าหน้าที่รังสีจากโรงพยาบาลศูนย์ โรงพยาบาลทั่วไปและโรงพยาบาลชุมชนในแต่ละจังหวัด ผู้แทนจากสำนักงานสาธารณสุขจังหวัด และเจ้าหน้าที่จากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 9 นครราชสีมา

4. ผู้ตรวจประเมินระดับเขต คือคณะทำงานในระดับเขตที่ผ่านการอบรมหลักสูตรการเป็นผู้ตรวจประเมินจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์แล้ว

ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. ชี้แจงขั้นตอนในการดำเนินการและเกณฑ์การประเมินคุณภาพห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัยให้กับเจ้าหน้าที่รังสีของโรงพยาบาลทุกจังหวัดเพื่อให้มีความเข้าใจในแนวทางการตรวจประเมินที่ตรงกัน โดยศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 9 นครราชสีมา และสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดในทุกจังหวัดในเขตสุขภาพที่ 9 ดำเนินการร่วมกัน

2. ห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัยประเมินตนเองตามเกณฑ์ด้วยแบบประเมินที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 9 นครราชสีมา จัดส่งให้

3. การจัดอบรมเพื่อเพิ่มองค์ความรู้ให้กับเจ้าหน้าที่รังสีของโรงพยาบาล โดยศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 9 นครราชสีมา จัดให้มีการอบรมเกี่ยวกับการควบคุมคุณภาพและการบำรุงรักษาเครื่องมือที่สำคัญและอุปกรณ์ต่างๆ ในห้องปฏิบัติการทางรังสีวินิจฉัยทั้งระบบฟิล์มและระบบดิจิทัลให้กับเจ้าหน้าที่รังสีของโรงพยาบาลในเขตสุขภาพที่ 9 จำนวน 1 ครั้ง ในวันที่ 25-27 กุมภาพันธ์ 2558 โดยมีผู้เข้าอบรมทั้งสิ้น จำนวน 55 คน

4. ดำเนินการตรวจประเมินแบ่งเป็น 2 ระดับ ดังนี้

4.1 ตรวจประเมินในระดับจังหวัด (Internal audit)

4.2 ตรวจประเมินในระดับเขต (External audit) ในลักษณะไขว้จังหวัดและนักฟิสิกส์รังสีจากศูนย์ฯ เป็นผู้นำทีมลงตรวจประเมินทุกโรงพยาบาล เพื่อป้องกันการโน้มเอียงของผลการประเมินและปรับแนวทางการประเมินให้ไปในทิศทางเดียวกัน

5. การประมวลผล โดยนำผลการประเมินตามเกณฑ์แต่ละข้อมาพิจารณาเพื่อสรุปผลการประเมิน ดังนี้

5.1 ไม่ผ่านเกณฑ์การประเมิน หมายถึง ไม่ผ่านเกณฑ์ the must ทุกข้อ

5.2 ผ่านเกณฑ์การประเมิน หมายถึง ผ่านเกณฑ์ the must ทุกข้อ โดยแบ่งเป็น 3 ระดับ คือ

- ผ่านเกณฑ์ขั้นพื้นฐาน คือ ผ่านเกณฑ์ the must ทุกข้อ และได้คะแนนน้อยกว่าร้อยละ 75
- ผ่านเกณฑ์ขั้นดี คือ ผ่านเกณฑ์ the must ทุกข้อ และได้คะแนนไม่น้อยกว่าร้อยละ 75
- ผ่านเกณฑ์ระดับดีเด่น คือ ผ่านเกณฑ์ the must ทุกข้อ และได้คะแนนไม่น้อยกว่าร้อยละ 85

6. รวบรวมข้อมูลปัญหาต่างๆ ที่พบจากการประเมินเพื่อนำไปวางแผนพัฒนาในปีต่อไป

ผล

ผลการตรวจประเมินคุณภาพห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัยในโรงพยาบาลสังกัดกระทรวงสาธารณสุขในเขตสุขภาพที่ 9 จำนวน 56 แห่ง ประกอบด้วย โรงพยาบาลศูนย์ 1 แห่ง โรงพยาบาลทั่วไป 3 แห่ง โรงพยาบาลชุมชน 50 แห่ง และโรงพยาบาลสังกัดกรมอื่น 2 แห่ง ผ่านเกณฑ์การประเมินจำนวน 25 แห่ง (ร้อยละ 44.64) โรงพยาบาลในจังหวัดนครราชสีมา จำนวน 21 แห่ง ผ่าน 8 แห่ง จังหวัดชัยภูมิ จำนวน 14 แห่ง ผ่าน 7 แห่ง จังหวัดบุรีรัมย์ จำนวน 13 แห่ง ผ่าน 7 แห่ง และจังหวัดสุรินทร์ จำนวน 8 แห่ง ผ่าน 3 แห่ง โดยผลการประเมินแบ่งเป็น 3 ระดับ คือ ผ่านเกณฑ์ขั้นพื้นฐาน จำนวน 1 แห่ง ผ่านเกณฑ์ขั้นดี จำนวน 15 แห่ง และผ่านเกณฑ์ขั้นดีเด่น จำนวน 9 แห่ง (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 สรุปผลการตรวจประเมินห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัยในโรงพยาบาลสังกัดกระทรวงสาธารณสุขในเขตสุขภาพที่ 9

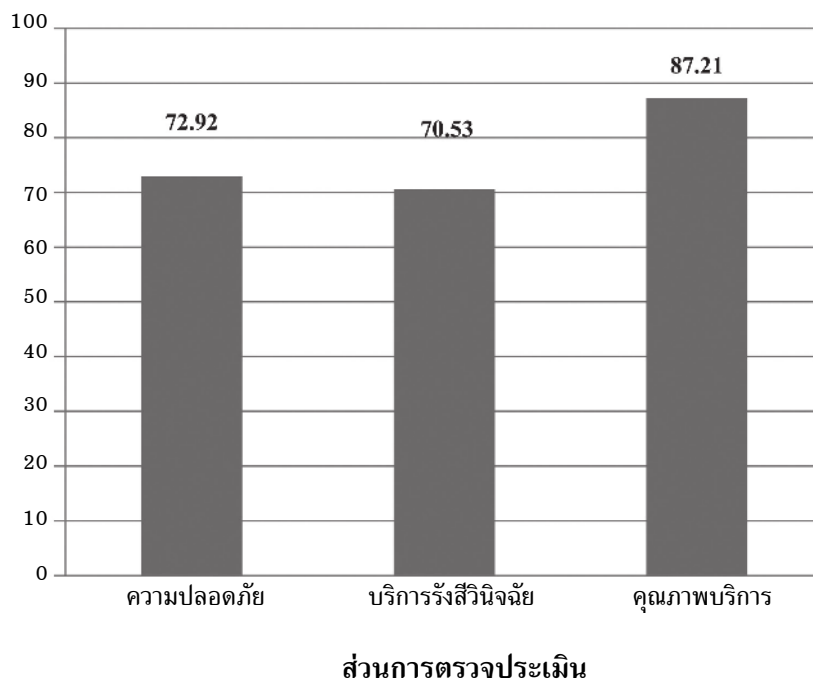
จังหวัด	ประเภท รพ.	จำนวน รพ.	ผลการประเมิน			
			ไม่ผ่านเกณฑ์	ผ่านเกณฑ์		
				ระดับพื้นฐาน	ระดับดี	ระดับดีเด่น
นครราชสีมา	รพ.ศูนย์	1	1	-	-	-
	รพ.ทั่วไป	2	1	-	-	1
	รพ.ชุมชน	16	9	-	5	2
	กรมอื่น	2	2	-	-	-
ชัยภูมิ	รพ.ศูนย์	-	-	-	-	-
	รพ.ทั่วไป	1	1	-	-	-
	รพ.ชุมชน	13	6	1	3	3
บุรีรัมย์	รพ.ศูนย์	-	-	-	-	-
	รพ.ทั่วไป	-	-	-	-	-
	รพ.ชุมชน	13	6	-	5	2
สุรินทร์	รพ.ศูนย์	-	-	-	-	-
	รพ.ทั่วไป	-	-	-	-	-
	รพ.ชุมชน	8	5	-	2	1
รวม		56	31	1	15	9
		56	31		25	
ร้อยละ			55.36		44.64	

ประเมินคะแนนตามแบบประเมินคุณภาพงานรังสีวินิจฉัยโรงพยาบาลสังกัดกระทรวงสาธารณสุขแยกตามประเภทโรงพยาบาล พบว่าโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไป มีคะแนนประเมินเฉลี่ยร้อยละ 76.87 สำหรับโรงพยาบาลชุมชนมีค่าคะแนนประเมินเฉลี่ยร้อยละ 75.69 และโรงพยาบาลสังกัดกรมอื่นในกระทรวงสาธารณสุข มีคะแนนประเมินเฉลี่ยร้อยละ 66.40 (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 คะแนนผลการตรวจประเมินห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัยในโรงพยาบาลสังกัดกระทรวงสาธารณสุข ในเขตสุขภาพที่ 9 แยกตามประเภทของโรงพยาบาล

ขนาดโรงพยาบาล	จำนวนโรงพยาบาล	คะแนนผลการประเมิน (ร้อยละ)		
		min	max	mean $\pm$ SD
โรงพยาบาลศูนย์/โรงพยาบาลทั่วไป	4	60.47	88.61	76.87 $\pm$ 12.15
โรงพยาบาลชุมชน	50	58.52	92.13	75.69 $\pm$ 9.36
กรมอื่น	2	63.44	66.35	66.40 $\pm$ 4.18

หากวิเคราะห์ผลการประเมินตามแบบประเมินคุณภาพงานรังสีวินิจฉัยโรงพยาบาลสังกัดกระทรวงสาธารณสุข ในแต่ละส่วน พบว่าส่วนที่มีการพัฒนามากที่สุดคือ ส่วนที่ 3 คุณภาพบริการได้คะแนนเฉลี่ยร้อยละ 87.21 รองลงมา คือ ส่วนที่ 1 ความปลอดภัย และส่วนที่ 2 บริการรังสีวินิจฉัย ได้คะแนนเฉลี่ยร้อยละ 72.92 และ 70.53 ตามลำดับ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 คะแนนผลการตรวจประเมินห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัยในโรงพยาบาลสังกัดกระทรวงสาธารณสุข ในเขตสุขภาพที่ 9 แบ่งตามส่วนที่ประเมิน

วิเคราะห์ข้อบกพร่องที่ไม่เป็นไปตามแบบประเมินในส่วนที่ 1 เรื่องความปลอดภัย ที่พบมากที่สุดคือ ไม่มีมาตรการ/แผนงาน เพื่อลดความเสี่ยงจากการได้รับอันตรายจากรังสี และอื่นๆ (ตารางที่ 3) ส่วนที่ 2 เรื่องการบริการรังสีวินิจฉัยที่พบมากที่สุดคือ ไม่มีการควบคุมคุณภาพตู้ส่งดูฟิล์มและ/หรือจอภาพ (Displayed monitor) (ตารางที่ 4) และข้อบกพร่องในส่วนที่ 3 เรื่องคุณภาพบริการ ที่พบมากที่สุดคือ ไม่มีการสำรวจความพึงพอใจและความคาดหวังของผู้รับบริการทั้งภายในและภายนอก (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 3 วิเคราะห์ข้อบกพร่องในส่วนที่ 1 ด้านความปลอดภัย

ลำดับ	รายการ	จำนวน (แห่ง)	ร้อยละของ รพ. ทั้งหมด
1	ไม่มีมาตรการ/แผนงานเพื่อลดความเสี่ยงจากการได้รับอันตรายจากรังสี และอื่นๆ	17	30.36
2	หน่วยงานไม่มีการบริหารความเสี่ยง (Risk Management) ที่ผู้ป่วยจะได้รับ	14	25.00
3	เครื่องเอกซเรย์ไม่ได้มาตรฐาน	13	23.21
4	ไม่มีคู่มือการใช้งานประจำเครื่องมือและอุปกรณ์ที่สำคัญ	12	21.43
5	ไม่มีเอกสารบันทึกการบำรุงรักษา (Preventive maintenance) เครื่องมือที่สำคัญ	11	19.64

ตารางที่ 4 วิเคราะห์ข้อบกพร่องในส่วนที่ 2 การบริการรังสีวินิจฉัย

ลำดับ	รายการ	จำนวน (แห่ง)	ร้อยละของ รพ. ทั้งหมด
1	ไม่มีการควบคุมคุณภาพตู้ส่งดูฟิล์มและ/หรือจอภาพ (Displayed monitor)	23	41.07
2	ไม่มีแผนการควบคุมคุณภาพเครื่องมือทางรังสีวิทยา ทั้งโดยนักรังสีเทคนิค และผู้เชี่ยวชาญจากหน่วยงานภายนอก	22	39.29
3	ไม่มีการประเมินค่าปริมาณรังสีที่ผู้ป่วยได้รับจากการถ่ายภาพรังสีวินิจฉัยทั่วไป	21	37.50
4	ไม่มีบัญชีรายการเครื่องมือที่ต้องดำเนินการควบคุมคุณภาพ รายการทดสอบ (QC Testing)	18	32.14
5	บุคลากรทางด้านรังสีไม่เพียงพอตามภาระงาน/ไม่มีการแนะนำ/อบรมเจ้าหน้าที่ใหม่ ไม่มีการวิเคราะห์ฟิล์มเสีย ไม่มีการตรวจสอบคุณภาพอุปกรณ์ป้องกันรังสี	14	25.00

ตารางที่ 5 วิเคราะห์ข้อบกพร่องในส่วนที่ 3 คุณภาพบริการ

ลำดับ	รายการ	จำนวน (แห่ง)	ร้อยละของ รพ. ทั้งหมด
1	ไม่มีการสำรวจความพึงพอใจและความคาดหวังของผู้รับบริการ ทั้งภายในและภายนอก	20	35.71
2	ไม่มีการศึกษาข้อมูลและสถิติซึ่งเป็นเครื่องชี้วัดผลการปฏิบัติงาน ที่สำคัญและนำสู่การพัฒนาคุณภาพอย่างต่อเนื่อง	17	30.36
3	กริด กริดคาสเซต ไม่พร้อมใช้งาน	5	8.93

วิจารณ์

ผลการประเมินการพัฒนาคุณภาพห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัยในโรงพยาบาลสังกัดกระทรวงสาธารณสุข ในเขตสุขภาพที่ 9 พบว่าผ่านเกณฑ์เพียง 25 แห่ง เท่านั้น คะแนนส่วนใหญ่อยู่ในระดับดี (ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 75 แต่ไม่ถึง ร้อยละ 85) เมื่อวิเคราะห์เชิงลึกพบว่า มีโรงพยาบาล จำนวน 12 แห่ง (ร้อยละ 21.43) ที่ไม่มีเจ้าหน้าที่ด้านวิชาชีพ เป็นผู้ปฏิบัติงาน ซึ่งไม่สอดคล้องตามเกณฑ์การประเมินในส่วนที่ 2 ด้านบริการรังสีวินิจฉัย ที่กำหนดว่าต้องมีบุคลากร ทางด้านรังสีเพียงพอต่อการให้บริการ และเป็นเกณฑ์ขั้นพื้นฐานที่จำเป็นต้องมี การที่ผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการรังสี วินิจฉัยไม่เป็นผู้ที่มีวิชาชีพโดยตรงจะส่งผลให้ขาดการกำหนดมาตรฐานแผนงานด้านความเสี่ยงต่าง ๆ ตลอดจนการ ควบคุมคุณภาพและการบำรุงรักษาเครื่องมือที่สำคัญและอุปกรณ์ต่าง ๆ และการดำเนินการเกี่ยวกับการศึกษาข้อมูล และสถิติ ซึ่งเป็นเครื่องชี้วัดผลการปฏิบัติงานที่สำคัญ และนำสู่การพัฒนาคุณภาพอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากไม่มีความรู้ ความเข้าใจที่เฉพาะทางแม้ว่าจะได้มีการจัดอบรมให้ความรู้ไปแล้วก็ตาม สำหรับโรงพยาบาลศูนย์ที่พบว่าไม่ผ่าน การตรวจประเมิน สาเหตุหลักมาจากขาดการควบคุมคุณภาพในเครื่องมือและอุปกรณ์ที่สำคัญต่าง ๆ ทั้งนี้ เนื่องจาก เป็นโรงพยาบาลขนาดใหญ่จึงมีเครื่องมือและอุปกรณ์จำนวนมาก ส่งผลให้ไม่สามารถดำเนินการได้อย่างครอบคลุม

หากวิเคราะห์แยกตามประเภทโรงพยาบาล พบว่าโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไปมีคะแนนเฉลี่ยสูงสุด แต่มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานค่อนข้างสูงและคะแนนส่วนใหญ่มีการกระจายตัวไปในทางต่ำ ทั้งนี้ เนื่องจากโรงพยาบาล ที่สถานะเดิมเป็นระดับชุมชนขนาดใหญ่ได้ถูกปรับเป็นโรงพยาบาลระดับทั่วไป ทำให้บางแห่งขาดความพร้อม ในบางเรื่อง เช่น บุคลากร และเครื่องมืออุปกรณ์ เป็นต้น สำหรับโรงพยาบาลชุมชนคะแนนเฉลี่ยใกล้เคียงกับโรงพยาบาล ศูนย์โรงพยาบาลทั่วไป แต่ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานน้อยกว่าและค่าคะแนนมีการกระจายตัวแบบสม่ำเสมอ และ โรงพยาบาลสังกัดกรมอื่นมี 2 แห่ง คะแนนค่อนข้างต่ำทั้งหมด ทั้งนี้เนื่องจากไม่มีเจ้าหน้าที่ที่มีวิชาชีพด้านรังสีทั้ง 2 แห่ง ซึ่งปัญหาด้านบุคลากรจะส่งผลกระทบต่อพัฒนาตามเกณฑ์ในข้ออื่น ๆ เช่นเดียวกัน

เมื่อวิเคราะห์แยกตามส่วนที่ประเมินพบว่า ส่วนที่ 3 คุณภาพบริการได้รับการพัฒนามากที่สุด อาจเนื่อง มาจากเป็นกิจกรรมที่ดำเนินการสอดคล้องกับมาตรฐานที่โรงพยาบาลนำมาพัฒนาหน่วยงานเป็นส่วนใหญ่ เช่น ระบบ มาตรฐาน HA (Hospital Accreditation) เป็นต้น และเนื่องจากการดำเนินงานร่วมกันทั้งองค์กรอย่างเป็นระบบ จึงทำให้มีการพัฒนาครอบคลุมไปถึงห้องปฏิบัติการทางรังสีด้วยเช่นเดียวกัน สำหรับส่วนที่ 1 ความปลอดภัย และ ส่วนที่ 2 บริการรังสีวินิจฉัย มีคะแนนใกล้เคียงกันทั้งคะแนนเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ซึ่งทั้งสองส่วนมี ความสอดคล้องกัน ไม่ว่าจะเป็นเรื่องการประกันคุณภาพที่เป็นข้อบกพร่องที่พบมากในส่วนที่ 2 และมาตรการหรือ แผนงานความเสี่ยงต่าง ๆ ในส่วนที่ 1 จะต้องดำเนินการควบคู่กันไป สิ่งเหล่านี้จำเป็นต้องมีบุคลากรทางรังสีที่มีความรู้ความเข้าใจ ดำเนินงานด้านวิชาการเชิงลึก รวมถึงการพัฒนางานโดยศึกษาข้อมูลและสถิติ ซึ่งเป็นเครื่องชี้วัดผล การปฏิบัติงานที่สำคัญทั้งด้านความพึงพอใจของผู้รับบริการทั้งภายในและภายนอกและนำสู่การพัฒนาคุณภาพอย่าง ต่อเนื่อง ซึ่งเป็นข้อบกพร่องในส่วนที่ 3 ที่ต้องพัฒนาเพิ่มเติม ตลอดจนการพัฒนาองค์ความรู้ต่างๆ ให้ทันต่อ ความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีรังสีวินิจฉัย

