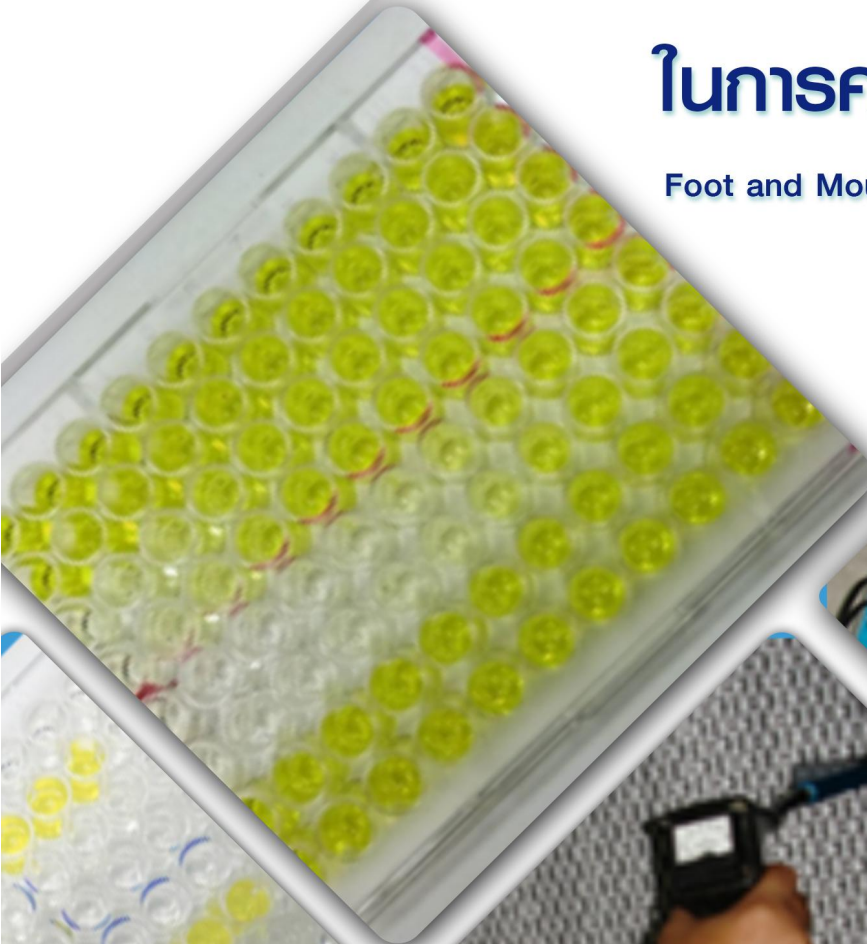




โรคปากและเท้าเปื่อย และการเตรียมความพร้อม ของห้องปฏิบัติการ ในการควบคุมและป้องกันโรค

Foot and Mouth disease and laboratory preparedness
for control and prevention

ISBN 978-616-582-063-9



นายสัตวแพทย์ร่มพฤษ อุดล

ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้
กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

โรคปากและเท้าเปื่อยและการเตรียมความพร้อม ของห้องปฏิบัติการในการควบคุมและป้องกันโรค

Foot and Mouth disease and laboratory preparedness
for control and prevention

ISBN 978-616-582-063-9

ชื่อหนังสือ : โรคปากและเท้าเปื่อยและการเตรียมความพร้อมของห้องปฏิบัติการในการควบคุมและป้องกันโรค
Foot and Mouth disease and laboratory preparedness for control and prevention

จัดทำโดย : นายสัตวแพทย์ร่มพฤษ อุดล
ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้
กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ครั้งที่พิมพ์ : ครั้งที่ 1 จำนวน 50 เล่ม

ปีที่พิมพ์ : พ.ศ. 2564

พิมพ์ที่ : บริษัท บียอนด์ พับลิชชิง จำกัด

คำนำ

คู่มือโรคปากและเท้าเปื่อยและการเตรียมความพร้อมของห้องปฏิบัติการในการควบคุมและป้องกันโรคฉบับนี้ ผู้เขียนรวบรวมข้อมูลจากงานประจำ งานวิจัยและเอกสารทางวิชาการทั้งในและต่างประเทศ รวมทั้งประสบการณ์ของผู้เขียน นำมาเรียบเรียงความรู้เกี่ยวกับโรคปากและเท้าเปื่อย โดยแบ่งเป็นความรู้ด้านการตรวจโรคปากและเท้าเปื่อย และการเตรียมความพร้อมของห้องปฏิบัติการในสนับสนุนการควบคุมและป้องกันโรค เพื่อให้เข้าใจระบบการทำงานของห้องปฏิบัติการในการเตรียมความพร้อมเมื่อเกิดโรคปากและเท้าเปื่อยระบาดในประเทศ ผู้เขียนหวังเป็นอย่างยิ่งว่าคู่มือเล่มนี้ จะมีประโยชน์ต่อบุคลากรในวงการปศุสัตว์และผู้สนใจทั่วไป ได้มีความรู้ความเข้าใจในจุดประสงค์ของงานทดสอบโรคปากและเท้าเปื่อยแต่ละวิธี รวมทั้งเข้าใจในวิธีการเมื่อเกิดโรคระบาดที่นำมาปฏิบัติเพื่อช่วยควบคุมและป้องกันโรค

ผู้เขียนขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ผู้บังคับบัญชาทุกท่านที่ผ่านมาจนถึงปัจจุบัน ตลอดจนที่เคยถ่ายทอดความรู้และสนับสนุนการอบรม ปรึกษาเพื่อหาความรู้ใหม่ ผู้เกษียณอายุราชการทุกท่าน ที่ได้ให้คำแนะนำ และมีส่วนช่วยให้คู่มือฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

ร่มพฤกษ์ อุดล

สารบัญ

บทที่ 1	ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับ FMD	1
บทที่ 2	ความรู้ทั่วไปด้านการตรวจ FMD	4
บทที่ 3	การเตรียมความพร้อมด้านการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติ ของแอนติเจนทางซีรัมวิทยาของ FMDV (r-value) (OIE, 2019)	8
บทที่ 4	การเตรียมความพร้อมด้านการผลิตสารตรวจสอบทาง ELISA สำหรับ FMD	15
บทที่ 5	การเตรียมความพร้อมของอาคารห้องปฏิบัติการที่มี ความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 3 สำหรับตรวจวินิจฉัย FMD	19
บรรณานุกรม		28
ภาคผนวก		31
	- การเตรียมตัวอย่างสารละลายแขวนลอยสำหรับตรวจแอนติเจน	31
	- การตรวจหาและจำแนกซีโรไทป์ FMDV โดยวิธี ELISA typing	31
	- การเพาะแยกเชื้อและเพิ่มปริมาณเชื้อ FMDV (virus isolation)	32
	- การทดสอบระดับของแอนติเจน (antigen titration)	32
	- การทดสอบหา r-value	33
	- การเตรียมอนุภาค 146S ไวรัสแอนติเจน	35

สารบัญรูป

รูปที่ 1	แสดงแผนภูมิชั้น working floor ของห้องปฏิบัติการ BSL-3	19
รูปที่ 2	แสดงวิธีการทดสอบ	36
รูปที่ 3	แสดงการผลิตสารตรวจสอบทาง ELISA สำหรับ FMD	38
รูปที่ 4	แสดงระบบหมุนเวียนอากาศ BSL-3	39
รูปที่ 5	แสดงการทดสอบและการทำให้ปราศจากเชื้อใน HEPA canister	39
รูปที่ 6	แสดงเครื่องนิ่งฆ่าเชื้อแบบ 2 ประตู	40
รูปที่ 7	แสดงการทวนสอบประสิทธิภาพการทำให้ปราศจากเชื้อ โดย biological test	41
รูปที่ 8	แสดงการเข้า BSL 3	41
รูปที่ 9	แสดงการออกจาก BSL 3	42
รูปที่ 10	แสดงการเปลี่ยนยาฆ่าเชื้อใน Dunk tank	42
รูปที่ 11	UV pass box	43
รูปที่ 12	decontamination chamber	44
รูปที่ 13	ระบบบำบัดน้ำเสีย	45