อย่างไรก็ตาม การพัฒนาคุณภาพห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัยในโรงพยาบาลสังกัดกระทรวงสาธารณสุข จะสามารถพัฒนาได้อย่างต่อเนื่องและยั่งยืน กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ควรผลักดันมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ทางรังสีวินิจฉัยให้เป็นกรอบในการพิจารณารับรองโรงพยาบาลตามมาตรฐาน HA โดยโรงพยาบาลจะสามารถ ผ่านมาตรฐาน HA ได้ ในส่วนของห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัยจะต้องผ่านการประเมินจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งจะสามารถนำเงื่อนไขดังกล่าวมาเป็นกลไกในการขับเคลื่อนการพัฒนาคุณภาพห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัย ในโรงพยาบาลสังกัดกระทรวงสาธารณสุขต่อไปในอนาคต

สรุป

การพัฒนาคุณภาพห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัยในโรงพยาบาลสังกัดกระทรวงสาธารณสุข ในเขตสุขภาพที่ 9 ส่วนใหญ่มีการพัฒนาด้านคุณภาพบริการ แต่ยังคงต้องปรับปรุงด้านความปลอดภัย เกี่ยวกับมาตรการแผนงานความเสี่ยงต่างๆ และด้านบริการรังสีวินิจฉัย เรื่องการควบคุมคุณภาพตู้ส่งดูฟิล์ม รวมถึงการดูแลควบคุมคุณภาพเครื่องมือทางรังสีวิทยาให้มีความถูกต้องเป็นไปตามหลักวิชาชีพ ทั้งนี้ ปัญหาด้านบุคลากรก็มีความสำคัญอย่างยิ่งที่ส่งผลกระทบต่อการพัฒนาในหลายด้าน ปัจจัยที่จะนำไปสู่การพัฒนาอย่างจริงจังนั้น ต้องอาศัยความร่วมมือจากหลายส่วนที่จะผลักดันให้ประสบผลสำเร็จ เช่น นโยบายระดับกระทรวง ระดับเขต ระดับจังหวัด และระดับโรงพยาบาลหรือแม้กระทั่งเจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงาน จะต้องให้ความร่วมมือและให้ความสำคัญในการพัฒนาเพื่อให้สามารถให้บริการถ่ายภาพรังสีวินิจฉัยให้กับประชาชนผู้รับบริการได้อย่างถูกต้อง มีคุณภาพมาตรฐาน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่รังสีของโรงพยาบาลเขตสุขภาพที่ 9 ทุกแห่ง และผู้ประสานงานจากสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดนครราชสีมา ชัยภูมิ บุรีรัมย์ และสุรินทร์ ที่ให้ความร่วมมือในการดำเนินโครงการในครั้งนี้ ตลอดจนผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 9 นครราชสีมา และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการรังสีและเครื่องมือแพทย์ ที่ให้การสนับสนุนการดำเนินงานจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. International Commission on Radiological Protection. ICRP Publication 60, Recommendation of the international commission on radiological protection. Oxford: Pergamon Press; 1990. P. 25-49
2. กรมสนับสนุนบริการสุขภาพ กระทรวงสาธารณสุข. มาตรฐานบริการสาธารณสุข ฉบับเฉลิมพระเกียรติ 80 พรรษา 5 ธันวาคม 2550. นนทบุรี: สำนักพัฒนาระบบบริการสุขภาพ กรมสนับสนุนบริการสุขภาพ; 2550.
3. กรมสนับสนุนบริการสุขภาพ กระทรวงสาธารณสุข. แนวทางการตรวจประเมินบริการรังสีวิทยาในสถานพยาบาลประเภทที่รับผู้ป่วยไว้ค้างคืน ฉบับปรับปรุง ครั้งที่ 2. นนทบุรี: กลุ่มงานสถานพยาบาล กองการประกอบโรคศิลปะ; 2551.
4. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. เกณฑ์และแนวทางการพัฒนางานรังสีวินิจฉัย โรงพยาบาลสังกัดกระทรวงสาธารณสุข. นนทบุรี: สำนักรังสีและเครื่องมือแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2555.
5. Lloyd PJ. Quality assurance workbook for radiographer and radiological technologists. Geneva: World Health Organization; 2001.
6. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. เกณฑ์และแนวทางการพัฒนางานรังสีวินิจฉัย โรงพยาบาลสังกัดกระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2558. นนทบุรี: สำนักรังสีและเครื่องมือแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2558.

Development for Radiation Diagnostic Laboratory in the Hospitals Under the Ministry of Public Health in Health Region 9

Supakee Sayumpoorujinan Aumawadee Sangtong and Arunrat Patthartum

Reginal Medical Science Center 9 Nakhon Rachasima, Department of Medical Sciences, Amphoe Muang, Nakhon Rachasima 30000, Thailand.

ABSTRACT Radiography is one of key factors in disease diagnosis. However, quality standard has to be met to prevent patients from receiving excessive radiation. Therefore, it is vital to set up a quality control system for operation. In 2012, Department of Medical Sciences had launched the criteria and guidelines for the development of the diagnostic radiology in all hospital laboratories under the Ministry of Public Health. The evaluation consists of three parts: Safety, Diagnostic Radiology and Service Quality. In fiscal year of 2015, 56 hospitals in Health Region 9 were evaluated, 25 of them (44.64%) met the criteria. One hospital (1.79%) reached the basic criteria, 16 (28.57%) received outstanding performance. After the evaluation, the area of most improvement was in the Service Quality (87.21%), followed by Safety (72.92%) and the lowest was Diagnostic Radiology (70.53%). No quality control of display monitor or view box as well as radiation equipment were the most common defect found. Besides, there was no assessment of the radiation dose that patients received from Diagnostic Radiography. Moreover, the radiation specialists were insufficient to cope with the workload. These findings were presented to the hospitals to plan for further development.

Key words: development of the diagnostic radiology

การประเมินความสามารถการทดสอบ *Salmonella* spp. ของห้องปฏิบัติการ ตรวจวิเคราะห์อาหารโดยใช้ผลการทดสอบความชำนาญ

ลดาวัลย์ จิงสมานกุล อัจฉรา อยู่คง กมลวรรณ กันแต่ง และกนกชน สุภาพรหม

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ถนนติวานนท์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ดำเนินการประเมินความสามารถการทดสอบ *Salmonella* spp. ของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์อาหารโดยใช้ผลการทดสอบความชำนาญระหว่างปีงบประมาณ 2554-2558 จำนวน 6 รอบ แต่ละรอบมีห้องปฏิบัติการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญ จำนวน 16, 36, 25, 58, 70 และ 77 ราย รวมสะสม 282 ราย พบรายงานผลการทดสอบถูกต้องสอดคล้องกับค่ากำหนด จำนวน 16, 34, 21, 48, 52 และ 70 ราย รวมสะสม 241 ราย คิดเป็นร้อยละ 100.0, 94.5, 84.0, 82.8, 74.3 และ 90.9 รวมสะสม 85.5 ตามลำดับ ห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมทดสอบความชำนาญฯ แบ่งเป็น 4 กลุ่ม คือ ห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองตามมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025: 2005 ภาครัฐ 91 ราย ห้องปฏิบัติการฯ ภาคเอกชน 102 ราย ห้องปฏิบัติการที่ไม่ได้รับการรับรองฯ ภาครัฐ 12 ราย และห้องปฏิบัติการที่ไม่ได้รับการรับรองฯ ภาคเอกชน 77 ราย พบรายงานผลการทดสอบถูกต้อง 86, 94, 10 และ 51 ราย คิดเป็นร้อยละ 94.5, 92.2, 83.3 และ 66.2 ตามลำดับ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 ($p < 0.01$) ห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองฯ รายงานผลการทดสอบถูกต้องมากกว่าห้องปฏิบัติการที่ไม่ได้รับการรับรองฯ ขณะที่ห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองฯ ภาครัฐและเอกชนรายงานผลการทดสอบใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 ทั้งนี้ ผลการทดสอบความชำนาญรอบที่ 6 พบห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมทดสอบฯ ทุกกลุ่มรายงานผลการทดสอบได้ถูกต้องมากขึ้นเมื่อเทียบกับรอบที่ผ่านมา

บทนำ

Salmonella spp. เป็นแบคทีเรียรูปท่อนสั้น แกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ จัดอยู่ในตระกูล family Enterobacteriaceae⁽¹⁾ พบการแพร่กระจายทั่วไปตามธรรมชาติ โดยเฉพาะระบบทางเดินอาหารของคนหรือสัตว์ เช่น นก สัตว์เลี้ยงคลาน สัตว์ในฟาร์ม ซึ่งเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยแรก (primary habitat) เมื่อสัตว์เหล่านี้ขับถ่าย อาจมีการปนเปื้อนลงในแหล่งน้ำ หรือแมลงอาจนำพา *Salmonella* spp. สู่อื่น ๆ ได้ เชื้อนี้สามารถอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่แห้งแล้งได้หลายสัปดาห์ และอยู่ในแหล่งน้ำต่าง ๆ ได้หลายเดือน ทำให้สามารถแพร่กระจายอย่างกว้างขวาง⁽²⁾ มีรายงานการตรวจพบ *Salmonella* spp. ในอาหารหลายชนิด เช่น เนื้อสัตว์ ไข่ นม ผัก ผลไม้ เครื่องเทศ อาหารสัตว์ และสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ เชื้อนี้ทุกสปีชีส์ (species) ทุกสายพันธุ์ (strain) สามารถก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหาร ซึ่งจะปรากฏอาการภายหลังการรับประทานอาหารที่มีเชื้อนี้ปนเปื้อน 6-72 ชั่วโมง แต่ส่วนใหญ่ปรากฏอาการภายใน 12-36 ชั่วโมง โดยอาการจะค่อย ๆ ดีขึ้นภายใน 7-14 วัน แต่จะเป็นพาหะ (carrier) ร้อยละ 3-5⁽³⁾ ทั้งนี้ องค์การอนามัยโลก (World Health Organization: WHO) ประเมินการว่าในแต่ละปีจะมีประชากรทั่วโลกป่วยเพราะโรคจากเชื้อนี้หลายสิบล้านคนและตายมากกว่า 100,000 คน⁽⁴⁾ ในประเทศสหรัฐอเมริกา ศูนย์ควบคุมและป้องกันโรคแห่งชาติ (Centers for Disease Control and Prevention: CDC) ประเมินการว่าทุกปีจะมีประชากรชาวอเมริกันเจ็บป่วยเพราะเชื้อนี้ประมาณ 1-2 ล้านคน และตายประมาณ 450 คน⁽⁵⁾ ส่วนกรมการเกษตร ประเทศสหรัฐอเมริกา (U.S. Department of Agriculture: USDA) ระบุว่าในแต่ละปีจะมีคนป่วยประมาณ 700,000 ถึง 3.8 ล้านคน และตายประมาณ 870-2,000 คน ก่อให้เกิดความสูญเสียประมาณ 0.9-12.2 พันล้านเหรียญ⁽¹⁾ สำหรับประเทศไทย มีรายงานเมื่อปี พ.ศ. 2557⁽⁶⁾ เรื่องการเจ็บป่วยเนื่องจากโรคอาหารเป็นพิษผ่านทางระบบรายงาน 506 จำนวนทั้งสิ้น 128,082 ราย คิดเป็นอัตราป่วย 199 ต่อประชากรแสนคน โดยผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการในอุจจาระผู้ป่วย พบ *Salmonella* spp. ร้อยละ 14 ซึ่งเท่ากับประชากรป่วยเนื่องจาก *Salmonella* spp. 17,931 ราย คิดเป็น 27.9 ต่อประชากรแสนคน

ดังนั้น เพื่อความปลอดภัยจึงมีการตรวจ *Salmonella* spp. ในอาหารทุกชนิด^(7, 8) กรณีที่ตรวจพบ *Salmonella* spp. ในอาหาร อาหารเหล่านั้นจะถูกทำลาย ส่งกลับหรือนำไปผ่านกระบวนการกำจัดเชื้อใหม่ ส่วนอาหารที่ตรวจไม่พบ *Salmonella* spp. จะมีการจำหน่ายและบริโภคต่อไป⁽⁹⁾ หากผลการตรวจวิเคราะห์เกิดข้อผิดพลาด เช่น มี *Salmonella* spp. แต่ตรวจไม่พบ (false negative) อาหารเหล่านั้นจะถูกนำไปจำหน่าย ซึ่งถ้าตรวจพบ *Salmonella* spp. ภายหลังหรือก่อให้เกิดโรค อาหารจะถูกทำลาย ส่งกลับ และหรือดำเนินการตามกฎหมายกับผู้ผลิต ทำให้ผู้ประกอบการและประเทศเสียชื่อเสียงและเกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจได้ ในทางกลับกันถ้าอาหารไม่มี *Salmonella* spp. แต่ห้องปฏิบัติการตรวจพบ (false positive) และอาหารนั้นยังอยู่กับผู้ผลิต ผู้ผลิตจะต้องนำอาหารนั้นไปผ่านกระบวนการกำจัดเชื้อใหม่ ซึ่งทำให้เสียเวลาหรือทำให้มูลค่าของอาหารลดลงและเสียค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้น แต่ถ้าอาหารนั้นอยู่ในท้องตลาด ผู้ผลิตอาจจะถูกดำเนินการตามกฎหมายโดยไม่เป็นธรรมได้ ดังนั้น ผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการที่ถูกต้องจึงเป็นส่วนสำคัญในการตัดสินใจของผู้ผลิตและเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องที่จะให้จำหน่าย กักกัน ทำลาย หรือผ่านกระบวนการกำจัดเชื้อใหม่กับอาหารเหล่านั้น

ส่วนการทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing) เป็นการวัดความแม่นยำหรือผลความถูกต้องของผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการซึ่งเป็นการประเมินคุณภาพการตรวจวิเคราะห์โดยองค์กรภายนอก ผลการประเมินแสดงถึงความสามารถของห้องปฏิบัติการซึ่งเป็นที่ยอมรับตามมาตรฐานสากล⁽¹⁰⁾ และองค์กรรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการกำหนดเป็นหลักเกณฑ์หรือเงื่อนไขให้ห้องปฏิบัติการที่ต้องการขอรับการรับรองห้องปฏิบัติการต้องมีการทดสอบความชำนาญ⁽¹¹⁾ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เห็นถึงประโยชน์และความจำเป็นในการประกันคุณภาพผลการตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* spp. จึงพัฒนางานเพื่อเป็นผู้ดำเนินการแผนทดสอบความชำนาญ (PT provider: PTP) ของ *Salmonella* spp. ตั้งแต่ปีงบประมาณ 2554 และได้รับการรับรองความสามารถตามมาตรฐาน ISO/IEC 17043: 2010 เมื่อวันที่ 26 มกราคม 2558⁽¹²⁾ โดยเตรียมตัวอย่างทดสอบจัดส่งตัวอย่างให้ห้องปฏิบัติการสมาชิก ประเมินผลที่สมาชิกรายงาน และจัดทำรายงานส่งให้สมาชิก การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ได้

รวบรวมผลการทดสอบความชำนาญการตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* spp. ในอาหารของห้องปฏิบัติการที่เป็นสมาชิกของสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารตั้งแต่ปีงบประมาณ 2554 จนถึงปัจจุบัน เพื่อประเมินคุณภาพห้องปฏิบัติการ ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างห้องปฏิบัติการภาครัฐและเอกชน ห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองฯ และไม่ได้รับการรับรองฯ เพื่อเป็นข้อมูลประกอบการพิจารณาเลือกใช้ห้องปฏิบัติการที่ให้ผลการตรวจที่ถูกต้อง ซึ่งจะส่งผลให้มีการพัฒนาระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการเป็นไปอย่างสมบูรณ์ยิ่งขึ้น และเป็นประโยชน์ต่อประเทศต่อไป

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างทดสอบ

ตัวอย่างทดสอบ (test material) ความชำนาญการตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* spp. ในอาหาร เตรียมโดยห้องปฏิบัติการทดสอบความชำนาญการตรวจวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยา สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งได้รับการรับรองความสามารถผู้จัดโปรแกรมการทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17043: 2010 จากกรมวิทยาศาสตร์บริการ หมายเลขการรับรองระบบงานที่ทดสอบความชำนาญ 0004⁽¹²⁾ ตัวอย่างทดสอบใช้นมพาสเจอร์ไรส์หรือ skim milk และเตรียมตามขั้นตอนการดำเนินการเป็นผู้ดำเนินการแผนทดสอบความชำนาญ (PTP operation)⁽¹³⁾ ผ่านการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity test) และความคงตัว (stability test)^(14, 15) โดยห้องปฏิบัติการจะได้รับตัวอย่างทดสอบแต่ละ 2 ขวด ประกอบด้วยตัวอย่างที่มี *Salmonella* spp. และไม่มี *Salmonella* spp. จัดส่งตัวอย่างให้ห้องปฏิบัติการทางไปรษณีย์ด่วนพิเศษ

วิธีการประเมินความสามารถ

การประเมินความสามารถของห้องปฏิบัติการที่สมัครเข้าร่วมโครงการ รวม 6 รอบ ระหว่างปีงบประมาณ 2554 ถึง 2558 รวมสะสม 282 ราย (ผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งในแต่ละรอบนับเป็น 1 ราย) กำหนดเกณฑ์ให้ห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งต้องรายงานผลภายในระยะเวลาที่กำหนดและผลการตรวจ *Salmonella* spp. ในตัวอย่างของห้องปฏิบัติการถูกต้อง คือ ให้ผลตรงกับค่ากำหนด (assigned value) ทั้ง 2 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่เติม *Salmonella* spp. ต้องตรวจพบ (detected) และตัวอย่างที่ไม่เติม *Salmonella* spp. ต้องตรวจไม่พบ (not detected) จากนั้นรวบรวมผลการทดสอบที่ถูกต้อง (มีผลการตรวจเป็นที่น่าพอใจหรือผลผ่าน) และไม่ถูกต้อง (มีผลการตรวจที่ไม่น่าพอใจหรือผลไม่ผ่าน) จำนวน 6 รอบ ของห้องปฏิบัติการทั้งหมดซึ่งแบ่งเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ ห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองความสามารถการทดสอบ *Salmonella* spp. ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025: 2005 ภาครัฐและภาคเอกชน ห้องปฏิบัติการที่ไม่ได้รับการรับรองฯ ภาครัฐและภาคเอกชน หาค่าความสัมพันธ์ (ความแตกต่าง) ระหว่างผลการทดสอบและกลุ่มของห้องปฏิบัติการ โดยใช้ไคสแควร์ (χ^2 - test) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 ($p < 0.01$)^(16, 17)

ผล

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้ดำเนินกิจกรรมทดสอบความชำนาญการตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* spp. ในอาหารตั้งแต่ปีงบประมาณ 2554 จนถึงปีงบประมาณ 2558 รวม 6 รอบ มีห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาเข้าร่วมกิจกรรมจำนวน 16, 36, 25, 58, 70 และ 77 ราย รวมสะสม 282 ราย ห้องปฏิบัติการรายงานผลการทดสอบได้ถูกต้อง สอดคล้องกับค่ากำหนด จำนวน 16, 34, 21, 48, 52 และ 70 ราย รวม 241 ราย คิดเป็นร้อยละ 100.0, 94.5, 84.0, 82.8, 74.3 และ 90.9 รวม 85.5 ตามลำดับ ห้องปฏิบัติการสะสมทั้งหมด 282 ราย จำแนกเป็นผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการภาครัฐที่ได้รับการรับรองความสามารถการทดสอบ *Salmonella* spp. ตามมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025: 2005⁽¹⁰⁾ จำนวน 91 ราย ไม่ได้รับการรับรองฯ 12 ราย เป็นห้องปฏิบัติการ