บทที่ 1

ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับ FMD

โรคปากและเท้าเปื่อย (Foot and Mouth Disease, FMD) เป็นโรคระบาดที่รุนแรง ติดต่อง่าย แพร่กระจายอย่างรวดเร็วในสัตว์กบฏ เช่น โค กระบือ แพะ แกะ สุกร และในสัตว์ป่ากับคู่อีกกว่า 70 ชนิด FMD เกิดจากเชื้อ Foot and Mouth Disease Virus (FMDV) มี 7 ซีโรไทป์ ได้แก่ โอ เอ ซี เซาท์แอฟริกันเทอริทอรี 1, 2, 3 และ เอเชียวัน ทั้งยังสามารถจำแนกเป็นไวรัสชนิดย่อยได้อีก 64 ชนิดย่อย ซีโรไทป์โอ มี 11 ชนิดย่อย เอ มี 32 ชนิดย่อย ซี มี 5 ชนิดย่อย เซาท์แอฟริกันเทอริทอรี 1 มี 6 ชนิดย่อย เซาท์แอฟริกันเทอริทอรี 2 มี 3 ชนิดย่อย เซาท์แอฟริกันเทอริทอรี 3 มี 4 ชนิดย่อย และเอเชียวัน มี 3 ชนิดย่อย นอกจากนี้ยังมีสายพันธุ์ใหม่ ๆ เกิดขึ้นอีกหลายสายพันธุ์ สัตว์ที่ป่วยเป็นโรคปากและเท้าเปื่อยจะมีไข้สูง ซึม น้ำลายไหล เกิดตุ่มใสที่ลิ้น เหงือก ภายในปาก กีบ ต้านนม กินอาหารไม่ได้ เดินขากะเผลก สัตว์เล็กอาจตายจากหัวใจล้มเหลวเฉียบพลัน เนื่องจากกล้ามเนื้อตายที่หัวใจ (tiger heart) FMD มีผลกระทบอย่างมากต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงปศุสัตว์ โดยเฉพาะการส่งออกสินค้าปศุสัตว์ เนื่องจากเป็นข้อกีดกันทางการค้าระหว่างประเทศ เมื่อมี FMD ระบาดจะทำให้ผลผลิตทางการปศุสัตว์ลดลง เช่น ผลผลิตน้ำนมโคจะลดลง ร้อยละ 33 ซึ่งอาจเกิดขึ้นในช่วงสั้น ๆ แต่บางครั้งในกรณีเรื้อรังอาจทำให้ผลผลิตน้ำนมรวมลดลงได้ถึงร้อยละ 80 ของผลผลิตในช่วงปกติ ในสุกรที่ติดเชื้อจะมีอัตราการเจริญเติบโตลดลงส่งผลให้ต้นทุนการผลิตสุกรซึ่งเป็นแหล่งอาหารโปรตีนที่สำคัญอีกหนึ่งแหล่งสำหรับมนุษย์สูงขึ้น นอกจากนี้ FMD อาจทำให้สัตว์ที่อุ้มท้องเกิดการแท้งลูก ประเทศที่ปลอดโรคจะใช้มาตรการควบคุมโรคด้วยการทำลายทิ้งทั้งสัตว์ที่ติดเชื้อและที่คาดว่า จะสัมผัสเชื้อทั้งหมด เพื่อคงสถานการณ์เป็นประเทศปลอดโรคไว้ เช่น เมื่อครั้งเกิดการระบาดที่ประเทศอังกฤษในปี ค.ศ. 2001 ก่อความสูญเสียทางเศรษฐกิจไปเป็นมูลค่า 11,600 ล้านดอลลาร์ มีสัตว์ถูกทำลาย 6.24 ล้านตัว และประเทศอังกฤษต้อง สูญเสียรายได้จากการท่องเที่ยวไปมากกว่า 4,000 ล้านดอลลาร์ และในปี ค.ศ. 2010 ประเทศญี่ปุ่นได้รับผลกระทบทางเศรษฐกิจจากการระบาดของ FMD เป็นมูลค่ามากกว่า 568 ล้านดอลลาร์ และมีสัตว์ถูกทำลาย 2.9 ล้านตัว การระบาดที่สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างมากแก่ทวีปเอเชียอีกครั้งเกิดที่ประเทศไต้หวันในปี ค.ศ. 1997 สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจเป็นมูลค่า 9,450 ล้านดอลลาร์ และต้องทำลายสัตว์ไปกว่า 4 ล้านตัว

ประเทศไทยเป็นพื้นที่ที่มีการระบาดของ FMD แบบประจำถิ่น มีรายงานการเกิดโรคอย่างต่อเนื่องตลอดทั้งปี ส่งผลกระทบอย่างรุนแรงทางเศรษฐกิจต่อเกษตรกร เนื่องจากมีสัตว์กบฏหลายชนิดจำนวนมากที่สามารถติดเชื้อไวรัส