ภาคเอกชนที่ได้รับการรับรองฯ 102 ราย ไม่ได้รับการรับรองฯ 77 ราย ซึ่งห้องปฏิบัติการเหล่านี้ รายงานผลการทดสอบ ที่ถูกต้องจำนวน 86, 10, 94, 51 ราย คิดเป็นร้อยละ 94.5, 83.3, 92.2 และ 66.2 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) โดยผลการทดสอบที่ไม่ถูกต้องส่วนใหญ่มักเกิดจากห้องปฏิบัติการที่ไม่ได้รับการรับรองฯ ภาคเอกชน ซึ่งพบ 26 จาก 41 ราย คิดเป็นร้อยละ 63.4 และจากผลการทดสอบความชำนาญรอบที่ 6 พบห้องปฏิบัติการทุกกลุ่มรายงานผลการทดสอบได้ถูกต้องมากขึ้นโดยเฉพาะห้องปฏิบัติการที่ไม่ได้รับการรับรองฯ ภาคเอกชน (ตารางที่ 1)

เมื่อนำข้อมูลระหว่างผลการทดสอบที่ได้ (ถูกต้องหรือไม่ถูกต้อง) กับกลุ่มของห้องปฏิบัติการต่าง ๆ มาหาความสัมพันธ์กันโดยใช้ไคสแควร์ (χ^2 test) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 (p value < 0.01) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 6.34 พบความสัมพันธ์ระหว่างผลการทดสอบถูกต้องและไม่ถูกต้องกับกลุ่มของห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองฯ และไม่ได้รับการรับรองฯ มีค่าไคสแควร์ที่ได้จากการคำนวณ (χ^2_{cal}) เท่ากับ 29.97 ซึ่งมากกว่า 6.34 และพบความสัมพันธ์ระหว่างผลการทดสอบกับห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองฯ ภาครัฐและภาคเอกชนมีค่า χ^2_{cal} เท่ากับ 0.42 สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างผลการทดสอบกับห้องปฏิบัติการที่ไม่ได้รับการรับรองฯ ภาครัฐและภาคเอกชนพบ χ^2_{cal} มีค่าเท่ากับ 1.41 (ตารางที่ 2) แต่อย่างไรก็ตามพบห้องปฏิบัติการที่ไม่ได้รับการรับรองฯ ภาครัฐให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องมากกว่าห้องปฏิบัติการที่ไม่ได้รับการรับรองฯ ภาคเอกชนร้อยละ 83.3-66.2 เท่ากับ 17.1 (ตารางที่ 1)

ผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการที่รายงานผลไม่ตรงกับค่ากำหนดทั้ง 41 ราย (ตารางที่ 1) พบว่าห้องปฏิบัติการรายงานผลเป็น พบ *Salmonella* spp. ทั้ง 2 ตัวอย่าง ไม่พบ *Salmonella* spp. ทั้ง 2 ตัวอย่าง และรายงานผลสลับกับค่ากำหนด จำนวน 16, 17 และ 8 ราย ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 1 ผลการประเมินการทดสอบความชำนาญการตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* spp. ในอาหารของห้องปฏิบัติการภาครัฐและเอกชนที่ได้รับการรับรองฯ และไม่ได้รับการรับรองฯ จำนวน 6 รอบ ระหว่างปีงบประมาณ 2554-2558

กลุ่มของ ห้องปฏิบัติการ	รอบที่ (ราย)												รวม (ราย)	
	1		2		3		4		5		6			
	ถูกต้อง	ไม่ถูกต้อง	ถูกต้อง	ไม่ถูกต้อง	ถูกต้อง	ไม่ถูกต้อง	ถูกต้อง	ไม่ถูกต้อง	ถูกต้อง	ไม่ถูกต้อง	ถูกต้อง	ไม่ถูกต้อง	ถูกต้อง	ไม่ถูกต้อง
ภาครัฐ														
♦ ได้รับ การรับรอง	15	0	15	0	11	1	13	2	15	2	17	0	86	5
													(94.5%)	
♦ ไม่ได้รับ การรับรอง	1	0	2	0	2	1	1	0	2	1	2	0	10	2
													(83.3%)	
รวม	16	0	17	0	13	2	14	2	17	3	19	0	96	7
เอกชน														
♦ ได้รับ การรับรอง	-	-	14	0	6	0	27	3	23	4	24	1	94	8
													(92.2%)	
♦ ไม่ได้รับ การรับรอง	-	-	3	2	2	2	7	5	12	11	27	6	51	26
													(66.2%)	
รวม	-	-	17	2	8	2	34	8	35	15	51	7	145	34
รวมทั้งหมด	16	0	34	2	21	4	48	10	52	18	70	7	241	41
	(100%)		(94.5%)		(84.0%)		(82.8%)		(74.3%)		(90.9%)		(85.5%)(14.5%)	
	16		36		25		58		70		77		282	

ตารางที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างผลการทดสอบที่ถูกต้องหรือไม่ถูกต้องกับกลุ่มของห้องปฏิบัติการ

กลุ่มของห้องปฏิบัติการ	จำนวนห้องปฏิบัติการที่ให้ผลการทดสอบ (ราย)		χ^2_{cal}
	ถูกต้อง	ไม่ถูกต้อง	
ได้รับการรับรองฯ	180	13	29.97
ไม่ได้รับการรับรองฯ	61	28	
ภาครัฐที่ได้รับการรับรองฯ	86	5	0.42
เอกชนที่ได้รับการรับรองฯ	94	8	
ภาครัฐที่ไม่ได้รับการรับรองฯ	10	2	1.41
เอกชนที่ไม่ได้รับการรับรองฯ	51	26	

ตารางที่ 3 สาเหตุของผลการทดสอบที่ไม่ถูกต้อง (ไม่ตรงกับค่ากำหนด)

รายการ	ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ 1 ชุด		สรุป	จำนวนห้องปฏิบัติการ ที่ให้ผลไม่ตรงกับ ค่ากำหนด (แห่ง)
	เติม <i>Salmonella</i> spp.	ไม่เติม <i>Salmonella</i> spp.		
ค่ากำหนด	พบ	ไม่พบ		
ผลการทดสอบ ของห้องปฏิบัติการ	พบ	พบ	ผลบวกปลอม	16
	ไม่พบ	ไม่พบ	ผลลบปลอม	17
	ไม่พบ	พบ	ผลลบปลอม และบวกปลอม	8
รวม				41

วิจารณ์

การที่ห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองฯ ภาครัฐและเอกชนสามารถให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องร้อยละ 94.5 และ 92.2 ส่วนห้องปฏิบัติการที่ไม่ได้รับการรับรองฯ ของทั้งสองภาคให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องเพียงร้อยละ 83.3 และ 66.2 (ตารางที่ 1) แสดงว่าห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองฯ ภาครัฐและภาคเอกชนในภาพรวมสามารถรายงานผลการทดสอบที่ถูกต้องใกล้เคียงกันและมากกว่าห้องปฏิบัติการที่ไม่ได้รับการรับรองฯ ภาครัฐและภาคเอกชน และพบว่าห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองฯ ให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องมากกว่าห้องปฏิบัติการที่ไม่ได้รับการรับรองฯ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 หรือที่ระดับความมั่นใจ 99% (ตารางที่ 2) แสดงว่าห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองฯ รายงานผลการทดสอบที่ถูกต้องมากกว่าห้องปฏิบัติการที่ไม่ได้รับการรับรองฯ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 เนื่องจากห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองฯ มีระบบการควบคุมคุณภาพและการประกันคุณภาพ ซึ่งถ้าผลการทดสอบผิดพลาด ห้องปฏิบัติการต้องหาสาเหตุเพื่อใช้ในการแก้ไข ป้องกัน และพัฒนาให้ดีขึ้น⁽¹⁰⁾ ส่วนห้องปฏิบัติการที่ไม่ได้รับการรับรองฯ อาจไม่มีหรือมีระบบคุณภาพและการประกันคุณภาพที่ไม่เป็นระบบ ซึ่งเมื่อเกิดข้อผิดพลาดอาจไม่ใส่ใจหาสาเหตุหรือหาสาเหตุไม่พบ จึงทำให้ห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองฯ ให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องมากกว่า ขณะที่ห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองฯ ทั้งภาครัฐและเอกชนให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 ดังนั้นผู้ใช้บริการห้องปฏิบัติการทดสอบ *Salmonella* spp. ควรเลือกใช้ห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองฯ ภาครัฐหรือเอกชนที่ให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 1) และไม่แตกต่างกันที่ระดับความมั่นใจ 99%(ตารางที่ 2)

ส่วนห้องปฏิบัติการที่ไม่ได้รับการรับรองฯ ภาครัฐและเอกชน พบว่าให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องไม่แตกต่างกันที่ระดับความมั่นใจ 99% (ตารางที่ 2) อย่างไรก็ตามพบห้องปฏิบัติการที่ไม่ได้รับการรับรองฯ ภาครัฐให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องมากกว่าห้องปฏิบัติการที่ไม่ได้รับการรับรองฯ ภาคเอกชนร้อยละ 17.1 (ตารางที่ 1) สาเหตุน่าจะเกิดจากห้องปฏิบัติการที่ไม่ได้รับการรับรองฯ ภาครัฐมีบุคลากรประจำที่มีความรู้และประสบการณ์สะสมมากกว่าบุคลากรภาคเอกชนซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงง่าย ดังนั้นในกรณีที่ไม่มีห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองฯ ควรเลือกใช้ห้องปฏิบัติการที่ไม่ได้รับการรับรองฯ ภาครัฐ

การที่ห้องปฏิบัติการทั้ง 4 กลุ่ม ให้ผลการทดสอบที่ไม่ถูกต้องรวม 41 ราย (ตารางที่ 3) โดยรายงานผลว่าพบ *Salmonella* spp. ทั้ง 2 ตัวอย่าง แสดงว่าตัวอย่างที่ไม่เต็ม *Salmonella* spp. แต่ห้องปฏิบัติการตรวจพบคือให้ผลบวกปลอม (false positive) จำนวน 16 ราย สาเหตุน่าจะเกิดจากไม่มีขั้นตอนการตรวจยืนยัน หรือมีขั้นตอนตรวจยืนยันแต่ปฏิบัติไม่ถูกต้อง และการที่ห้องปฏิบัติการรายงานผลว่าไม่พบทั้ง 2 ตัวอย่าง แสดงว่าตัวอย่างที่เต็ม *Salmonella* spp. แต่ห้องปฏิบัติการตรวจไม่พบคือให้ผลลบปลอม (false negative) จำนวน 17 ราย สาเหตุน่าจะเกิดจากการเลี้ยงเชื้อหรือแยกเชื้อไม่ถูกต้องทำให้ไม่มีโคโลนีลักษณะเฉพาะที่จะนำมาตรวจยืนยัน สำหรับห้องปฏิบัติการที่รายงานผลสลับกับค่ากำหนดคือให้ผลลบปลอมและผลบวกปลอม จำนวน 8 ราย น่าจะเกิดจากการสลับตัวอย่างทำให้รายงานผลสลับกัน

การรายงานผลการทดสอบที่ไม่ถูกต้องส่วนใหญ่เกิดจากห้องปฏิบัติการที่ไม่ได้รับการรับรองฯ และส่วนน้อยพบจากห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองฯ (ตารางที่ 1) แสดงว่าถึงจะเป็นห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองฯ ที่มีระบบควบคุมคุณภาพและการประกันคุณภาพผลการทดสอบเป็นอย่างดีตามมาตรฐานสากล ก็อาจให้ผลการทดสอบที่ไม่ถูกต้องได้ ดังนั้นจึงควรมีหน่วยงานตามกฎหมายเข้ามาดูแล กำกับ ส่งตัวอย่างทดสอบความชำนาญให้ห้องปฏิบัติการเหล่านี้ทดสอบอย่างสม่ำเสมอ เพื่อนำผลการทดสอบไปใช้ในการแก้ไข ป้องกัน ปรับปรุง และพัฒนาห้องปฏิบัติการในประเทศให้ดีขึ้น เพราะถ้าผลการทดสอบไม่ถูกต้องจะส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค ผู้ผลิต และประเทศเป็นอย่างสูง นั่นคือกรณีผลการทดสอบเป็นลบปลอม ผู้ผลิตจะนำสินค้านั้นออกจำหน่ายในตลาด (ในประเทศหรือต่างประเทศ) ซึ่งถ้าตรวจพบว่าอาหารนั้นมี *Salmonella* spp. ในระหว่างจำหน่ายหรือก่อให้เกิดโรคต่อผู้บริโภค สินค้าจะถูกทำลายทันที ผู้ผลิตจะถูกฟ้องร้องดำเนินคดีตามกฎหมาย ทำให้เสียชื่อเสียงและทรัพย์สิน ส่งผลกระทบต่อชื่อเสียงและเศรษฐกิจของประเทศได้ กรณีผลการทดสอบเป็นผลบวกปลอม ผู้ผลิตจะนำสินค้านั้นไปผ่านกระบวนการเพื่อกำจัดเชื้อใหม่ ทำให้เสียเวลา เสียค่าใช้จ่ายและมูลค่าของสินค้าจะลดลง แต่ถ้าสินค้านั้นวางจำหน่ายในท้องตลาด ผู้ผลิตอาจถูกฟ้องร้องดำเนินคดีตามกฎหมายจากหน่วยงานรัฐที่นำผลการทดสอบนั้นมาใช้ ทำให้เกิดความไม่เป็นธรรมต่อผู้ผลิต

ส่วนผลการทดสอบความชำนาญรอบที่ 6 พบห้องปฏิบัติการทุกกลุ่มรายงานผลการทดสอบถูกต้องมากขึ้น โดยเฉพาะห้องปฏิบัติการที่ไม่ได้รับการรับรองภาคเอกชน (ตารางที่ 1) สาเหตุเพราะห้องปฏิบัติการเหล่านี้นำผลการทดสอบที่ไม่ถูกต้องในรอบก่อนหน้านี้ไปหาสาเหตุแก้ไขและจัดทำระบบคุณภาพตามมาตรฐานสากล⁽¹⁰⁾ จึงทำให้ผลการทดสอบถูกต้องมากขึ้น ห้องปฏิบัติการจึงควรเข้าร่วมทดสอบความชำนาญตามระบบมาตรฐานสากลอย่างสม่ำเสมอ เพื่อจะได้นำผลการทดสอบไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงและพัฒนาห้องปฏิบัติการให้ดีขึ้น

ผู้ให้บริการผลการทดสอบ *Salmonella* spp. ในอาหาร ควรเลือกใช้ห้องปฏิบัติการภาครัฐหรือเอกชนที่ได้รับการรับรองตามมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025: 2005 เพราะสามารถให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องมากกว่าห้องปฏิบัติการที่ไม่ได้รับการรับรองฯ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 ในส่วนของห้องปฏิบัติการควรเข้าร่วมทดสอบความชำนาญเพื่อจะได้ทราบว่าผลการทดสอบที่ได้รับความถูกต้องหรือไม่ หากถูกต้องจะเป็นการยืนยันความสามารถของห้องปฏิบัติการ แต่ถ้าไม่ถูกต้องจะได้เป็นข้อมูลในการหาสาเหตุเพื่อแก้ไข ป้องกัน ปรับปรุงห้องปฏิบัติการให้ดีขึ้น และในส่วนของภาครัฐควรมีหน่วยงานกำกับดูแลหรือส่งเสริมให้ทุกห้องปฏิบัติการได้รับการรับรองตามมาตรฐานสากล และเข้าร่วมกิจกรรมทดสอบความชำนาญ เพื่อใช้ในการประเมินความสามารถของห้องปฏิบัติการในภาพรวมของประเทศทำให้เกิดความน่าเชื่อถือ อันจะส่งผลต่อการคุ้มครองผู้บริโภค การเฝ้าระวัง ป้องกัน และควบคุมโรค ตลอดจนการค้า เศรษฐกิจ และชื่อเสียงของประเทศ

สรุป

การประเมินความสามารถการทดสอบ *Salmonella* spp. ของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์อาหารที่ได้รับการรับรองและไม่ได้รับการรับรองตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025: 2005 รายงานผลการทดสอบถูกต้อง 180 และ 61 รายการตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 93.3 และ 63.3 ตามลำดับและห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองทั้งภาครัฐและเอกชน รายงานผลการทดสอบใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.01

เอกสารอ้างอิง

1. Chapter 36 *Salmonella*. In: Salfinger Y, Tortorello ML. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 5th ed. Washington, DC: American Public Health Association (APHA); 2015.
2. Chapter II, *Salmonella* infections. In: Bryan FL, Fanelli MJ, Riemann H, editors Food-borne infections and intoxications. 2nd ed. New York: Academic Press; 1979.
3. Chapter 26, Foodborne gastroenteritis caused by *Salmonella* and *Shigella*. In: Jay JM, editor. Modern food microbiology. 6th ed. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers; 2000. P. 511-530.
4. WHO. *Salmonella* (non-typhoidal). [online]. 2013 [cited 2015 Oct 5]; [3 screens]. Available from: URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en>
5. CDC. Foodborne disease active surveillance network: Food Net surveillance report for 2012 (Final report). Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, CDC. 2014.
6. อรทัย สุวรรณไชยรบ, สุทธนันท์ สุทธชนะ, นริศ บุญธนภัทร, ปณิธิ อัมมวิริยะ, กนิน อีระตันติกานนท์, กมลทิพย์ วิจิตรสุนทรกุล. สถานการณ์โรคและภัยที่น่าสนใจในรอบสัปดาห์ที่ 1 ปี พ.ศ. 2558. รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์ 16 ม.ค. 2558; 46(1): 6-7.
7. ISO 6579: 2002/Cor.1:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. Geneva, Switzerland: ISO; 2004.
8. Chapter 5 *Salmonella*. In: Andrews WH, Jacobson A, Hammack T. Bacteriological analytical manual. [online]. 2014 [cited 2015 Oct 5]; [29 screens]. Available from: URL: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm>
9. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 หมวด 4 เรื่องการควบคุมอาหาร มาตรา 25-30. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 96 ตอนที่ 79 ฉบับพิเศษ (13 พฤษภาคม 2522).
10. ISO/IEC 17025: 2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva, Switzerland: ISO; 2005.
11. สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. นโยบายและหลักเกณฑ์การทดสอบความชำนาญ. SOP No. N 07 15 003 แก้ไขครั้งที่ 08 วันที่ออกเอกสาร 3 ธันวาคม 2557.
12. กรมวิทยาศาสตร์บริการ. ใบรับรองความสามารถผู้จัดโปรแกรมการทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการ. ที่ วท 0303/783 ออกให้ ณ วันที่ 26 มกราคม 2558.
13. ลดาวัลย์ จิ่งสมานกุล, กมลวรรณ กันแต่ง และอัจฉรา อยู่คง. การพัฒนาการเป็นผู้ดำเนินการแผนทดสอบความชำนาญการตรวจวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยา. ว กรมวิทย์ พ 2558; 57(2): 127-41.
14. ISO/TS 22117: 2010. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- specific requirements and guidance for proficiency testing by interlaboratory comparison. Geneva, Switzerland: ISO; 2010.
15. ISO/IEC 17043: 2010. Conformity assessment -- General requirements for proficiency testing. Geneva, Switzerland: ISO; 2010.
16. บทที่ 10 การวิเคราะห์แบบโคสแควร์. ใน : วัชรภรณ์ สุริยาภิวัฒน์. สถิติสำหรับวิทยาศาสตร์ชีวภาพ เล่ม 2. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2552. หน้า 183-226.
17. นวพร อนันตสินกุล. สถิติสำหรับงานวิเคราะห์ทางเคมีและการทดสอบความชำนาญ. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2554.

Laboratory Performance Assessment of *Salmonella* spp. in a Food Microbiology Proficiency Testing Scheme

Ladawan Chungsamanukool Atchara Ukong Kamonwan kantaeng
and Kanokchon Supaprom

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

ABSTRACT Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Sciences, had conducted the assessment of the competence of food laboratories in testing of *Salmonella* spp. by using the results from proficiency testing scheme during the fiscal year 2011–2015. The 6 rounds of data were obtained and there were 16, 36, 25, 58, 70 and 77 laboratories participating in each round, respectively. The total number of participating laboratories was 282 labs. It was found that, from 241 labs (85.5% of total labs), the labs that reported the correct results according to the assigned value were 16, 34, 21, 48, 52 and 70 labs which were 100.0, 94.5, 84.0, 82.8, 74.3 and 90.9 percent of the participating labs in the 1st round to the 6th round, respectively. The labs were also divided into 4 groups which were 91 government labs and 102 private labs accredited according to ISO/IEC 17025: 2005, 12 government labs and 77 private labs which had not been accredited. The labs in each group that reported the correct results were 86 out of 91 labs (94.5%), 94 out of 102 labs (92.2), 10 out of 12 labs (84.0%) and 51 out of 77 labs (66.2%), respectively. Accredited labs reported the correct results more than non-accredited labs. The statistical evaluation showed that the competence of accredited labs was significantly different from those of the non-accredited labs ($p < 0.01$). The competence of both government and private accredited labs was no significantly different. However, the results of the 6th round showed that every groups of the labs reported more correct results when compared with the other rounds.

การสำรวจการปนเปื้อน *Listeria monocytogenes*, *Salmonellae* และ *E. coli* O157:H7 ในเนื้อสัตว์ดิบ ที่จำหน่ายในตลาดสด เขตกรุงเทพมหานคร และปริมณฑล

รัชฎาพร สุวรรณรัตน์ และดวงดาว วงศ์สมมาตร

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ช่วงธันวาคม 2555 ถึง กุมภาพันธ์ 2557 สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้สำรวจการปนเปื้อนเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ *Listeria monocytogenes*, *Salmonellae* และ *E. coli* O157:H7 ในเนื้อสัตว์ดิบ 90, 24 และ 108 ตัวอย่าง ตามลำดับ จากตลาดสด 28 แห่ง ในเขตกรุงเทพฯ และปริมณฑล คือ ตรวจหา *L. monocytogenes* ในเนื้อไก่ หมู และวัว ชนิดละ 30 ตัวอย่าง ตรวจหา *Salmonellae* ในเนื้อชนิดละ 8 ตัวอย่าง และตรวจหา *E. coli* O157:H7 ในเนื้อไก่ หมู และวัว 26, 24 และ 58 ตัวอย่าง ตามลำดับ ผลพบ *L. monocytogenes* ในเนื้อไก่ หมู และวัว ร้อยละ 26.7, 6.7 และ 6.7 และ *Salmonellae* ร้อยละ 100, 87.5 และ 75 ตามลำดับ *E. coli* O157:H7 พบเฉพาะในเนื้อวัว ร้อยละ 15.5 สรุปเนื้อดิบเสี่ยงต่อโรคอาหารเป็นพิษ ควรบริโภคเนื้อปรุงสุกที่เตรียมอย่างถูกสุขลักษณะ และระวังการปนเปื้อนข้ามจากของดิบมาของสุก

บทนำ

เนื้อสัตว์เป็นอาหารโปรตีนที่มีประโยชน์ ประกอบด้วยกรดไขมันที่จำเป็นต่อคนทุกเพศ ทุกวัย แต่การบริโภคเนื้อสัตว์ต้องมีความระมัดระวังในการเตรียมอย่างถูกสุขลักษณะ เพราะเนื้อสัตว์ดิบหรือเนื้อสัตว์ที่ปรุงไม่สุกดีมีโอกาสปนเปื้อนจุลินทรีย์ต่าง ๆ มากมาย รวมทั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่ติดผ่านอาหารและน้ำ ซึ่งจะทำให้ผู้บริโภคเกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ โดยผู้ป่วยอาจมีอาการ เช่น ปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน หรือท้องเสีย เป็นต้น⁽¹⁾ อย่างไรก็ตามเชื้อโรคบางชนิดอาจก่ออาการผิดปกติในระบบอื่นของร่างกายได้ด้วย เชื้อโรคอาหารเป็นพิษที่อาจปนเปื้อนในเนื้อสัตว์มีหลายชนิด แต่เชื้อแบคทีเรียที่มีความสำคัญในด้านความปลอดภัยอาหารและการแพทย์และสาธารณสุข มีอย่างน้อย 3 ชนิด ได้แก่ *Listeria monocytogenes*, *Salmonellae* และ *E. coli* O157:H7⁽²⁾

Listeria monocytogenes เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อนสั้น เรียงต่อเป็นเชลล์เดี่ยว สายสั้น ๆ รูปตัววี และตัววาย ถ้าเชื้อมีอายุมากขึ้นจะมีรูปร่างกลมหรือเป็นสายยาว 6–20 ไมโครเมตร ไม่สร้างสปอร์ สร้างแฟลกเจลลารอบตัวจำนวนเล็กน้อย เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน แต่ชอบสภาพที่มีออกซิเจนเล็กน้อย (microaerophyle) เจริญได้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 0 ถึง 50 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum temperature) ตั้งแต่ 30 ถึง 37 องศาเซลเซียส แต่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยใช้ระยะเวลาบ่มภายใน 2–3 วัน^(3,4) เป็นเชื้อที่ทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี เช่น สภาวะอาหารที่เป็นกรดและอาหารที่มี water activity ต่ำ พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม ดิน แหล่งน้ำ น้ำเสีย มูลสัตว์ ปุ๋ยจากพืชและหญ้าหมัก แม้แต่ในอุจจาระคน รวมทั้งมีโอกาสปนเปื้อนในอาหารที่มาจากสัตว์ เช่น เนื้อสัตว์ นมโค และผลิตภัณฑ์จากนม โดยเฉพาะเนยแข็ง นอกจากนี้ยังพบได้ในอาหารทะเลและผักที่รับประทานดิบหรือผักที่ไม่ได้ผ่านความร้อนสูง⁽⁵⁾ เชื้อนี้ก่อโรคลิสเทอริโอซิส (Listeriosis) ในคนและสัตว์ ผู้ป่วยมักเป็นบุคคลในกลุ่มเสี่ยง ซึ่งประกอบด้วย เด็ก ผู้สูงอายุ (เฉลี่ย 65 ปีขึ้นไป) หญิงมีครรภ์ และผู้มีภูมิคุ้มกันต่ำหรือบกพร่อง ระยะฟักตัว 2–3 วัน ถึง 3 เดือน อาการในผู้ที่ติดเชื้อ มักมีไข้ ปวดกล้ามเนื้อ (คล้ายอาการหวัด) บางรายมีอาการทางระบบทางเดินอาหาร เช่น คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย แต่รายที่เป็นแบบ invasive form จะเกิดโรครุนแรงและมีอาการทางระบบประสาทเนื่องจากเยื่อหุ้มสมองอักเสบและโลหิตเป็นพิษ (septicemia) ในสตรีมีครรภ์มักแท้ง หรือทารกตายขณะคลอด หรือทารกติดโรคลิสเทอริโอซิส อัตราการป่วยตาย ร้อยละ 15–30⁽⁶⁾ โดยในทวีปอเมริกาและยุโรปมีรายงานการตายและเจ็บป่วยเนื่องจากเชื้อนี้เป็นระยะ ๆ⁽⁷⁾

Salmonellae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน อุณหภูมิที่เหมาะสม อยู่ที่ 37 องศาเซลเซียส ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลารอบตัว (peritrichous flagella) ยกเว้น *S. Pullorum* และ *S. Gallinarum* โดยที่จริง *Salmonellae* แบ่งเป็น 2 species คือ *S. enterica* และ *S. bongori* แต่ subspecies ที่สำคัญที่สุดในการก่อโรคระบบทางเดินอาหาร (food-borne diseases) คือ *S. enterica subspecies enterica* ในปัจจุบัน *Salmonellae* ยังจัดแบ่งต่อไป เป็น serotype หรือ serovar มากกว่า 2,500 serovar แต่ส่วนใหญ่หรือมากกว่า 1,500 serovar อยู่ภายใต้ *S. enterica subspecies enterica* ซึ่งรวมถึงเชื้อ Non-typhoidal *Salmonellae* ที่พบก่อโรคบ่อย ๆ เช่น *S. Enteritidis* และ *S. Typhimurium*⁽⁸⁾ เชื้อ *Salmonellae* แยกได้จากอาหารและน้ำที่ปนเปื้อนมุลสัตว์ โดยสัตว์ได้รับเชื้อนี้จากอาหารสัตว์และสิ่งแวดล้อม ดังนั้นอาหารที่มาจากสัตว์ เช่น เนื้อสัตว์ ไข่ นมดิบ จึงมีโอกาสพบเชื้อนี้ได้บ่อย เช่น เนื้อสัตว์ ไข่ นมดิบ นอกจากนี้ในพืชผักสดอาจพบการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonellae* ได้เนื่องจากการสัมผัสมูลสัตว์หรือสิ่งแวดล้อมอื่น ระยะฟักตัวภายใน 12–14 ชั่วโมง หลังได้รับเชื้อ อาการของโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อ *Salmonellae* มีอาการปวดท้อง ท้องเสีย เป็นไข้⁽⁹⁾ จากข้อมูลขององค์การอนามัยโลก (World Health Organization: WHO) ในแต่ละปีมีประชากรทั่วโลกป่วยเพราะเชื้อนี้หลายสิบล้านคนและตายมากกว่า 100,000 คน⁽¹⁰⁾ ส่วนข้อมูลในประเทศสหรัฐอเมริกา โดยศูนย์ควบคุมและป้องกันโรคแห่งชาติ (Centers for Disease Control and Prevention: CDC) ระบุว่าทุกปีจะมีประชากร

ชาวอเมริกันเจ็บป่วยเพราะเชืื่อนี้ประมาณ 1-2 ล้านคน และตายประมาณ 450 คน โดยในปี ค.ศ. 2009 ประมาณการว่ามีการป่วยเพราะเชืื่อนี้ประมาณ 1.2 ล้านคน เสียชีวิตประมาณ 2.6 พันล้านเหรียญสหรัฐ^(11, 12)

E. coli O157:H7 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ สามารถสร้างแคปซูลและสารพิษ เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลา รอบตัว (peritrichous flagella) เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 7 ถึง 45 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum temperature) อยู่ที่ 37 องศาเซลเซียส เชื้อนี้มักพบในสัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น วัว ควาย แพะ แกะ และพบทั่วไปในสิ่งแวดล้อม พบการระบาดของเชื้อ *E. coli* O157:H7 เนื่องจากการบริโภคเนื้อวัวดิบ รวมทั้งอาหารประเภทผัก ผลไม้ ระยะฟักตัว 3-8 วัน เชื้อกลุ่มนี้สามารถสร้างสารพิษ “Shiga toxin” หรือ “Verocytotoxin” ได้ ซึ่งแบ่งย่อยออกเป็น 2 กลุ่ม คือ Shiga toxin 1 (STX1) และ Shiga toxin 2 (STX2) ปัจจุบันจึงเรียกเชื้อในกลุ่มนี้ว่า “Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC)” หรือ Verocytotoxin producing *E. coli* (VTEC) หรือ “Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)” ซึ่ง *E. coli* O157:H7 เป็นเชื้อในกลุ่ม STEC ที่พบก่อโรคบ่อยที่สุด เชื้อนี้สร้างโปรตีนอินติมิน (Intimin) ที่เป็นสาเหตุของลำไส้อักเสบรุนแรง (hemorrhagic colitis) ทำให้มีอาการรุนแรงเป็นเลือด และไตวาย [Hemolytic uremic syndrome (HUS)] โดยเฉพาะในผู้ป่วยเด็กและคนชรา⁽¹³⁾

ภายใต้โครงการอาหารปลอดภัย สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ซึ่งเป็นหน่วยงานที่ให้บริการตรวจวิเคราะห์อาหารเพื่อคุ้มครองผู้บริโภคและสนับสนุนการยกระดับการผลิตอาหาร ต้องการสำรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษที่สำคัญ 3 ชนิด ได้แก่ *Listeria monocytogenes*, *Salmonellae* และ *E. coli* O157:H7 ที่ปนเปื้อนในเนื้อสัตว์ดิบประเภทเนื้อไก่ เนื้อหมู และเนื้อวัว ที่จำหน่ายในตลาดสดเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล โดยดำเนินการในช่วงระหว่างเดือนธันวาคม 2555 ถึง กุมภาพันธ์ 2557 เชื้อ *Listeria monocytogenes* และ *E. coli* O157:H7 เป็นเชื้อที่ก่อโรครุนแรง ทำให้เจ็บป่วยถึงแก่ชีวิตได้ ส่วน *Salmonellae* เป็นเชื้อที่พบก่อโรคอาหารเป็นพิษได้บ่อย ดังที่กล่าวมาข้างต้น การสำรวจครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทราบแนวโน้มการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคดังกล่าว เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับแจ้งเตือนภัยสุขภาพผู้บริโภค และเป็นแนวทางประเมินความเสี่ยงในการบริโภคสินค้าปศุสัตว์เหล่านี้

วัสดุและวิธีการ

เชื้อมาตรฐาน

เชื้อมาตรฐานที่ใช้สำหรับควบคุมคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้ เป็นเชื้อจุลินทรีย์จากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จำนวน 7 สายพันธุ์ ได้แก่ *Listeria monocytogenes* DMST 17303, *Listeria ivanovii* DMST 9012, *Listeria innocua* DMST 9011, *Rhodococcus equi* DMST 17256, *Staphylococcus aureus* DMST 8840, *E. coli* O157:H7 DMST 12743 และ *Salmonella* Typhimurium DMST 562

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ดังนี้

1. *Listeria monocytogenes*: Half Fraser broth, Fraser broth, Agar *Listeria* according to Ottavani and Agosti (ALOA) medium, oxford agar, tryptone soya yeast extract agar (TSYEA), tryptone soya yeast extract broth (TSYEB), sheep blood agar, carbohydrate utilization broth (rhamnose, xylose และ mannitol) และ motility medium

2. *Salmonellae*: Buffered peptone water (BPW), Muller-Kauffmann tetrathionate novobiocin (MKTTn) broth, Rappaport-Vassiliadis Soya Peptone (RVS) Broth, xylose lysine desoxycholate (XLD) agar, hektoen enteric (HE) agar, Triple Sugar Iron (TSI) agar, Motility Indole Lysine (MIL) medium, Urea agar, Voges Proskauer (VP) broth, ONPG discs

3. *E. coli* O157:H7: BioControl modified EHEC (mEHEC), Brain Heart Infusion broth, CHROMagar STEC (CHROMagar STEC), Cefixime Tellurite Sorbitol MacConkey (CT-SMAC) agar, Tryptone medium, 0.1% peptone water, Tryptone Soy Tryptose Broth (TSTB), Nutrient agar (NA), Motility agar

น้ำยาและสารเคมี

Gram's stain reagent, 3% hydrogen peroxide solution, iodine-iodide solution, Kovacs' reagent, VP test reagent, saline peptone water, 37% formaldehyde, sodium chloride 0.85% solution, *Salmonella* polyvalent O antisera and monovalent O antisera groups, *E. coli* O157 และ H7 antisera และชุดน้ำยา Real-time PCR สำหรับ *E. coli* O157:H7 (Assurance GDS for *E. coli* O157:H7 test kit, BioControl Systems, USA)

เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์

autoclave ($121 \pm 3^{\circ}\text{C}$), centrifuge, incubator ($25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $41.5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ และ $42 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$), light microscope, water bath ($41.5 \pm 1^{\circ}\text{C}$), pH-meter, Real-time PCR machine (Assurance GDS Rotor-GeneTM RG-3000 (Corbette Life Science) พร้อมชุดอุปกรณ์คอมพิวเตอร์ และซอฟต์แวร์, stomacher, vortex mixer, glass slide, loop, needle, petri dishes (90×150 มิลลิเมตร), pipettes (1, 5 และ 10 มิลลิลิตร), stomacher bag, test tube

ตัวอย่างทดสอบ

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้สุ่มเก็บตัวอย่าง เนื้อไก่ หมู และวัว ที่ชำแหละจำนวนรวม 108 ตัวอย่าง จากแผงลอยในตลาดสดเขตกรุงเทพฯ นนทบุรี ปทุมธานี และสมุทรปราการ รวม 28 แห่ง ในช่วงเดือนธันวาคม 2555 ถึง กรกฎาคม 2556 สำหรับ เนื้อไก่และหมู และช่วงเดือนธันวาคม 2555 ถึง กุมภาพันธ์ 2557 สำหรับเนื้อวัว ทำการตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา เพื่อสำรวจการปนเปื้อนเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ 3 ชนิด คือ *L. monocytogenes* ในเนื้อสัตว์ 90 ตัวอย่าง (ชนิดละ 30 ตัวอย่าง) *Salmonellae* ในเนื้อสัตว์ 24 ตัวอย่าง (ชนิดละ 8 ตัวอย่าง) และ *E. coli* O157:H7 ในเนื้อสัตว์ 108 ตัวอย่าง (เนื้อไก่ หมู และวัว 26, 24 และ 58 ตัวอย่าง ตามลำดับ)

การทดสอบ

1. การเตรียมตัวอย่าง นำตัวอย่างตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ผสมให้เข้ากัน ตักชั่ง 25 ± 0.1 กรัม ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อโดยใช้เทคนิคปราศจากเชื้อเพื่อป้องกันการปนเปื้อนสู่ตัวอย่างและควบคุมคุณภาพภายใน เช่น ควบคุมสิ่งแวดล้อมให้มีเชื้อปริมาณน้อย ๆ เพื่อป้องกันการปนเปื้อน เครื่องมือเครื่องใช้ที่สัมผัสตัวอย่างต้องปราศจากเชื้อเป็นต้น⁽¹⁴⁾

2. *L. monocytogenes* ใช้วิธีมาตรฐาน ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004⁽¹⁵⁾ เติมน้ำ Fraser broth บ่มตามระยะเวลา แล้ว selective enrichment ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Fraser broth แยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง 2 ชนิด ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ ALOA และ OXA ส่วน Fraser broth เมื่อบ่มตามที่กำหนดแล้วก็แยกบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง 2 ชนิด เช่นกัน เลือกลักษณะโคโลนีเฉพาะของ *Listeria* spp. ทดสอบยืนยัน 5 โคโลนี streak บน TSYEA plate (เป็นการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์อีกครั้ง) ทดสอบทางชีวเคมีโดยทำ catalase reaction จะให้ผลบวก ฟองก๊าซ motility test โดย stab เชื้อลงใน motility agar เป็นแบบร่มกาง (umbrella-like) การทดสอบยืนยัน *Listeria monocytogenes* ผลบวก เกิดโซนในสโรวโคโลนี (β -haemolysis) carbohydrate utilization ทดสอบการใช้น้ำตาล rhamnose, mannitol และ xylose โดยจะให้ผลบวก rhamnose อาหารเลี้ยงเชื้อขุนและเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองและทดสอบ CAMP test อ่านผลโดยดูการเสริมฤทธิ์การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (β -haemolysis) ในกรณีเสริมฤทธิ์กับเชื้อ *S. aureus*

3. *Salmonellae* ใช้วิธีมาตรฐาน ISO 6579:2002/Cor.1:2004⁽¹⁶⁾ pre-enrichment โดย เติมน้ำ BPW บ่มตามระยะเวลาดังที่กำหนด แล้ว selective enrichment ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ RVS broth และ MKTTn broth นำไปบ่มตามระยะเวลานำแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง 2 ชนิด ได้แก่ XLD agar และ HE agar นำโคโลนีลักษณะเฉพาะไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีทั้งหมด ถ้ามีน้อยกว่า 5 โคโลนีในแต่ละจานอาหารเลี้ยงเชื้อ streak ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ NA นำไปบ่ม แล้วนำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี โดยใช้อาหาร TSI agar, LIM medium, Urea agar, VP medium ในกรณีที่ทำอ่านผลแล้วตรงตามผลทางชีวเคมีของเชื้อ *Salmonellae* ก็นำไปทดสอบทางน้ำเหลืองวิทยาโดยใช้ *Salmonella* polyvalent O antiserum ทดสอบกับ polyvalent A-I และ OMA-OMG ถ้าตกตะกอนให้ทดสอบต่อกับ monovalent O antiserum group ต่าง ๆ ที่สอดคล้องกับ polyvalent O antiserum นั้น ๆ