และป่วยจากโรคนี้โดยเฉพาะสุกรและโคนม สัตว์ที่เป็น FMD แม้อัตราการตายต่ำ แต่การเจริญเติบโตช้า ผลผลิตน้ำนมลดลง ไม่สามารถเคลื่อนย้ายหรือขาย ผลผลิตได้ และยังก่อให้เกิดค่าใช้จ่ายจำนวนมากในการตรวจวินิจฉัยและการควบคุมและป้องกันโรค ทั้งจากค่าแรงงาน ค่าวัคซีน ยาฆ่าเชื้อ ซึ่งเป็นการเพิ่ม ต้นทุนการผลิตปศุสัตว์ทำให้เสียโอกาสในการพัฒนา ปศุสัตว์และลดความมั่นคงทางอาหาร (food security) และยังทำให้สูญเสียโอกาสของการเพิ่มศักยภาพการ แข่งขันในการผลิตเพื่อการค้าในตลาดระหว่างประเทศ ด้วย ถ้าสามารถควบคุม FMD ได้นอกจากจะลดความ สูญเสียผลผลิตจากการปศุสัตว์เนื่องจาก FMD แล้ว สิ่งที่มาคือเพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขัน ทางการค้า ทำให้สินค้าเกษตรมีราคาที่สูงขึ้น และสามารถส่งออกสินค้าเกษตรได้เพิ่มขึ้น

ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยภูมิภาคเอเชีย ตะวันออกเฉียงใต้ (ศออ.) สังกัดสถาบันสุขภาพสัตว์ แห่งชาติ เป็นหน่วยงานหลักของกรมปศุสัตว์ในการตรวจ FMD เพื่อสนับสนุนการควบคุมและป้องกันโรคให้แก่ เกษตรกร โดยงานทดสอบที่สำคัญอย่างหนึ่งคืองาน ทดสอบเพื่อคัดเลือกไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีน เนื่องจากเชื้อ FMDV เป็นเชื้อไวรัสที่มีสารพันธุกรรมชนิด RNA ที่มีความแปรปรวนสูงมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมาก และมีแอนติเจนใหม่ ๆ เกิดขึ้นบ่อยครั้ง การใช้วัคซีน ป้องกัน FMD หนึ่งซีโรไทป์ไม่สามารถป้องกันข้าม ซีโรไทป์ และอาจไม่ป้องกันสายพันธุ์อื่น ๆ ของซีโรไทป์ เดียวกัน วิธีการที่เชื่อถือได้และนิยมใช้ในการคัดเลือก ไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนคือพิจารณาหาความสัมพันธ์ ของแอนติเจนทางซีรัมวิทยาระหว่างเชื้อไวรัสในวัคซีน กับเชื้อไวรัสที่ระบาดในพื้นที่ (vaccine matching, r-value หรือ ค่า r) โดยการศึกษาเปรียบเทียบการ neutralize ของไวรัสทั้งสองกับซีรัมที่ได้มาจากสัตว์ที่ ได้รับไวรัสในวัคซีน ในช่วงเวลาที่ผ่านมาเชื้อ FMDV มีการเปลี่ยนแปลง r-value หลายครั้ง เช่นในระหว่างปี พ.ศ. 2550–2562 เชื้อ FMDV ซีโรไทป์ไทป์เอ เปลี่ยนแปลง r-value อยู่ระหว่าง 3 สายพันธุ์คือ

A/Saraburi/87, A/Sakolnakorn/97 และ A/Lopburi/ 2012 (Seeyo *et al.*, 2020) ทำให้กรมปศุสัตว์จำเป็นต้องเปลี่ยนไวรัสในวัคซีนให้ตรงกับเชื้อ FMDV ที่ ระบาดในพื้นที่เพื่อควบคุมโรค

เมื่อมีการระบาดของ FMD ในพื้นที่ ศออ. จะ ตรวจวินิจฉัยโรค โดยตรวจหาและจำแนกซีโรไทป์ของ FMDV หลังจากที่ทำทราบซีโรไทป์ไวรัสแล้ว ก็จะนำ ตัวอย่างดังกล่าวไปเพาะแยกเชื้อและเพิ่มปริมาณไวรัส และยืนยันผลจำแนกซีโรไทป์ซ้ำอีกครั้ง จากนั้นนำไป ทดสอบระดับของแอนติเจน ด้วยวิธี antigen titration กับแอนติซีรัมของกระต่ายและหนูตะเภาโดยใช้ไวรัสที่ ใช้ผลิตวัคซีนเป็นตัวควบคุมบวก เมื่อได้ระดับแอนติเจน ที่เหมาะสมแล้วจึงนำมาทดสอบหา r-value กับไวรัสที่ ใช้ผลิตวัคซีนว่ายังเหมาะสมครอบคลุมเชื้อไวรัสใน พื้นที่หรือไม่ ถ้าครอบคลุมก็ยังสามารถใช้ไวรัสที่ใช้ผลิต วัคซีนตัวเดิม ถ้าไม่ครอบคลุมก็จะพิจารณาเปลี่ยน ไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนเพื่อควบคุมและป้องกันโรคต่อไป ในกระบวนการที่กล่าวมา ศออ. จะต้องมีความพร้อมใน การที่จะทดสอบ r-value และต้องมีความพร้อมในงาน เพาะแยกเชื้อและเพิ่มปริมาณไวรัสที่ต้องทำในอาคาร ที่มีความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 3 (biosafety level 3 หรือ BSL-3) และเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของ เชื้อไวรัสในพื้นที่ ศออ. ต้องมีความพร้อมในการผลิต สารตรวจสอบสำหรับงานทดสอบ r-value รวมทั้งงาน ELISA อื่น ๆ

ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงได้จัดทำคู่มือที่มุ่งเน้นการ เตรียมความพร้อมของห้องปฏิบัติการในการควบคุม และป้องกัน FMD เมื่อมีการระบาดของ FMD ในท้องที่ โดยจะกล่าวถึงความรู้ทั่วไปด้านการตรวจ FMD ได้แก่ การตรวจแอนติเจนได้แก่เชื้อไวรัส การตรวจแอนติบอดี การตรวจหาลำดับเบสของสารพันธุกรรมของเชื้อ FMDV ด้วยวิธี nucleotide sequencing และการเตรียม ความพร้อมของห้องปฏิบัติการด้านอื่น ๆ เมื่อเกิดการ ระบาดของโรค ซึ่งประกอบด้วย การเตรียมความพร้อม ด้านการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของแอนติเจนทาง ซีรัมวิทยาของเชื้อไวรัส การเตรียมความพร้อมด้าน

การผลิตสารตรวจสอบ และเนื่องจาก FMD เป็นโรคที่แพร่กระจายง่าย สามารถแพร่กระจายทางอากาศ (airborne) จึงต้องมีการเตรียมความพร้อมของอาคารที่มีความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 3 ให้สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพตลอดเวลา ผลจากการเตรียมความพร้อมจะเป็นประโยชน์ต่อการคัดเลือกเชื้อไวรัสที่นำมาผลิตวัคซีนที่ครอบคลุมเชื้อไวรัสที่พบในพื้นที่ได้อย่างเหมาะสม เมื่อมีการระบาดของโรคในพื้นที่ คอ. สามารถให้ความร่วมมือในการควบคุมและป้องกันโรคระบาดได้ทันอย่างมีประสิทธิภาพ ลดความเสียหายของเกษตรกรจากการระบาดของโรค

คำนิยามต่าง ๆ

ไวรัสในพื้นที่ เป็นเชื้อไวรัสที่พบในสัตว์ที่เป็นโรคในพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทย

ไวรัสในวัคซีน เป็นเชื้อไวรัสที่ถูกพัฒนาในกระบวนการผลิตวัคซีนให้พร้อมที่จะนำมาเพิ่มปริมาณและผลิตวัคซีนได้ทันที

สัตว์อมโรค (Reservoir animals) หมายถึงสัตว์ที่ไม่แสดงอาการของโรคแต่มีการติดเชื้อแอบแฝง

แอนติเจน สารก่อภูมิคุ้มกัน คือสารใด ๆ ที่กระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบปรับตัว มักเป็นสารแปลกปลอมหรือเป็นพิษต่อร่างกาย ซึ่งอาจเป็นสารที่ถูกสร้างโดยร่างกายหรือรับมาจากภายนอกก็ได้ ในที่นี้แอนติเจนคือ เชื้อ FMDV

แอนติบอดี สารภูมิคุ้มกัน เป็นโปรตีนขนาดใหญ่ในระบบภูมิคุ้มกันที่ร่างกายมนุษย์หรือสัตว์ชั้นสูงอื่น ๆ สร้างขึ้นเพื่อตรวจจับและทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย เช่น แบคทีเรีย และไวรัส แอนติบอดีแต่ละชนิดจะจดจำโมเลกุลเป้าหมายที่จำเพาะ

แอนติซีรัม แอนติบอดีที่สัตว์สร้างขึ้นเมื่อได้รับเชื้อ (เชื้อในที่นี้หมายถึง FMDV)

BSL-3 ความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 3 (biosafety level 3, BSL-3) สามารถใช้ได้กับการวิจัย

และการทดลองเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค สิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม ประเภทที่ 3 โดยเป็นสิ่งมีชีวิตที่ก่อโรคร้ายแรงและมีโอกาสแพร่กระจายผ่านระบบทางเดินหายใจ ห้องปฏิบัติการที่มีระดับความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 3 เป็นระดับที่ประยุกต์เพื่องานวิจัยในเชิงการแพทย์ที่มีการทำงานกับเชื้อก่อโรค ที่อาจเป็นอันตรายถึงชีวิต มีห้องพิเศษที่มีระบบควบคุมการถ่ายเทอากาศแบบ negative pressure ซึ่งติดตั้งเครื่องกรอง HEPA (high efficiency particulate air filter) ผู้ปฏิบัติงานต้องได้รับการฝึกฝนเป็นพิเศษ ในเรื่องของอันตรายจากเชื้อก่อโรค หรืออันตรายจากสารเคมี การทำงานที่ต้องใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีความรุนแรงระดับ 3 ขึ้นไป ต้องทำในตู้ชีวนิรภัย หรือภาชนะที่ปลอดภัยหรือสวมเสื้อคลุมเพื่อป้องกัน

Lineage การจัดกลุ่มในการแบ่งการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ แต่เดิมการจัดแบ่งเป็นกลุ่มของวิธีนี้จะถูกเรียกว่า สายพันธุ์ (strain) ซึ่งบางครั้งอาจไปซ้ำซ้อนกับการแบ่งกลุ่มของ r-value ในช่วงหลายปีหลัง ห้องปฏิบัติการอ้างอิงโรคด้านโรคปากและเท้าเปื่อย (World Reference Laboratory for FMD, WRL) ที่เมือง Pirbright สหราชอาณาจักร จะใช้คำว่า lineage แทนคำว่าสายพันธุ์ในการแบ่งการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนั้นในนี้จะใช้คำว่า lineage แทนคำว่า สายพันธุ์ ในการแบ่งการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์

Neutralize เป็นปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกัน เมื่อทำปฏิกิริยากัน แอนติบอดีจะไปยับยั้งคุณสมบัติแอนติเจน (ในที่นี้หมายถึงเชื้อ FMDV) ทำให้เป็นกลางหรือหมดสภาพไป

r-value เป็นค่าที่บอกถึงการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของแอนติเจนทางซีรัมวิทยา

Strain สายพันธุ์ ในการจัดกลุ่มจากการเปลี่ยนแปลงของแอนติเจนทางซีรัมวิทยา

Topotype การเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อจัดกลุ่มเชื้อไวรัสที่ระบาดตามภูมิภาคที่เกิด

บทที่ 2

ความรู้ทั่วไปด้านการตรวจ FMD

การตรวจตัวอย่างทางห้องปฏิบัติการด้าน FMD (OIE, 2019) จะมีการตรวจอยู่ 2 ประเภทคือการตรวจแอนติเจน เป็นการตรวจหาแอนติเจนหรือเชื้อ FMDV ที่ทำให้เกิดโรคโดยตรง ซึ่งจะมีวิธีตรวจอยู่หลายวิธี ส่วนอีกประเภทคือการตรวจแอนติบอดี เป็นการตรวจระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ FMDV หรือตรวจหาสภาวะสัมผัสเชื้อในตัวอย่างซีรัม

2.1 การตรวจแอนติเจน

การตรวจแอนติเจนของเชื้อ FMDV เป็นการตรวจเชิงคุณภาพ โดยมีจุดประสงค์หลักในการตรวจหาและจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสในสิ่งส่งตรวจโดยตรง เมื่อสงสัยว่าสัตว์เป็น FMD จะมีการเก็บตัวอย่างส่งตรวจโรคทันที โดยจะเก็บตัวอย่างจาก เนื้อเยื่อลิ้น เหงือก เยื่อบุภายในปาก ไรกีบ ของ โค กระบือ แพะ แกะ สุกร หรือสัตว์อื่น ๆ ที่สงสัย ปริมาณอย่างน้อย 1 กรัม ใส่ใน 50% glycerine buffer (โดยไม่จำเป็นต้องแช่เย็น) ตัวอย่างเนื้อเยื่อสัตว์ที่ส่งมาจากพื้นที่จะถูกนำมาเตรียมให้เป็นสารละลายแขวนลอย 10% ใน 0.04M PBS และนำไปตรวจจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสโดยวิธี ELISA typing และ one-step multiplex RT-PCR พร้อมกับตรวจหาสารพันธุกรรม FMDV โดยวิธี real-time RT-PCR ถ้าสามารถจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสโดยวิธี ELISA typing หรือวิธี one-step multiplex RT-PCR ได้ ให้รายงานผลเป็นซีโรไทป์แต่ละชนิด แต่ถ้าการทดสอบไม่ได้ผลของซีโรไทป์ ก็จะรายงานผลในเบื้องต้นของวิธี real-time RT-PCR ว่าพบหรือไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อ FMDV ในขณะเดียวกันนำสารละลายแขวนลอยไปผ่านการเพาะแยกเชื้อและเพิ่มปริมาณของเชื้อไวรัส (virus isolation) ในเซลล์เพาะเลี้ยง และกลับมาตรวจจำแนกซีโรไทป์เพื่อยืนยันผลซ้ำด้วยวิธี ELISA typing จึงสิ้นสุดกระบวนการตรวจหาและจำแนกซีโรไทป์