4. *E. coli* O157:H7 ตรวจสอบเบื้องต้นด้วยวิธี Real-time PCR (Assurance GDS[®]) ตาม AOAC (Association of Official Analytical Chemists) Official Method 2005.04⁽¹⁷⁾ สำหรับตัวอย่างที่ให้ผลบวกตรวจยืนยัน *E. coli* O157 ต่อ ตามวิธีมาตรฐาน ISO 16654:2001⁽¹⁸⁾ โดยนำเชื้อที่เพิ่มจำนวน (enrichment) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ mEHEC และทำให้เชื้อเข้มข้นโดยหลักการ immunomagnetic separation มาแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะชนิดแข็ง 2 ชนิด ได้แก่ CT-SMAC และ CHROMagar-STECS นำโคโลนีลักษณะเฉพาะไปทดสอบการสร้าง indole แล้วนำโคโลนีที่สร้าง indole (ให้ผลบวก) ทดสอบทางน้ำเหลืองวิทยากับ O157 antiserum ด้วยวิธี slide agglutination กรณีพบเชื้อที่ให้ผลบวก แสดงว่าเป็น *E. coli* O157 ตรวจยืนยัน H7 ต่อโดยทดสอบทางน้ำเหลืองวิทยากับ H7 antiserum ด้วยวิธี tube agglutination ตาม AOAC Official Method 997.11⁽¹⁹⁾ ซึ่งถ้าให้ผลบวกแสดงว่าเป็น *E. coli* O157:H7

ผล

จากการสำรวจการปนเปื้อนเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ 3 ชนิดในเนื้อไก่ หมู และวัว ที่จำหน่ายในตลาดสดเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล จำนวน 15 แห่ง พบการปนเปื้อนเชื้อ *L. monocytogenes* 12 ตัวอย่าง จาก 90 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 13.3 แบ่งเป็นพบในเนื้อไก่ 8 ตัวอย่าง เนื้อหมู 2 ตัวอย่าง และเนื้อวัว 2 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 26.7, 6.7 และ 6.7 ตามลำดับ ซึ่งจากเนื้อไก่ที่พบ *L. monocytogenes* 8 ตัวอย่าง (จาก 30 ตัวอย่าง) แยกเป็นพบในเขตกรุงเทพฯ ร้อยละ 12.5 (2 ตัวอย่าง จาก 16 ตัวอย่าง) พบในเขตปริมณฑลร้อยละ 42.9 (6 ตัวอย่าง จาก 14 ตัวอย่าง) โดยพบการแพร่กระจาย (distribution) ของเชื้อนี้จากเนื้อไก่ในตลาด 4 แห่ง (กรุงเทพฯ 1 แห่ง และปริมณฑล 3 แห่ง) เนื้อหมูในตลาด 2 แห่ง (กรุงเทพฯ 1 แห่ง และปริมณฑล 1 แห่ง) และเนื้อวัวในตลาด 1 แห่ง

(กรุงเทพฯ) รวมพบในตลาด 6 แห่ง จาก 15 แห่ง (มี 1 แห่ง พบทั้งในเนื้อไก่และเนื้อหมู) เชื้อนี้มีการแพร่กระจายเท่ากับร้อยละ 26.7, 13.3 และ 6.7 รวม 40 (ตารางที่ 1)

ส่วน *Salmonellae* ตรวจ 24 ตัวอย่าง (ในเนื้อไก่ เนื้อหมู และเนื้อวัว ชนิดละ 8 ตัวอย่าง) จากตลาด 4 แห่ง (กรุงเทพฯ 2 แห่ง และปริมณฑล 2 แห่ง) พบ 21 ตัวอย่าง เท่ากับร้อยละ 87.5 แยกเป็นพบในเนื้อไก่ หมู และวัว 8, 7 และ 6 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 100, 87.5 และ 75.0 ตามลำดับ และพบการแพร่กระจายของเชื้อนี้ ในเนื้อไก่จากตลาด 4 แห่ง หมู 4 แห่ง และเนื้อวัว 3 แห่ง แสดงว่าเชื้อนี้มีการแพร่กระจายร้อยละ 100, 100 และ 75.0 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ส่วน *E. coli* O157:H7 ตรวจในเนื้อไก่ หมู และวัว 26, 24 และ 58 ตัวอย่าง รวม 108 ตัวอย่าง จากตลาด 13, 12 และ 28 แห่ง ตามลำดับ พบเชื้อนี้เฉพาะในเนื้อวัว 9 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 15.5 โดยพบการแพร่กระจายในตลาด 6 จาก 28 แห่ง คิดเป็นร้อยละ 21.4 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 1 ผลการตรวจ *L. monocytogenes* ในตัวอย่างเนื้อไก่ หมู และวัว จากตลาด 15 แห่ง (กรุงเทพมหานคร 8 แห่ง และปริมณฑล 7 แห่ง)

ชนิดตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจ	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบ (ร้อยละ)	จำนวนตลาดที่ตรวจพบ (ร้อยละ)
ไก่	30	8* (26.7)	4** (26.7)
หมู	30	2 (6.7)	2** (13.3)
วัว	30	2 (6.7)	1 (6.7)
รวม	90	12 (13.3)	6** (40.0)

* ในเขตกรุงเทพฯ พบ 2 ตัวอย่าง จาก 16 ตัวอย่าง เท่ากับ ร้อยละ 12.5

ในเขตปริมณฑล พบ 6 ตัวอย่าง จาก 14 ตัวอย่าง เท่ากับ ร้อยละ 42.9

** รวมพบในตลาด 6 แห่ง เพราะมี 1 แห่ง ตรวจพบ *L. monocytogenes* ทั้งในเนื้อไก่และหมู

ตารางที่ 2 ผลการตรวจ *Salmonellae* ในตัวอย่างเนื้อไก่ หมู และวัว จากตลาด 4 แห่ง (กรุงเทพมหานคร 2 แห่ง และปริมณฑล 2 แห่ง)

ชนิดตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจ	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบ (ร้อยละ)	จำนวนตลาดที่ตรวจพบ (ร้อยละ)
ไก่	8	8 (100)	4 (100)
หมู	8	7 (87.5)	4 (100)
วัว	8	6 (75.0)	3 (75.0)
รวม	24	21 (87.5)	4 (100)

ตารางที่ 3 ผลการตรวจ *E. coli* O157:H7 ในตัวอย่างเนื้อไก่ หมู และวัว จากตลาด 13, 12 และ 28 แห่ง (เนื้อวัว เก็บจากตลาดในเขตกรุงเทพฯ 17 แห่ง และปริมณฑล 11 แห่ง)

ชนิดตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจ	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบ (ร้อยละ)	จำนวนตลาดที่ตรวจพบ (ร้อยละ)
ไก่	26	0 (0)	0 (0)
หมู	24	0 (0)	0 (0)
วัว	58	9* (15.5)	6 (21.4)
รวม	108	9 (8.4)	6 (21.4)

* พบในเขตกรุงเทพฯ 8 ตัวอย่าง จาก 35 ตัวอย่าง เท่ากับ ร้อยละ 22.8 จากตลาด 5 แห่ง และปริมณฑล 1 ตัวอย่าง จาก 23 ตัวอย่าง เท่ากับ ร้อยละ 4.3 จากตลาด 1 แห่ง

วิจารณ์

L. monocytogenes ปนเปื้อนสู่เนื้อสัตว์ได้ เนื่องจากเชื้อมีแพร่กระจายทั่วไปในสิ่งแวดล้อม อาจติดปนมากับตัวสัตว์ เช่น บริเวณผิวหนัง กีบเท้า โดยเฉพาะอย่างยิ่งขนและปีกของสัตว์ปีก ตั้งแต่การเลี้ยงในฟาร์ม ขณะขนส่ง (รวมถึงการใช้กรง รถขนส่ง ที่ไม่สะอาด จะเป็นแหล่งสะสมของเชื้อโรค) จากโรงเชือดหรือโรงงานชำแหละที่มีมูลสัตว์ ตกค้างสะสมอยู่ภายใน รวมทั้งขั้นตอนการกำจัดขนและการชำแหละที่มีการจัดการไม่เหมาะสม ทำให้เชื้อปนเปื้อนข้ามระหว่างซากได้ นอกจากนี้มีการศึกษาที่ระบุว่า การล้างทำความสะอาดพื้นและท่อระบายของเสีย ทำให้พื้นผิวที่สัมผัสเนื้อสัตว์และอากาศที่หมุนเวียนภายในเกิดการปนเปื้อนเชื้อนี้ได้เช่นกัน⁽²⁰⁾ ซึ่งจากผลการสำรวจเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ *L. monocytogenes* ครั้งนี้ พบปนเปื้อนสูงสุดในเนื้อไก่ ร้อยละ 26.7 ขณะที่เนื้อหมูและเนื้อวัว พบร้อยละ 6.7 โดยพบเนื้อไก่ในเขตกรุงเทพมหานคร มีการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* สูงกว่าการสำรวจของกรมปศุสัตว์ในระหว่างปี 2549 - 2550 ที่พบร้อยละ 5.85 (10 ตัวอย่าง จาก 171 ตัวอย่าง) และ 3.65 (11 ตัวอย่าง จาก 301 ตัวอย่าง) ตามลำดับ⁽²¹⁾ และในเขตปริมณฑลสูงกว่าการสำรวจในเนื้อไก่ดิบจังหวัดนนทบุรี ปี 2548 ที่พบเชื้อมีร้อยละ 29⁽²²⁾ แสดงให้เห็นว่าในเนื้อไก่มีการพบเชื้อมีเพิ่มขึ้น ส่วนเนื้อหมูและเนื้อวัว ยังพบเชื้อมีน้อยอยู่และนอกจากนั้นพบการแพร่กระจายของเชื้อมีร้อยละ 40 (ในตลาด 6 แห่ง จาก 15 แห่ง) แต่อย่างไรก็ตามพบร้อยละของการปนเปื้อนและการแพร่กระจาย *L. monocytogenes* อยู่ในระดับต่ำถึงปานกลาง จึงมีโอกาสเกิดโรค Listeriosis แบบ sporadic หรือเป็นครั้งคราว ดังเห็นได้จากการระบาดของโรค Listeriosis ในต่างประเทศที่พบบ้าง แต่ไม่บ่อยอย่าง Salmonellosis อีกทั้งไม่เคยพบการระบาดในบ้านเราหรืออาจมีผู้ป่วยบ้างแต่ไม่มีการรายงาน

ส่วนการปนเปื้อนเชื้อ Salmonellae สู่อาหารส่วนใหญ่มาจากมูลสัตว์หรือสิ่งแวดล้อม จุดที่ปนเปื้อนเป็นไปตั้งแต่โรงเชือด กระบวนการชำแหละ การขนส่ง และแหล่งจำหน่ายในตลาดสดที่ไม่ถูกสุขลักษณะ แต่เนื่องจาก Salmonellae มีการแพร่ระบาดอย่างกว้างขวางเป็นประจำทั่วโลก⁽¹¹⁾ ซึ่งจากการสำรวจครั้งนี้ ตรวจหา Salmonellae ในตัวอย่างจำนวนไม่มากนัก (24 ตัวอย่าง จากตลาด 4 แห่ง) เพื่อดูแนวโน้มการปนเปื้อน ทั้งนี้พบการปนเปื้อนของเชื้อมีจากทุกตลาด (ยกเว้นในเนื้อวัว พบในตลาด 3 แห่ง จาก 4 แห่ง) และพบการปนเปื้อนในเนื้อไก่ หมู และวัว สูงมากคือพบถึงร้อยละ 100, 87.5 และ 75 ตามลำดับ โดยร้อยละของการปนเปื้อนในเนื้อสัตว์ทั้ง 3 ชนิด พบสูงกว่างานวิจัยหลายฉบับ เช่น งานวิจัยในเนื้อไก่ดิบตามตลาดสดในเขตกรุงเทพมหานครปี 2540 ที่พบ Salmonellae ร้อยละ 72⁽²³⁾ งานวิจัยในเนื้อวัวดิบ ปี 2552 สำรวจในเขตเทศบาลนครขอนแก่น ซึ่งพบ Salmonellae ร้อยละ 66.67⁽²⁴⁾

และงานวิจัยของสำนักงานปศุสัตว์ราชบุรีและประจวบคีรีขันธ์ในปี 2554 ที่พบการปนเปื้อน ร้อยละ 80.95, 61.26 และ 56.25 ตามลำดับ และในปี 2555 ของหน่วยงานเดียวกัน ที่พบร้อยละ 75.75, 65.85 และ 83.33 ตามลำดับ⁽²⁵⁾ แสดงว่า ในเนื้อสัตว์ดิบมีแนวโน้มการแพร่กระจายของเชื้อนี้มากขึ้น ซึ่งหากมีการปนเปื้อนของเชื้อนี้จากเนื้อสัตว์ดิบลงในอาหารปรุงสุกจะทำให้เกิดโรคต่อผู้บริโภคได้

ส่วน *E. coli* O157:H7 ที่พบในเนื้อวัวเพราะสัตว์เคี้ยวเอื้องเป็นแหล่งรังโรค (reservoir host) ของเชื้อ *E. coli* กลุ่มที่ก่อโรค⁽²⁶⁾ โดยเชื้อจากอุจจาระของวัวอาจปนเปื้อนทั้งทางตรงและทางอ้อมลงในเนื้อขณะฆ่าหรือชำแหละ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการระบาดของ *E. coli* O157 STEC จากการบริโภคเนื้อวัวดิบมากกว่าอาหารอื่น⁽²⁷⁾ และงานวิจัยเกี่ยวข้องกับ *E. coli* O157:H7 ของประเทศไทยที่พบเชื้อนี้ในเนื้อวัวที่วางขายปลีกร้อยละ 9 เนื้อวัวจากโรงฆ่าสัตว์ร้อยละ 8-28 และจากอุจจาระวัว ร้อยละ 11-84⁽²⁸⁾

สรุป

จากการสำรวจตัวอย่าง เนื้อไก่ หมู และวัว ที่วางจำหน่ายในตลาดสดเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล เพื่อหาการปนเปื้อนของเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ 3 ชนิด ผลพบ *L. monocytogenes* ร้อยละ 26.7, 6.7 และ 6.7 และ *Salmonellae* ร้อยละ 100, 87.5 และ 75 ตามลำดับ ส่วน *E. coli* O157:H7 พบเฉพาะในเนื้อวัว ร้อยละ 15.5 ดังนั้นเนื้อไก่ หมู และวัวดิบ มีโอกาสพบการปนเปื้อนเชื้อโรคอาหารเป็นพิษแตกต่างกันไป หากผู้บริโภคได้รับเชื้อที่ก่อโรครุนแรงอาจเกิดความเจ็บป่วยถึงขั้นเสียชีวิตได้ ดังนั้นไม่ควรบริโภคเนื้อสัตว์ดิบ หรืออาหารปรุงสุกไม่ทั่วถึง และขณะเตรียมหรือประกอบอาหารระวังการปนเปื้อนข้ามของเชื้อโรคจากของดิบมาของสุก โดยล้างมือและอุปกรณ์ที่สัมผัสของดิบ เช่น เขียง มีด ภาชนะ ให้สะอาดก่อนนำไปใส่ของสุก และถ้าทำได้ควรแยกเขียงที่หั่นเนื้อสัตว์และผักผลไม้ ก่อนบริโภคต้องปรุงเนื้อสัตว์ให้สุกอย่างทั่วถึง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายตรวจวิเคราะห์และรับรองอาหารปลอดภัย สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ที่ช่วยเก็บตัวอย่าง ขอขอบคุณศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการฝ่ายอาหาร กลุ่มจุลชีววิทยา ทุกท่านที่ช่วยให้การดำเนินงานนี้สำเร็จลงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. สุมณฑา วัฒนสินธุ์. จุลชีววิทยาทางอาหาร. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์; 2545. หน้า 136.
2. Food poisoning bacteria and viruses overview. [online]. [cited 2016 May 25]; [5 screens]. Available from: URL: <http://foodsafety.asn.au/food-poisoning-bacteria-and-viruses-overview>
3. Salfinger Y, Tortorello ML, editors. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 5th ed. Washington, DC: APHA Press; 2015. p. 425-438.
4. Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, Editors. Manual of clinical microbiology Vol. 1. 10th ed. Washington, DC: ASM Press; 2011. p. 403.
5. สุมณฑา วัฒนสินธุ์. จุลชีววิทยาทางอาหาร. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์; 2545. หน้า 157-78.
6. Listeriosis [online]. 2005 [cited 2015 May 11]; [5 screens]. Available from: URL: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/listeriosis.pdf>

7. Elliot TR, Catherine WD. *Listeria*. In: Yvonne S, Mary LT, editors. Compendium of methods for the Microbiological examination of foods. 5th edition. Washington, DC: APHA Press; 2015. p. 425-438.
8. Identification of immunogenic proteins and generation of antibodies of antibodies against *Salmonella* Typhimurium using phage display [online]. [cited 2016 May 22]; [16 screens]. Available from: URL: <http://www.bmcbiotechnol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6750-12-29>
9. สมณฑา วัฒนสินธุ์. จุลชีววิทยาทางอาหาร. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์; 2545. หน้า 163-169.
10. *Salmonella* (non-typhoidal). [online]. 2013 [cited 2016 Apr 11]; [3 screens]. Available from: URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>
11. CDC. Foodborne disease active surveillance network (FoodNet): FoodNet surveillance report for 2012 (final report). Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2014.
12. Nelson AC, Jonathan GF, Wendy M, Charlene RJ, Jason R, Jason R, et al. *Salmonella*. In: Yvonne S, Mary LT, editors. Compendium of methods for the Microbiological examination of foods. 5th ed. Washington, DC: APHA Press; 2015. p. 445-75.
13. Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, Editors. Manual of clinical microbiology Vol. 1. 10th ed. Washington, DC: ASM Press; 2011. p. 603-13
14. Andrews WH, Hammack TS. BAM: food sampling/preparation of sample homogenate. In: Bacteriological analytical manual. 8th ed. Rockville, Maryland: Food and Drug Administration. [online]. 2003 [cited 2016 Apr 11]; [9 screens]. Available from: URL: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm063335.htm>
15. ISO 11290-1:1996/Amd 1: 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection method AMENDMENT 1: Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data. Geneva: ISO 2004.
16. ISO 6579:2002/Cor.1:2004. Microbiological of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. TECHNICAL CORRIGENDUM 1. Geneva: ISO; 2004.
17. 17.4.01E. AOAC official method 2005.04 *Escherichia coli* O157:H7 in selected foods assurance GDS for *E. coli* O157:H7. [online]. 2005; [3 screens]. Available from: URL: http://www.agrinea.com/fileadmin/user_upload/Assurance_GDS_AOAC_Official_Method__2005.04.pdf
18. ISO 16654:2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157. Geneva: ISO; 2001.
19. 17.4.01C. AOAC official method 997.11 *Escherichia coli* O157:H7 counts in foods hydrophobic grid membrane filter (ISO-GRID) method using SD-39 agar and serological confirmation. [online]. 2001; [4 screens]. Available from: URL: <http://img.21 food.cn/img/biaozhun/20100108/177/11285264.pdf>
20. Saini JK, Marsden JL, Fung DY, Crozier-Dodson BA, Evaluation of potential for translocation of *Listeria monocytogenes* from floor drain to food contact surfaces in the surrounding environment using *Listeria innocua* as a surrogate [online]. 2012; [6 screens]. Available from: URL: <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2012.24073>
21. พัชรี ทองคำคุณ, พรทิพย์ ศิริวรรณ, ชิต ศิริวรรณ. การสำรวจเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในเนื้อเป็ดและเนื้อไก่จากตลาดสดในกรุงเทพมหานคร ระหว่างปี 2549-2550. ว. สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ [วารสารออนไลน์]. 2552; [สืบค้น 23 มี.ค. 2558]; 3(3): [13 หน้า]. เข้าได้ถึงจาก : URL: <http://niah.dld.go.th/th/files/ejournal/v03n3t03.pdf>
22. ปรีดา พานิชกุล, จำเรียง ปุญญะประสิทธิ์. การศึกษาการปนเปื้อนเชื้อ *Listeria* spp. ในไก่และผลิตภัณฑ์ไก่. ว. กรมวิทย พ 2548; 47(4): 270-5.

23. Boonmar S, Bangtrakulnonth A, Pornrunangwong S, Marnrim N, Kaneko K, Ogawa M. Salmonella in broiler chickens in Thailand with dpecial reference to contamination of retail meat with *Salmonella enteritidis*. J Vet Med Sci 1998; 60(11): 1233-6.
24. สรรเพชญ์ อังกิตติตระกูล, ประสาน ตั้งควัฒนา, อรุณี พลภักดิ์, เดชา ลิทธิกุล. ความชุกและการติดต่อสารต้านจุลชีพของเชื้อซัลโมเนลลาที่แยกได้จากเนื้อวัวในเขตเทศบาลนครขอนแก่น. วารสารวิจัย มข. 2554; 16(2): 105-11.
25. สุวัฒน์ มลิจารย์, ศิริจันทร์ทิพย์ วนาประเสริฐศักดิ์. การปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. และ *Staphylococcus aureus* ในเนื้อสัตว์จากตลาดสดและตลาดนัดในจังหวัดราชบุรี. [ออนไลน์]. [สืบค้น 23 มี.ค. 2558]; [14 หน้า]. เข้าได้ถึงจาก: URL: <http://pvlo-rri.dld.go.th/pdf/gps/ผลงานวิชาการ-น.สพ-สมบูรณ์.pdf>
26. World Health organization. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). [online]. 2011. [4 screens]; Available form: URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/en/>
27. Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swerdlow DL. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. Emerg Infect Dis 2005; 11(4): 603-9.
28. Suthienkul O, Brown JE, Seriwatana J, Tienthongdee S, Sastravaha S, Echeverria P. Shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli* in retail meats and cattle in Thailand. Appl Environ Microbiol 1990; 56(4): 1135-9.

Survey of *Listeria monocytogenes*, *Salmonellae* and *E. coli* O157:H7 Contamination in Raw Meats from Fresh Markets in Bangkok and Circumferences

Ratchadaporn Suwannarat and Duangdao Wongsommart

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

ABSTRACT Between December 2012 and February 2014, Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Sciences had surveyed food poisoning bacteria, *Listeria monocytogenes*, *Salmonellae* and *E. coli* O157:H7 contaminations in total of 90, 24 and 108 raw meat samples, respectively, from 28 fresh markets in Bangkok and circumferences. Thirty samples from each of chicken, pork, and beef were examined for *L. monocytogenes* and 8 samples from each of those meat were examined for *Salmonellae*, while 26, 24 and 58 samples, respectively were analysed for *E. coli* O157:H7. The results showed that *L. monocytogenes* was detected in 26.7%, 6.7% and 6.7% of chicken, pork and beef, respectively and 100%, 87.5% and 75%, of those meat, respectively, were *Salmonellae* positive. For the survey of *E. coli* O157:H7, it was detected only in beef samples with the percentage of 15.5. Raw meats consumption might be a cause of food poisoning. Therefore, fully-cooked meat with good hygienic preparation including the avoidance of cross contamination from raw to cooked meat is recommended for safety of consumers.

Key words: Food poisoning bacteria, *Listeria monocytogenes*, *Salmonellae*, *E. coli* O157:H7, raw meats

การตรวจพิสูจน์และยืนยันเอกลักษณ์ยานอนหลับ ชนิดใหม่ในประเทศไทย : ฟินาซีแพมในขອງกลาง

ณปภา สิริศุภกฤตกุล ชมพูนุท นุตสถาปนา และบงกช พันธุ์บูรณานนท์

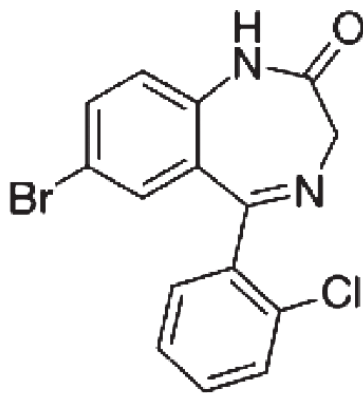
สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีหน้าที่ในการวิเคราะห์ยาและยาเสพติดเพื่อการควบคุมทางกฎหมาย และเฝ้าระวังการนำไปใช้ในทางที่ผิด พบยาที่นำมาใช้ในทางที่ผิดมากที่สุด คือ ยากลุ่มเบนโซไดอะซีปีนส์ ในปี พ.ศ. 2556 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้รับของกลางเป็นยาเม็ดกลมแบนสีส้มอ่อน บรรจุแผงแข็ง “Erimin 5” ปกติประกอบด้วยไนเมตาซีแพม จากผลการตรวจในห้องปฏิบัติการไม่พบไนเมตาซีแพม แต่ตรวจพบฟินาซีแพม ซึ่งคาดว่าเป็นการตรวจพบครั้งแรกในประเทศไทย เป็นยากลุ่มเบนโซไดอะซีปีนส์เช่นกัน แต่เป็นชนิดที่ออกฤทธิ์แรงและนาน สามารถหาซื้อทางอินเทอร์เน็ตและมีการนำไปใช้ในทางที่ผิดในยุโรปและสหรัฐอเมริกา พบรายงานการเสียชีวิตหลายราย สำหรับไนเมตาซีแพมเป็นสารควบคุม ขณะที่ฟินาซีแพมยังไม่ได้เป็นสารควบคุมทั้งในอนุสัญญาสหประชาชาติ ประเทศไทย และอีกหลายประเทศ จึงคาดว่าเพื่อหลีกเลี่ยงข้อกฎหมาย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อแสดงขั้นตอนและเทคนิคการตรวจพิสูจน์ต่างๆ ที่นำไปสู่การยืนยันเอกลักษณ์ฟินาซีแพมในขອງกลาง ซึ่งจากการตรวจยืนยันของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ในครั้งนี้เป็นผลให้คณะกรรมการวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาทได้ออกประกาศกระทรวงสาธารณสุข เพื่อควบคุมฟินาซีแพมเป็นวัตถุออกฤทธิ์ประเภท 1 ตามพระราชบัญญัติวัตถุที่ออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาท พ.ศ. 2518

Accepted for publication, 20 April 2016

บทนำ

ฟินาซีแพม (Phenazepam) เป็นยาในกลุ่มเบนโซไดอะซีปีนส์ชนิดออกฤทธิ์นาน (long acting benzodiazepines) ที่มีสูตรโครงสร้างหลักทางเคมีคือ 5-Aryl-1, 4-benzodiazepine เช่นเดียวกับยาส่วนใหญ่ในกลุ่มนี้ (ภาพที่ 1) ออกฤทธิ์ที่ระบบประสาทส่วนกลาง มีชื่อเรียกอื่นๆ เช่น Fenazepam, Bonsai, Bonsai Supersleep, Fenaz, Solviet Benzo เป็นต้น พงยาามีลักษณะเป็นผลึกสีขาวหม่นจนถึงเหลือง ไม่มีกลิ่น ไม่มีรส ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม (20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ละลายได้เล็กน้อยในเอทานอล (0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) แต่ไม่ละลายในน้ำ⁽¹⁾



Phenazepam

สูตรโมเลกุล : $C_{15}H_{10}BrClN_2O$ มวลโมเลกุล : 349.61 g/mol

ชื่อทางเคมี : 7-Bromo-5-(2-chlorophenyl)-1, 3-dihydro-2H-1, 4-benzodiazepin-2-one

Melting point : 225-230 °C

ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของฟินาซีแพม

กลไกการออกฤทธิ์ของยา คือ เป็น benzodiazepine receptor agonist ทำให้ GABA receptor ทำงานได้มากขึ้น และ chloride channel เปิดทำให้ chloride ions เข้าไปในเซลล์มากขึ้น เกิด hyperpolarization และยับยั้งการทำงานของเซลล์ประสาทต่าง ๆ⁽²⁾ เมื่อยาเข้าสู่ร่างกายจะพบระดับฟินาซีแพมในเลือดสูงสุด ที่เวลา 1.5 - 4 ชั่วโมง จะมีค่าครึ่งชีวิตของยาประมาณ 60 ชั่วโมง

ฟินาซีแพมจัดเป็นยาที่ออกฤทธิ์แรง (potent drug) โดยมีความแรงมากกว่า diazepam 5-10 เท่า เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะเปลี่ยนแปลงเป็นสารที่ออกฤทธิ์ที่สำคัญคือ 3-hydroxyphenazepam ปัจจุบันมีใช้ทางการแพทย์เฉพาะในสหพันธรัฐรัสเซีย ในการบำบัดอาการวิตกกังวล นอนไม่หลับ อาการชัก รูปแบบเภสัชภัณฑ์ที่ใช้ในการแพทย์คือ ยาเม็ดขนาด 0.5 และ 1 มิลลิกรัม และยาน้ำขนาด 0.1% และ 0.3% และแผ่นแปะผิวหนัง โดยรับประทานยาเม็ดครั้งละ 0.5 มิลลิกรัม วันละ 2-3 ครั้ง ปริมาณยาสูงสุดไม่ควรเกิน 10 มิลลิกรัมต่อวัน แต่ยังไม่ได้รับการยอมรับให้ใช้ทางการแพทย์ในสหรัฐอเมริกา สหราชอาณาจักร และหลาย ๆ ประเทศ รวมทั้งประเทศไทย^(1, 2)

เนื่องจากผลของยาฟินาซีแพมทำให้เกิดการผ่อนคลายอารมณ์ เคลิบเคลิ้มเป็นสุข จึงมีการนำไปใช้ในทางที่ผิด พบมากในประเทศแถบยุโรปตะวันตก จากนั้นได้แพร่หลายไปยังสหรัฐอเมริกา ส่วนมากพบการขายทางอินเทอร์เน็ตทั้งในยุโรป สหรัฐอเมริกา เกาหลี หรือนิวซีแลนด์ ซึ่งมีแหล่งผลิตจากจีนเป็นส่วนใหญ่⁽³⁾ ลักษณะของยาที่นำมาใช้ได้แก่ ผง เม็ด หรือสารละลาย พบมีการนำมาใช้ในทางที่ผิดได้หลายรูปแบบ เช่น รับประทาน ฉีด สูดดม พ่นในปาก แปะผิวหนัง หรือสวนทวารหนัก⁽²⁾ นอกจากนี้ฟินาซีแพมยังเป็นยาที่มีรายงานการใช้ยาเกินขนาดมาก เนื่องจากยามีขนาดความแรงสูง ผู้เสพมักจะรับประทานยาด้วยสายตา และเนื่องจากยาออกฤทธิ์ช้า ทำให้ผู้เสพคิดว่าเสพยาน้อยเกินไป จึงเพิ่มปริมาณยาเกินขนาดจนเกิดพิษ โดยเฉพาะถ้าเสพกับยาหลายชนิดร่วมกันเพื่อเสริมฤทธิ์กัน จะทำให้เกิดปัญหาการใช้ยาเกินขนาดได้ง่าย^(4, 5) อาการไม่พึงประสงค์ของฟินาซีแพม เช่น สูญเสียความทรงจำชั่วคราว กล้ามเนื้อทำงานไม่ประสานกัน ง่วงซึม สับสนในความคิดและคำพูด พูดไม่รู้เรื่อง หวาดระแวง เพ้อ มีปัญหาในการทรงตัว

กตการหายใจ การได้รับยาในขนาดสูงหรือใช้ร่วมกับยาที่ออกฤทธิ์กดระบบประสาทส่วนกลางอื่น ๆ เช่น ยาในกลุ่มโอปิเอตส์ (opiates), ยาในกลุ่มบาร์บิทูเรต (barbiturates) หรือแอลกอฮอล์ (alcohol) อาจกดระบบหายใจและทำให้เสียชีวิตได้ ทั้งนี้ขนาดยาที่ใช้เสฟ คือ 2 -10 มิลลิกรัมหรือมากกว่า และอาจพบพิษของยาหลังได้รับยาไปแล้ว 5 วัน และอาจนานถึง 3 สัปดาห์^(1, 2, 6)

มีรายงานการใช้ฟินาซีแพมในทางที่ผิดในหลายประเทศ เช่น ประเทศฟินแลนด์พบการใช้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 2003 ในกลุ่มคนขับรถที่ถูกจับในข้อหาขับรถโดยใช้ตัวยาสงบฤทธิ์ (Driving Under the Influence of Drugs; DUID) และพบการใช้ร่วมกับยาที่ออกฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทจนเกิดอาการชักหลายคน⁽⁷⁾ ส่วนประเทศสวีเดนในปี ค.ศ. 2009 พบการใช้ฟินาซีแพมเกินขนาด คือ 400-600 มิลลิกรัมต่อวัน ซึ่งสูงกว่าขนาดยาปกติถึง 500 เท่า จนเกิดพิษจากยา⁽²⁾ สหราชอาณาจักรพบรายงานการใช้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 2009 จนเกิดอาการชัก และเพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็วในปี ค.ศ. 2010 โดยพบผู้ป่วยเข้ารับการรักษาจากการใช้ยาเกินขนาดหลายราย⁽⁸⁾ และในปี ค.ศ. 2011 เริ่มมีรายงานการเสียชีวิตจากการใช้ฟินาซีแพมเกินขนาด และจากรายงานของ The National Forensic Laboratory Information System (NFLIS) พบการใช้ฟินาซีแพมในสหรัฐอเมริกาตั้งแต่ปี ค.ศ. 2008 จำนวน 3 ราย และเพิ่มสูงขึ้นเป็น 97 ราย ในปี ค.ศ. 2011 และ 64 ราย ในปี ค.ศ. 2013 และมีรายงานการใช้ดังกล่าว จากจำนวน 31 มลรัฐ ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2008-2013 จำนวน 284 ราย⁽⁹⁾

การแพร่ระบาดของการใช้ฟินาซีแพมในทางที่ผิดในหลายประเทศ พบว่าของกลางส่วนใหญ่ในรูปแบบยาเม็ดหรือผง ทั้งในรูปแบบยาเดี่ยวที่พบในสหราชอาณาจักร เยอรมนี ตุรกี หรือผสมร่วมกับยาเสพติดอื่น ๆ เช่น Synthetic cannabinoids ที่พบในฟินแลนด์ นิวซีแลนด์ และเกาหลีใต้⁽¹⁰⁾ จากรายงานของ Advisory Council on the Misuse of Drugs (ACMD) ในปี ค.ศ. 2009-2011 พบของกลางฟินาซีแพมในประเทศอังกฤษและเวลส์ 118 คดี จำนวนรวม 23,090 เม็ด และมีแนวโน้มจำนวนคดีเพิ่มมากขึ้นทุกปี และจากรายงานของ Scottish Crime and Drug Enforcement Agency (SCDEA) พบของกลางฟินาซีแพมในประเทศสกอตแลนด์ 103 คดี จำนวนรวม 260,000 เม็ด นอกจากนี้ยังพบว่าคดีที่เกี่ยวข้องกับฟินาซีแพมมีแนวโน้มจะแพร่ระบาดไปในหลายประเทศ และมีจำนวนคดีเพิ่มสูงขึ้นทุกปี⁽³⁾

สำหรับไนเมตาซีแพม (Nimetazepam) มีชื่อเรียกในหมู่ผู้ใช้คือ Happy 5 Five-five และ Erimin 5 จัดเป็นยาในกลุ่มเบนโซไดอะซีปีนส์ชนิดออกฤทธิ์ปานกลาง (Intermediate-acting Benzodiazepines) สังเคราะห์ขึ้นครั้งแรกในประเทศญี่ปุ่น ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1964 ใช้ในทางการแพทย์เพื่อบำบัดอาการนอนไม่หลับ ลักษณะที่พบส่วนใหญ่เป็นยาเม็ดกลมแบนสีส้มอ่อน ด้านหนึ่งมีสัญลักษณ์เฉพาะ และตัวเลข 028 อีกด้านหนึ่งมีเลข 5 บรรจุแผงพลาสติกใสสีแดง-อะลูมิเนียม แผงละ 10 เม็ด บนแผงแจ้ง Erimin 5[®] ขนาดเม็ดละ 5 มิลลิกรัม น้ำหนักเฉลี่ยต่อเม็ดประมาณ 180 มิลลิกรัม การใช้ในทางที่ผิดมักใช้ร่วมกับแอลกอฮอล์ทำให้เกิดอาการเคลิ้มฝัน และเป็นยาที่ทำให้หลับหลังจากการใช้ยาบ้าหรือยาไอ ซึ่งเป็ยยากระตุ้นประสาท ในประเทศไทยไนเมตาซีแพมจัดเป็นวัตถุออกฤทธิ์ในประเภท 2 ตามพระราชบัญญัติวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาท พ.ศ. 2518⁽¹¹⁾ และจากข้อมูลการตรวจพิสูจน์ Erimin 5[®] ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2550-2558 นอกจากตรวจพบเป็นไนเมตาซีแพมแล้ว ยังพบสารกลุ่มเบนโซไดอะซีปีนส์ตัวอื่น ๆ ที่ใช้เพื่อทดแทน ได้แก่ ไดอาซีแพม (Diazepam) และไนตราซีแพม (Nitrazepam) อีกด้วย

ข้อมูลการตรวจพิสูจน์ของกลางในคดียาเสพติด ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ประจำปี พ.ศ. 2556-2558 จำนวนรวม 85,192 ตัวอย่าง พบเป็นวัตถุออกฤทธิ์ 1,140 ตัวอย่าง โดยวัตถุออกฤทธิ์ที่ตรวจพบมากที่สุดคือ สารในกลุ่มเบนโซไดอะซีปีนส์ จำนวน 981 ตัวอย่าง หรือคิดเป็นร้อยละ 86.0 ของวัตถุออกฤทธิ์ที่ตรวจพบ โดยสารในกลุ่มเบนโซไดอะซีปีนส์ที่พบการนำมาใช้ในทางที่ผิดมากที่สุดคือ อัลปราโซแลม (Alprazolam) รองลงมาคือไนเมตาซีแพม (Nimetazepam) ไดอาซีแพม (Diazepam) ลอราซีแพม (Lorazepam) โคลนาซีแพม

(Clonazepam) ฟินาซีแพม (Phenazepam) และอื่น ๆ คิดเป็นร้อยละของตัวอย่างที่ตรวจพบเบนโซไดอะซีปีนส์ 80.6, 6.8, 6.5, 2.3, 1.4, 0.9 และ 1.5 ตามลำดับ โดยตัวอย่างของกลาง Erimin-5[®] ที่ตรวจวิเคราะห์ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2556 – 2558 ตรวจพบเป็นโนเมตาซีแพม 66 ตัวอย่าง จำนวน 7,985 เม็ด น้ำหนักรวม 1.517 กิโลกรัม และตรวจพบเป็นฟินาซีแพม 9 ตัวอย่าง จำนวน 3,295 เม็ด น้ำหนักรวม 0.659 กิโลกรัม

แนวทางการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ของกลางยาเสพติดตาม Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs (SWGDRUG) Recommendations ได้กำหนดไว้ดังนี้คือ การตรวจพิสูจน์โดยใช้เทคนิคประเภท A ได้แก่ อินฟราเรดสเปกโตรเมทรี หรือแมสสเปกโตรเมทรี จะต้องใช้เทคนิคประเภท B เช่น แก๊สโครมาโทกราฟี โครมาโตแกรมชนิดผิวบาง หรือเทคนิคประเภท C เช่น ปฏิกริยาการเกิดสี อัลตราไวโอเลตสเปกโตรโฟโตเมทรี ร่วมด้วยอย่างน้อย 1 เทคนิค หรือกรณีไม่ได้ใช้เทคนิคประเภท A จะต้องใช้อย่างน้อย 3 เทคนิค โดยจะต้องเป็นเทคนิคประเภท B ไม่น้อยกว่า 2 เทคนิค⁽¹²⁾ และตาม Recommended Methods for the Identification and Analysis of Barbiturates and Benzodiazepines under International Control ของ United Nations Office on Drugs and Crime มีวิธีการและข้อมูลผลการตรวจพิสูจน์ของสารในกลุ่มเบนโซไดอะซีปีนส์จำนวน 33 ชนิด ด้วยเทคนิคต่าง ๆ เช่น ปฏิกริยาการเกิดสี หรือโครมาโทกราฟี หรือสเปกโตรโฟโตเมทรี แต่ทั้งนี้ยังไม่ครอบคลุมฟินาซีแพม ซึ่งเทคนิคที่นิยมใช้ในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ของกลางยาเสพติดมากที่สุดคือการทดสอบด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี เพราะเป็นวิธีที่มีความเฉพาะเจาะจงสูง⁽¹³⁾ โดยข้อมูลการตรวจพิสูจน์ฟินาซีแพมในต่างประเทศมักเป็นการตรวจพบยาฟินาซีแพมในเลือดหรือปัสสาวะของผู้ที่เสพยาเกินขนาดจนเสียชีวิต หรือกลุ่มคนขับรถ และมักพบการเสพยาฟินาซีแพมร่วมกับยาอื่น ๆ