จากนั้นห้องปฏิบัติการ จะสุ่มคัดเลือกตัวอย่างจากแต่ละพื้นที่และแต่ละชนิดสัตว์ เพื่อตรวจหาลำดับเบสของสารพันธุกรรมของเชื้อ FMDV ด้วยวิธี nucleotide sequencing เพื่อศึกษาทางระบาดวิทยาเชิงโมเลกุล (molecular epidemiology)

วิธีการทดสอบต่าง ๆ ในการตรวจแอนติเจนมีดังนี้

2.1.1 การตรวจหาและจำแนกชนิด FMDV โดยวิธี ELISA typing

เป็นการตรวจเชิงคุณภาพ เพื่อตรวจหาและจำแนกชนิดของเชื้อ FMDV ในเนื้อเยื่อสัตว์หรือสิ่งส่งตรวจอื่น ๆ ที่สงสัยว่าเป็น FMD โดยใช้วิธี indirect double antibody sandwich ELISA (IDAS ELISA)

วิธี ELISA typing สามารถตรวจได้ทั้งเชื้อไวรัสที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต เป็นวิธีที่มีความไวต่ำเมื่อเทียบกับวิธีทางชีวโมเลกุล บางครั้งต้องผ่านการเพาะแยกเชื้อและเพิ่มปริมาณของเชื้อไวรัสก่อนจึงจะทดสอบได้ผลดี

การแปลผล: อ่านผลเป็นไม่พบเชื้อ หรือพบเชื้อ FMDV พร้อมทั้งระบุซีโรไทป์โอ เอ หรือเอเชียวัน

ระยะเวลาในการทดสอบ: 1 วันทำการ ไม่รวมวันที่รับตัวอย่าง

2.1.2 การตรวจหาสารพันธุกรรมเพื่อจำแนกชนิด FMDV โดยวิธี one-step multiplex RT-PCR

เป็นการตรวจเชิงคุณภาพ เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อ FMDV ในเนื้อเยื่อสัตว์หรือสิ่งส่งตรวจอื่น ๆ ที่สงสัยว่าเป็น FMD วิธี one-step multiplex RT-PCR เป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นมาใช้ในประเทศ สามารถตรวจได้ทั้งเชื้อไวรัสที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต เป็นวิธีที่มีความไวสูงกว่าวิธี ELISA typing สามารถตรวจเชื้อไวรัสที่มีปริมาณน้อย ๆ ได้

การแปลผล: อ่านผลเป็นไม่พบเชื้อ หรือพบเชื้อ FMDV พร้อมทั้งระบุซีโรไทป์โอ เอ หรือเอเชียวัน

ระยะเวลาในการทดสอบ: 1 วันทำการ ไม่รวมวันที่รับตัวอย่าง

2.1.3 การเพาะแยกเชื้อและเพิ่มปริมาณ FMDV (virus isolation)

เป็นการตรวจเชิงคุณภาพ โดยการเพาะแยกเชื้อและเพิ่มปริมาณของเชื้อ FMDV ในเซลล์เพาะเลี้ยงทำให้เชื้อไวรัสในเนื้อเยื่อจากสัตว์ที่มีปริมาณน้อย ๆ สามารถเพิ่มปริมาณและนำไปทดสอบ

ยืนยันซีโรไทป์ด้วยวิธี ELISA typing หรือ one-step multiplex RT-PCR ได้ วิธี virus isolation ต้องใช้ไวรัสมีชีวิตรุนแรง เซลล์เพาะเลี้ยงสำหรับ FMDV ที่ศอ. เลือกใช้ได้แก่

- เซลล์ปฐมภูมิ (primary cell) เตรียมจากไตของลูกแกะ (primary lamb kidney cell) หรือเตรียมจากต่อมไทรอยด์ของโค (primary bovine thyroid cell) เป็นเซลล์ที่มีความไวสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ FMDV

- cell line เตรียมจากไตลูกหนูแฮมสเตอร์ (baby hamster kidney cell: BHK-cell) ซึ่งจะเพาะเลี้ยงเซลล์ให้เป็น monolayer

การแปลผล: ยืนยันผลการเกิดพยาธิสภาพของเซลล์ด้วยการตรวจแอนติเจนวิธีอื่น ๆ เช่น ELISA typing