อย่างไรก็ตามยังไม่พบข้อมูลการแพร่ระบาดของยาฟินาซีแพมมาก่อนในประเทศไทย จึงทำให้สถานตรวจพิสูจน์ต่าง ๆ ขาดข้อมูลการตรวจวิเคราะห์และสารมาตรฐานเพื่อยืนยัน ประกอบกับสถานตรวจพิสูจน์ต่าง ๆ มีเครื่องมือและอุปกรณ์ที่แตกต่างกัน การวิเคราะห์จำเป็นต้องใช้ข้อมูลการวิเคราะห์จากหลายเทคนิค เพื่อความถูกต้องและให้เป็นไปตามแนวทางที่กำหนด ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงจัดทำขึ้น โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อแสดงขั้นตอนและเทคนิควิธีตรวจพิสูจน์ต่าง ๆ ที่นำไปสู่การยืนยันเอกลักษณ์ของฟินาซีแพมในของกลางที่ได้รับและมีแนวโน้มการแพร่ระบาดมากขึ้น เพื่อเป็นข้อมูลให้กับสถานตรวจพิสูจน์อื่นๆ ให้สามารถตรวจพิสูจน์และรายงานผลได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่าง

ฟินาซีแพมรูปแบบเม็ดกลมแบนสีส้มอ่อน ด้านหนึ่งมีสัญลักษณ์เฉพาะ และตัวเลข 028 อีกด้านหนึ่งมีเลข 5 แบ่งบรรจุแผงพลาสติกใสสีแดง-อะลูมิเนียม แผงละ 10 เม็ด บนแผงแจ้ง Erimin 5[®] รุนการผลิตที่ AAA5000AAA วันที่หมดอายุ 2015.08.28 ผลิตจากประเทศญี่ปุ่น ซึ่งได้รับจากสถานีตำรวจภูธรหาดใหญ่ จำนวน 2,940 เม็ด

เครื่องมือและอุปกรณ์

- Electronic analytical balance ทศนิยม 6 ตำแหน่ง
- Thin-Layer Chromatography Apparatus : TLC tank ขนาด 27.5 × 27.5 × 7.5 เซนติเมตร, silica gel GF254 precoated plate ขนาด 20 × 20 เซนติเมตร, microcapillary tube ขนาด 10 ไมโครลิตร
- Spectrophotometer
- Gas Chromatography - Mass Spectrometer โดยมีสภาวะการทดสอบดังนี้คือ
Column: Agilent HP-5MS capillary column 30 m × 0.25 mm, Film thickness 0.25-μm
Carrier gas: Helium at 1 ml/min, constant flow

Oven: Initial 50°C for 2 min then 20°C/min to 320°C for 10 min, Run time 25.5 min
 Injection: volume 1 µl, Split ratio 50:1
 Detector: MS scan in EI mode, range 40–550 m/z
 – Fourier Transform Infrared Spectrometer

สารมาตรฐาน

Phenazepam (Composynth/Canada) รุ่นที่ผลิต 200906118 ความบริสุทธิ์ 99.42%, Nimetazepam (TRC/Canada) รุ่นที่ผลิต 21-AZC-7-1 ความบริสุทธิ์ 98%, Nitrazepam (BDN Working Standard for identification) เลขที่ควบคุมคุณภาพ WS N39-1/55, Diazepam (DMS Reference Standard) เลขที่ควบคุมคุณภาพ 02B54103 ความบริสุทธิ์ 989.6 mcg/mg

สารเคมี

สารเคมีที่เป็น AR grade ประกอบด้วย Platinic chloride, Potassium iodide, Hydrochloric acid (35–38% w/w), Formaldehyde solution (37–40% w/v), Concentrated sulfuric acid, n-Hexane, 2-Propanol, Ammonia solution (25–30% w/w), n-Heptane, Chloroform, Ethanol

สารเคมีที่เป็น IR grade ได้แก่ Potassium Bromide

Purified water

วิธีการเตรียมน้ำยาทดสอบ

Acidified iodoplatinate solution⁽¹⁴⁾

ละลาย platinic chloride 0.25 กรัม และ potassium iodide 5.0 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตรและเติม hydrochloric acid 5 มิลลิลิตร

Formaldehyde-sulfuric acid⁽¹⁴⁾

เปิด formaldehyde solution 6 มิลลิลิตร ลงใน concentrated sulfuric acid 4 มิลลิลิตร ช้า ๆ โดยให้ปลายปิเปตจุ่มในชั้นกรด เขย่าให้เข้ากันและวางให้เย็น สารละลายที่เตรียมได้จะใส แต่ถ้าวางทิ้งไว้นานเกิน 1 ชั่วโมง สารละลายจะเริ่มขุ่นให้ไปอังความร้อนใน water bath จนสารละลายใส ก่อนการใช้งาน

วิธีทดสอบ

1. การทดสอบปฏิกิริยาการเกิดสี ด้วยน้ำยา Formaldehyde-sulfuric acid⁽¹⁴⁾

นำตัวอย่าง 20 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลอง เติม formaldehyde-sulfuric acid 1 มิลลิลิตร เขย่า และนำไปอังความร้อนใน water bath ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที สังเกตสีที่เกิดขึ้นด้วยตาเปล่า

2. การทดสอบด้วยโครมาโตแกรมชนิดผิวบาง (Thin-Layer Chromatography, TLC)⁽¹³⁾

การเตรียมตัวอย่าง นำตัวอย่าง 300 มิลลิกรัม ละลายน้ำ 5 มิลลิลิตร สกัดด้วย chloroform ครั้งละ 10 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง กรองและแยกชั้น chloroform ไประเหยแห้งในตู้ดูดควัน

นำสารสกัดตัวอย่างที่ได้ละลายด้วย ethanol 1 มิลลิลิตร และสารละลายมาตรฐานฟิनाซีแพม ไนเมตาซีแพม ไนตราซีแพม และไดอาซีแพมใน ethanol ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แยกแต้มสารละลายตัวอย่างและสารมาตรฐานแต่ละชนิด บนแผ่น TLC ปริมาตร 10 ไมโครลิตร โดยใส่ในแท่งที่มีวัฏภาคเคลื่อนที่ 2 ระบบ ประกอบ

ด้วย n-heptane : chloroform : ethanol (50 : 50 : 10) และ n-hexane : 2-propanol : ammonia solution (60 : 40 : 5) แล้วนำไปตรวจสอบด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และใช้น้ำยาฟ้น acidified iodoplatinate solution สังเกตตำแหน่งและการติดสีของสารมาตรฐานและตัวอย่าง บันทึกค่า retardation factor (Rf) และภาพโครมาโตแกรมที่เกิดขึ้น

3. การทดสอบด้วยอัลตราไวโอเล็ตสเปกโตรโฟโตเมทรี (UV Spectrophotometry)⁽¹²⁾

เตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับการทดสอบด้วย TLC นำสารสกัดที่ได้ละลายด้วย ethanol ประมาณ 1 มิลลิลิตร และสารละลายมาตรฐานฟินาซีแพม ใน ethanol ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างละประมาณ 10 ไมโครลิตร แยกเจือจางในสารละลาย 0.1 M HCl และ ethanol 10 มิลลิลิตร กรองสารละลายแล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 200-400 นาโนเมตร ให้ได้สเปกตรัมที่ชัดเจน และควรมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดในช่วง 0.2-1.0 เปรียบเทียบลักษณะสเปกตรัมและความยาวคลื่นสูงสุด ที่ได้จากตัวอย่างและสารมาตรฐาน ในตัวทำละลายแต่ละชนิด

4. การทดสอบด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (GC-MS)^(12, 13)

เตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับการทดสอบด้วย TLC นำสารสกัดที่ได้ละลายด้วย ethanol ประมาณ 5 มิลลิลิตร และสารละลายมาตรฐานฟินาซีแพมใน ethanol ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมครอน นำไปฉีดตามสภาวะที่กำหนด เปรียบเทียบค่า retention time และรูปแบบ แมสสเปกตรัมของตัวอย่าง กับสารมาตรฐานฟินาซีแพม

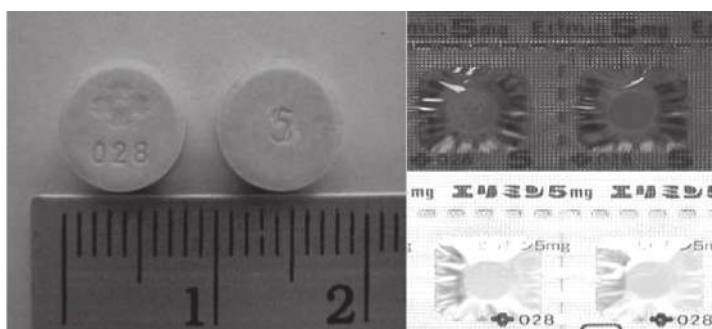
5. การทดสอบด้วยอินฟราเรดสเปกโตรเมทรี (IR Spectrometry)^(12, 13)

เตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับการทดสอบด้วย TLC นำสารสกัดที่ได้ซึ่งอยู่ในสภาพแห้ง และสารมาตรฐาน ฟินาซีแพมประมาณ 5 มิลลิกรัม แยกบดผสมกับ Potassium Bromide อัตราส่วน 1:10 วิเคราะห์ด้วย Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่วัดความเข้มของแสงที่ผ่านสาร (transmittance) ในช่วงเลขคลื่น 400-4000 cm^{-1} เปรียบเทียบลักษณะของสเปกตรัมของตัวอย่างกับสารมาตรฐานฟินาซีแพม

ผล

1. ลักษณะตัวอย่าง

เม็ดกลมแบนสีส้มอ่อน ด้านหนึ่งมีสัญลักษณ์เฉพาะ และตัวเลข 028 อีกด้านหนึ่งมีเลข 5 แบ่งบรรจุแผงพลาสติกใสสีแดง-อะลูมิเนียม แผงละ 10 เม็ด บนแผงแจ้ง Erimin 5® (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 ลักษณะตัวอย่างของกลางฟินาซีแพม

2. การทดสอบปฏิกิริยาการเกิดสี ด้วยน้ำยา formaldehyde-sulfuric acid

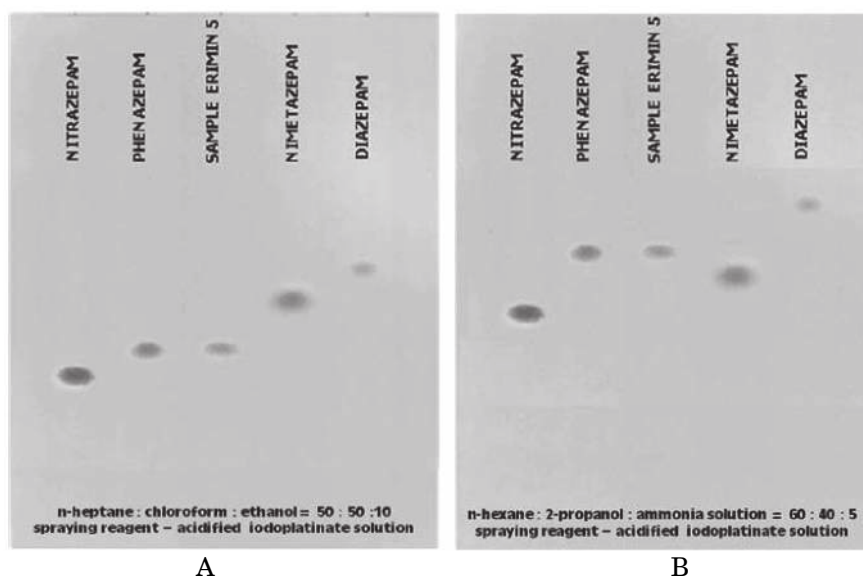
ตัวอย่างยาฟีนาซีแพมให้สารละลายใส สีส้ม เมื่อทดสอบด้วยน้ำยา formaldehyde-sulfuric acid เช่นเดียวกับสารมาตรฐานฟีนาซีแพม (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 สีของตัวอย่างและสารมาตรฐานฟีนาซีแพม เมื่อทดสอบด้วย formaldehyde-sulfuric acid

3. การทดสอบด้วยเทคนิคโครมาโตแกรมชนิดผิบบาง (TLC)

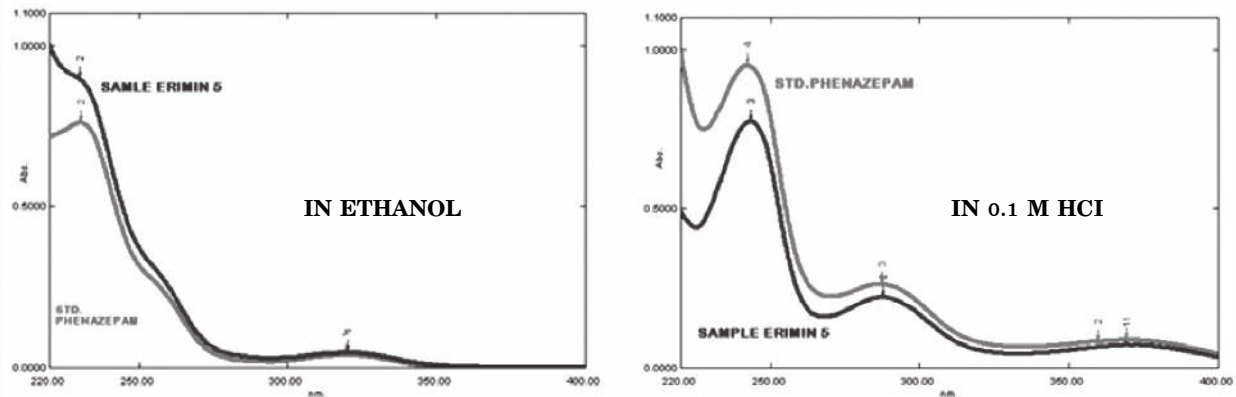
ตัวอย่างยาฟีนาซีแพมให้ตำแหน่งและติดสีม่วงน้ำตาลเมื่อตรวจสอบด้วยน้ำยาพ่น Acidified iodoplatinate solution เช่นเดียวกับสารมาตรฐานฟีนาซีแพม (ภาพที่ 4) โดยมี R_f เท่ากับ 0.44 และ 0.71 ในวัฏภาคเคลื่อนที่ (A) n-heptane : chloroform : ethanol (50 : 50 : 10) และ (B) n-hexane : 2-propanol : ammonia solution (60 : 40 : 5) ตามลำดับ



ภาพที่ 4 โครมาโตแกรมของตัวอย่างเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานฟีนาซีแพมในน้ำยาอิมมัลชันของ (A) n-heptane : chloroform : ethanol (50 : 50 : 10) (B) n-hexane : 2-propanol : ammonia solution (60 : 40 : 5) ตรวจสอบด้วยน้ำยาพ่น acidified iodoplatinate solution

4. การทดสอบด้วยอัลตราไวโอเลตสเปกโตรโฟโตเมทรี (UV Spectrophotometry)

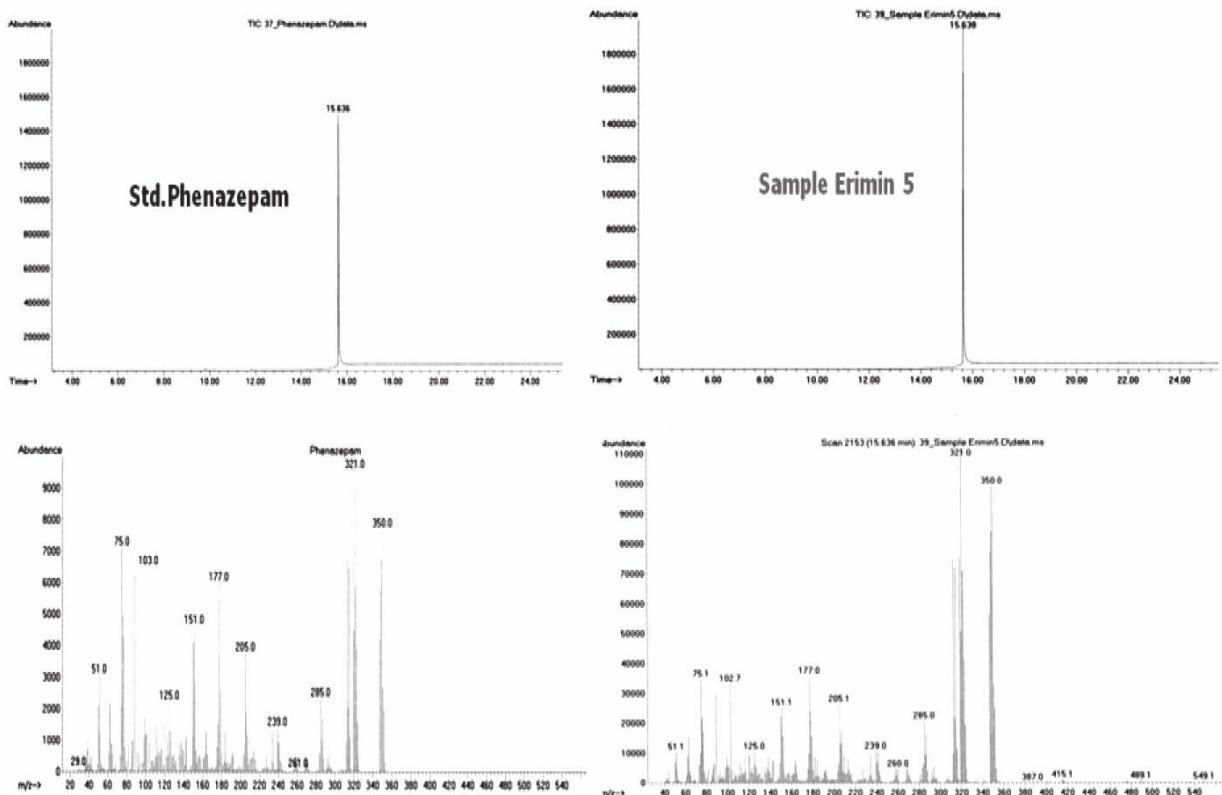
ตัวอย่างยาฟินาซีแพมให้สเปกตรัมที่มีความยาวคลื่นสูงสุด 323 นาโนเมตรใน ethanol และมีความยาวคลื่นสูงสุด 243, 287 และ 370 นาโนเมตร ใน 0.1 M HCl เช่นเดียวกับสารมาตรฐาน (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 สเปกตรัมของตัวอย่างเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานฟินาซีแพมใน Ethanol และ 0.1 M HCl

5. การทดสอบด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (GC-MS)

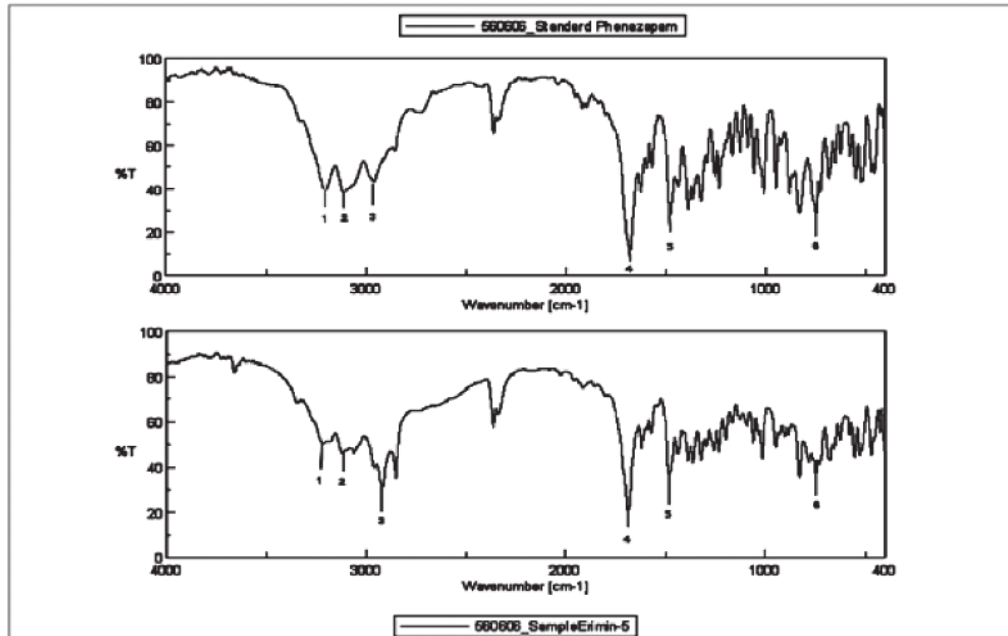
ตัวอย่างยาฟินาซีแพมให้พีคที่มีค่า retention time ที่ 15.6 นาที และแมสสเปกตรัมที่ 321, 350, 177, 75, 103 m/z เช่นเดียวกับสารมาตรฐาน (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 GC chromatogram และ Mass spectrum ของตัวอย่างเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานฟินาซีแพม

6. การทดสอบด้วยอินฟราเรดสเปกโตรเมทรี (IR Spectrometry)

ตัวอย่างยาฟินาซีแพมให้สเปกตรัมที่เลขคลื่น 3208, 3109, 2954, 1680, 1479, 748 cm^{-1} เช่นเดียวกับสารมาตรฐาน (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 IR-spectrum ของตัวอย่างและสารมาตรฐานฟินาซีแพม

วิจารณ์

Erimin 5[®] เป็นชื่อการค้า ซึ่งมักมีตัวยาลำคัญคือ ไนเมตาซีแพม (Nimetazepam) เป็นสารในกลุ่มเบนโซไดอะซีปีนส์ และเป็นยาที่ใช้ทางการแพทย์เฉพาะในประเทศญี่ปุ่นใช้ลดอาการวิตกกังวล ในประเทศไทยจัดไนเมตาซีแพมเป็นวัตถุออกฤทธิ์ในประเภท 2⁽¹⁵⁾ และยังไม่มีการใช้ยานี้ในทางการแพทย์ พบการนำไปใช้ในทางที่ผิดมากในประเทศมาเลเซียและภาคใต้ของประเทศไทย

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างของกลางที่ได้รับตรวจไม่พบไนเมตาซีแพม แต่พบฟินาซีแพมซึ่งคาดว่าเป็นการตรวจพบฟินาซีแพมครั้งแรกในประเทศไทย และเป็นการนำฟินาซีแพมมาผลิตเป็นยา Erimin 5[®] อาจเพื่อหลีกเลี่ยงข้อกฎหมาย เนื่องจากไนเมตาซีแพมมีการควบคุมที่เข้มงวดกว่า

จากการทดสอบตัวอย่างพบลักษณะภายนอกและสัญลักษณ์เม็ดยาเหมือนยา Erimin 5[®] ที่มีไนเมตาซีแพมเป็นส่วนประกอบ ผลการทดสอบปฏิกิริยาการเกิดสีด้วยน้ำยาทดสอบ formaldehyde-sulfuric acid ได้สีส้ม จึงคาดว่าน่าจะเป็นสารในกลุ่มเบนโซไดอะซีปีนส์ เนื่องจากสารกลุ่มเบนโซไดอะซีปีนส์จะให้สีส้มกับน้ำยาทดสอบนี้รวมทั้งฟินาซีแพมและไนเมตาซีแพม เมื่อทดสอบตัวอย่างด้วยโครมาโตแกรมชนิดผิวนาง ที่มีวัฏภาคเคลื่อนที่ 2 ระบบพบว่าตัวอย่างมีค่า R_f ไม่ตรงกับสารมาตรฐานไนเมตาซีแพม โดยค่า R_f คือ อัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่ต่อระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ เป็นค่าคงที่สำหรับสารแต่ละชนิดในสภาวะการทดสอบเดียวกัน การสรุปว่าสารมาตรฐานและตัวอย่างเป็นสารชนิดเดียวกัน จะต้องมีตำแหน่งและการติดสีเช่นเดียวกันในวัฏภาคเคลื่อนที่ทั้ง 2 ระบบ การทดสอบด้วยเทคนิคอัลตราไวโอเลตสเปกโตรโฟโตเมทรี ตัวอย่างให้สเปกตรัมที่มีลักษณะและความยาวคลื่นสูงสุดไม่ตรงกับสารมาตรฐานไนเมตาซีแพม ซึ่งให้สเปกตรัมที่มีความยาวคลื่นสูงสุดใน 0.1 M HCl ที่ 282 nm และใน

ethanol ที่ 220, 259 และ 309 nm⁽¹⁶⁾ ลักษณะสเปกตรัมและค่าความยาวคลื่นสูงสุดเป็นคุณสมบัติเฉพาะของสารแต่ละชนิด การสรุปว่าตัวอย่างและสารมาตรฐานเป็นสารชนิดเดียวกัน จะต้องมียุทธศาสตร์ลักษณะเดียวกัน และมีค่าความยาวคลื่นสูงสุดในตัวทำละลายชนิดเดียวกันต่างกันไม่เกิน 3 นาโนเมตร และเมื่อวิเคราะห์ต่อไปด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี เพื่อตรวจสอบว่าเป็นสารชนิดใด อาศัยหลักการของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีเพื่อแยกองค์ประกอบของสารผสม โดยเปลี่ยนให้เป็นไอที่อุณหภูมิหนึ่ง แล้วผ่านเข้าไปในคอลัมน์ และอาศัยความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของแต่ละองค์ประกอบของสารในคอลัมน์ ภายใต้การพาของแก๊สเฉื่อย ทำให้แต่ละองค์ประกอบของสารจะเคลื่อนที่ผ่านด้วยเวลาที่แตกต่างกัน จากนั้นโมเลกุลของสารในแต่ละองค์ประกอบเข้าสู่เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ และได้รับพลังงานเพื่อทำให้เกิดการแตกตัวในรูปประจุ รูปแบบการแตกตัวของแต่ละโมเลกุล หรือแมสสเปกตรัมเป็นลักษณะเฉพาะของสารแต่ละชนิด การสรุปว่าสารมาตรฐานและตัวอย่างเป็นสารชนิดเดียวกันจะต้องมี retention time ใกล้เคียงกัน และมีรูปแบบแมสสเปกตรัมเช่นเดียวกัน จากข้อมูลการตรวจวิเคราะห์เมื่อเปรียบเทียบกับรูปแบบแมสสเปกตรัมกับฐานข้อมูล NIST (The National Institute of Standards and Technology) แล้วพบว่ารูปแบบแมสสเปกตรัมของตัวอย่างตรงกับฟินาซีแพม และได้ทำการยืนยันผลอีกครั้งโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานฟินาซีแพม พบว่าตัวอย่างให้ผลการทดสอบตรงกันสารมาตรฐานฟินาซีแพมในทุกเทคนิคข้างต้น ทั้งนี้ได้วิเคราะห์ตัวอย่างด้วยอินฟราเรดสเปกโตรเมตรีเพิ่มเติม โดยแสงอินฟราเรดทำให้เกิดการสั่นสะเทือนของพันธะภายในโมเลกุล เกิดการดูดกลืนแสงบางส่วน ส่วนแสงที่ไม่ถูกดูดกลืนจะผ่านเข้าสู่เครื่องวัด แปลงสัญญาณเป็นสเปกตรัม ที่เป็นค่าเฉพาะของโมเลกุล ซึ่งนำมาใช้ประกอบการพิจารณาโครงสร้างของโมเลกุลได้ พบรูปแบบสเปกตรัมของตัวอย่างตรงกับสารมาตรฐานฟินาซีแพมเช่นเดียวกัน จากข้อมูลทั้งหมดจึงสามารถสรุปได้ว่าตรวจพบฟินาซีแพมในตัวอย่างของกลาง

การตรวจพิสูจน์และยืนยันตัวอย่างของกลางฟินาซีแพมในครั้งนี้ มีข้อจำกัดหลายประการเนื่องจากเป็นสารที่ไม่เคยพบการแพร่ระบาดในประเทศไทย เอกสารที่เกี่ยวข้องบางส่วนเป็นภาษารัสเซีย เป็นยาที่มีการใช้ในวงจำกัด การจัดหาสารมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบ ไม่สามารถจัดหาได้ทันที เนื่องจากการควบคุมทางกฎหมายเข้มงวดทั้งในและนอกประเทศ นอกจากนี้ยังมีราคาแพง รวมทั้งมีสารในกลุ่มเบนโซไดอะซีนจำนวนมากและมีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกัน ดังนั้นการวิเคราะห์โดยใช้หลายเทคนิคร่วมกัน เช่น การทดสอบปฏิกิริยาการเกิดสีเพื่อให้ทราบว่าเป็นยาในกลุ่มเบนโซไดอะซีนส์ ร่วมกับการทดสอบด้วยโครมาโตแกรมชนิดผิวน้ำ และแก๊สโครมาโทกราฟีเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน หรือการทดสอบด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี เปรียบเทียบ retention time และรูปแบบแมสสเปกตรัมกับสารมาตรฐาน เพื่อยืนยันผลจึงมีความสำคัญ และนำมาประกอบกับข้อมูลอื่น ๆ เช่น ลักษณะตัวอย่าง รูปแบบการเสพ รายงานการนำมาใช้ในทางที่ผิดในต่างประเทศ จึงทำให้สามารถสรุปได้ว่าตัวอย่างของกลางเป็นฟินาซีแพม

ฟินาซีแพมมีการใช้ทางที่ผิดสูงและพบรายงานการเสียชีวิตจากการใช้ยาเกินขนาดในประเทศต่าง ๆ เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่ถึงอย่างไรก็ตามก็ยังไม่มีการควบคุมฟินาซีแพมตามอนุสัญญาว่าด้วยวัตถุที่ออกฤทธิ์ที่ออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาท ค.ศ. 1971 (Convention on Psychotropic Substances, 1971) และอนุสัญญาเดี่ยวว่าด้วยยาเสพติดให้โทษ ค.ศ. 1961 (Single Convention on Narcotic Drugs, 1961) การควบคุมฟินาซีแพมมีความแตกต่างกันในแต่ละประเทศ เช่น สหพันธรัฐรัสเซียจัดเป็นยาที่ต้องจ่ายโดยมีใบสั่งแพทย์ สหรัฐอเมริกายังไม่มีการควบคุมตาม Controlled Substances Act ซึ่งเป็นกฎหมายของรัฐบาลกลาง (Federal Law) แต่มีเพียง 2 รัฐ คือ ลุยเซียนา (Louisiana) และอาร์คันซอ (Arkansas) ประกาศควบคุมเป็น Schedule I เนื่องจากมีการนำไปใช้ในทางที่ผิดสูงและไม่มีการใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ สหราชอาณาจักรควบคุมเป็น Class C ใน The Misuse of Drugs Act 1971 (Amendment) order 2012 เมื่อวันที่ 13 มิถุนายน พ.ศ. 2555 กลุ่มประเทศในสหภาพยุโรป (EU) ได้มีการควบคุมในบางประเทศ เช่น เอสโตเนีย ลัตเวีย ลิทัวเนีย มอลโดวา นอร์เวย์ สวีเดน ไอร์แลนด์ รวมทั้งหลายประเทศในแถบยุโรป⁽²⁾ ในประเทศไทยยังไม่มี การควบคุมทางกฎหมายและยังไม่รับรองให้ใช้ในทางการแพทย์

ทั้งนี้กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ซึ่งมีบทบาทในการเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของยาเสพติดชนิดใหม่ และแจ้งหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง ได้นำเสนอข้อมูลการตรวจพิสูจน์พบฟิनाซีแอมที่ตรวจพบนี้ เพื่อเป็นข้อมูลประกอบการพิจารณา กำหนดมาตรการทางกฎหมายควบคุมการแพร่ระบาด สุดท้ายคณะกรรมการวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาทได้มีมติให้ประกาศควบคุมฟิनाซีแอมเป็นวัตถุออกฤทธิ์ในประเภท 1 ลำดับที่ 21 ตามพระราชบัญญัติวัตถุที่ออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาท พ.ศ. 2518 ประกาศ ณ วันที่ 29 มีนาคม พ.ศ. 2556 เนื่องจากมีแนวโน้มการนำไปใช้ในทางที่ผิดสูง และไม่มีการใช้ในทางการแพทย์ ทั้งนี้ได้มีการพิจารณาฟิनाซีแอมในการประชุม WHO Expert Committee on Drug Dependence (ECDD) ครั้งที่ 37 วาระที่ 5.8 ที่เจนีวา สวิตเซอร์แลนด์ ในระหว่างวันที่ 16-20 พฤศจิกายน พ.ศ. 2558 เพื่อพิจารณาให้ความเห็นต่อปัญหาการใช้ฟิनाซีแอมในทางที่ผิดในหลายประเทศ และได้นำเสนอข้อสรุปในที่ประชุมต่อสหประชาชาติ เพื่อพิจารณาประกาศควบคุมทางกฎหมายระหว่างประเทศต่อไป

สรุป

ข้อมูลการตรวจพิสูจน์แสดงขั้นตอนและเทคนิควิธีตรวจพิสูจน์ต่างๆ ในหลายเทคนิคที่นำไปสู่การยืนยันเอกลักษณ์ของสารฟิनाซีแอมในของกลาง สถานตรวจพิสูจน์ยาเสพติดสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลประกอบในการตรวจพิสูจน์ เพื่อให้สามารถตรวจพิสูจน์และรายงานผลได้อย่างถูกต้องและรวดเร็วทันต่อเวลา

เอกสารอ้างอิง

1. Maskell PD, De Paoli G, Nitin SL, Pounder DJ. Phenazepam: the drug that came in from the cold. *J Forensic Leg Med* 2012; 19(3): 122-5.
2. Expert peer review no.1, Agenda item 5.8: phenazepam. In: WHO. Expert committee on drug dependence thirty-seventh meeting. 16-20 Nov 2015. Geneva: World Health Organization; 2015.
3. Expert peer review no.2, Agenda item 5.8: phenazepam. In: WHO. Expert committee on drug dependence thirty-seventh meeting. 16-20 Nov 2015. Geneva: World Health Organization; 2015.
4. Drug-Forum. The dangers of phenazepam. [online]. 2010 [cited 2015 Nov 18]; [4 screens]. Available from: URL: <http://www.drugs-forum.com/forum/showwiki.php?title=Phenazepam>
5. Advisory Council on the Misuse of Drugs. Phenazepam advice. [online]. 2011 [cited 2015 Oct 18]; [4 screens]. Available from: URL: https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/119184/acmd-advice-phenazepam.pdf
6. Bailey K, Richards-Waugh L, Clay D, Gebhardt M, Mahmoud H, Kraner JC. Fatality involving the ingestion of phenazepam and poppy seed tea. *J Anal Toxicol* 2010; 34(8): 527-32.
7. Lillsunde P, Gunnar T. Drugs and driving: the finnish perspective. *Bull Narc* 2005; 57(1-2): 213-29.
8. Maskell PD, Paoli GD, Seetohul LN, Pounder DJ. Phenazepam is currently being misused in the UK. *BMJ* 2011; 343: d4207.
9. Drug Enforcement Administration. Phenazepam [online]. 2014 [cited 2015 Oct 18]; [1 screen]. Available from: URL: http://www.deadiversion.usdoj.gov/drug_chem_info/phenazepam.pdf
10. Couch RA, Madhavaram H. Phenazepam and cannabinomimetics sold as herbal highs in New Zealand. *Drug Test Anal* 2012; 4(6): 409-14.
11. กองควบคุมวัตถุเสพติด สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. Nimetazepam. [ออนไลน์]. 2555; [สืบค้น 5 เม.ย. 2559]; [1หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <http://narcotic.fda.moph.go.th/welcome/?p=2791>
12. Part III B-method of analysis/drug identification. In: Scientific working group for the analysis of seized drugs (SWGDRUG) recommendations. 6th ed. SWGDRUGS; 2011. 14-16.

13. Recommended methods for the identification and analysis of barbiturates and benzodiazepines under international control. New York: United Nations; 2012. 25-35.
14. Clarke's analysis of drugs and poisons: in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. 4th ed. London: Pharmaceutical Press; 2011. 478.
15. พระราชบัญญัติวัตถุที่ออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาท พ.ศ. 2518 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ระบุชื่อและจัดแบ่งประเภทวัตถุออกฤทธิ์ (เพิ่มเติม). ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 130 ตอนพิเศษ 54 ง (ลงวันที่ 30 เมษายน 2556).
16. Phanburananont B. Qualitative analysis of benzodiazepines (SOP No. 2202113). 2nd ed. Nonthaburi: Bureau of Drug and Narcotic, Department of Medical Sciences; 2014.

Identification of a Newfound Sedative Drug of Abuse in Thailand: Phenazepam in Seized Material

**Napapha Sirisupakritkul Chompoonut Nutsathapana
and Bongkot Phanburananont**

*Bureau of Drug and Narcotic, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi
11000, Thailand.*

ABSTRACT Department of Medical Sciences (DMSc) provides analytical testing to support law enforcement and conducts surveillance for drug abuse in Thailand. According to our analytical database, majority of drugs of abuse are benzodiazepines. In 2013, DMSc received seized material of light-orange, flat and round tablets, imprinted with “Erimin 5”. Erimin 5 is a brand name of benzodiazepine drug generally containing nimetazepam. The analytical testing of the seized tablets found no nimetazepam but further laboratory investigations revealed that the tablets contained phenazepam. The detection of phenazepam this time could be considered as a newfound drug of abuse in Thailand. Phenazepam is a potent and long acting benzodiazepine. It can be purchased on the internet and became drug misuse in Europe and USA. Many deaths caused by phenazepam have been reported. Phenazepam has not been scheduled as a controlled substance in the United Nation Convention Psychotropic Substances, nor in several countries including Thailand. It was suspected that phenazepam was used to replace nimetazepam in Erimin 5 tablets in order to avoid law enforcement. The purpose of this research is to present stepwise analytical techniques that lead to the identification of phenazepam in seized material. DMSc informed about this newfound sedative drug of abuse to the relevant authorities for further appropriate action. Consequently, the National Psychotropic Substance Control Committee had declared phenazepam as a Category I Controlled Psychotropic Substance according to the Thailand Psychotropic Substances Act B.E. 2518.

Key words: Phenazepam, Erimin 5, Drug of Abuse, Thailand, Psychotropic substances

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	Apichai Mongkol	Jureporn Boonyawongvirot
	Varunee Jinaratana	Phichet Banyati
Technical Advisor	Prasert Thongcharoen	Panadda Silva
	Amara Vongbuddhapitak	Mayura Kusum
	Jongdee Wongpinairat	Pimjai Naigowit
	Supatra Im-Erb	Sumol Pavittranon
Editor	Teeranart Jivapaisarnpong	
Assistant Editor	Laojana Chowanadisai	
Editorial Board	Prasert Auewarakul	Orasa Suthienkul
	Pilaipan Puthavathana	Punnee Pitisuttithum
	Pintip Pongpech	Suchada Chaisawadi
	Danai Tiwawech	Suwanna Charunut
	Hansa Chaivanit	Pathom Sawanpanyalert
	Duanthanorm Promkhatkaew	Punthip Teeyapant
	Salakhit Chutipongvivate	Usavadee Thavara
	Busarawan Sriwanthana	Siri Srimanoroth
	Kanokporn Atisook	Wichuda Jariyapan
	Supanee Duangteraprecha	
Administration	Namfon Noiprasert	
	Prasan Julwong	
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	Aroonkarnphim Ltd., Part.	
	457/6-7 Phra Sumen Road, Bangkok 10200 Tel. 0-2282-6033-4	



มุ่งมั่นพัฒนา คำนึงวิจัย จับไวบริการ มาตรฐานสากล

www.dmsc.moph.go.th