ระยะเวลาในการทดสอบ: 3-14 วันทำการ ไม่รวมวันที่รับตัวอย่าง

2.1.4 การตรวจสอบสารพันธุกรรม FMDV โดยวิธี real-time RT-PCR

เป็นการตรวจเชิงคุณภาพ โดยตรวจหาสารพันธุกรรมหรือ viral RNA ของเชื้อ FMDV โดยใช้เทคนิค one-step real-time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (real-time RT-PCR) ในส่วน 3D gene จากตัวอย่างน้ำยาไวรัส (viral fluid) หรือสารละลายแขวนลอยที่ได้จากสิ่งส่งตรวจต่าง ๆ

วิธี real-time RT-PCR สามารถตรวจได้ทั้งไวรัสที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต เป็นวิธีที่มีความไวสูงมาก สามารถตรวจได้ว่าพบสารพันธุกรรมหรือไม่ แต่ยังไม่สามารถจำแนกซีโรไทป์ได้

การแปลผล: อ่านผลเป็นไม่พบ หรือพบสารพันธุกรรมของเชื้อ FMDV

ระยะเวลาในการทดสอบ: 1 วันทำการ ไม่รวมวันที่รับตัวอย่าง

2.1.5 การตรวจการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมของเชื้อ FMDV ด้วยวิธี nucleotide sequencing

เป็นการตรวจเชิงคุณภาพ เป็นการศึกษาการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของแอนติเจน หรือ nucleotide

sequence ทางระบาดวิทยาโมเลกุลของ FMDV เพื่อสืบหาต้นตอของการระบาด โดยจะจัด lineage และ topotype จากการเรียงตัวของสาย amino acid ว่ามีความเหมือนหรือแตกต่างกันเป็นตัวตัดสิน

FMDV ประกอบไปด้วยโปรตีนโครงสร้าง (structural protein, SP) จำนวน 4 ชนิดคือ VP1 (1D), VP2 (1B), VP3 (1C) และ VP4 (1A) เป็นรูปแบบ icosahedral capsid โดยที่โปรตีนชนิด VP1 ซึ่งจะเป็นส่วนที่มีการผันแปรมากที่สุด มีความจำเพาะต่อซีโรไทป์ และใช้ในการศึกษาวิวัฒนาการของ FMDV ดังนั้นการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่สร้างโปรตีนชนิด VP1 จึงจำเป็นและมีประโยชน์อย่างยิ่งในเชิงระบาดวิทยาเพื่อสืบหาแหล่งต้นทางของการระบาดของโรค

การแปลผล: อ่านผลเป็น FMDV พร้อมทั้งระบุซีโรไทป์โอ เอ หรือเอเชียวันและระบุว่ายู่ในกลุ่ม topotype และ lineage ไต

ระยะเวลาในการทดสอบ: 15 วันทำการ ไม่รวมวันที่รับตัวอย่าง

2.2 การตรวจแอนติบอดี

การตรวจแอนติบอดีของ FMDV เป็นการตรวจหาหรือตรวจระดับแอนติบอดีที่มีต่อเชื้อไวรัสในซีรัมสัตว์เพื่อการควบคุมและป้องกันโรคโดยมี 2 วิธีทดสอบดังนี้

2.2.1 การตรวจระดับแอนติบอดีของ FMDV โดยวิธี LPB ELISA

เป็นการตรวจเชิงปริมาณ เพื่อหาระดับแอนติบอดีต่อ FMDV ในระยะก่อนและ/หรือภายหลังได้รับการฉีดวัคซีนควบคุมและป้องกัน FMD หรือในซีรัมสัตว์ที่สงสัยว่าได้รับการติดเชื้อ FMDV โดยวิธี liquid phase blocking Enzyme-linked Immunosorbent assay (LPB ELISA)

แอนติบอดีที่ได้จะเป็นแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อไวรัสในวัคซีนแต่ละซีโรไทป์ การแสดงผลจึง

แยกแต่ละซีโรไทป์ คือ โอ เอ หรือเอเชียวัน และบางครั้งในกรณีที่ซีโรไทป์นั้นตรวจระดับแอนติบอดีมากกว่า 1 สายพันธุ์ เช่น ซีโรไทป์เอตรวจทั้งสายพันธุ์ A/Sakol/97 และ A/Lopburi/2012 จะแยกผลระดับแอนติบอดีแต่ละสายพันธุ์ของไวรัส

การแปลผล: ผลการทดสอบจะรายงานเป็นเปอร์เซ็นต์ของจำนวนสัตว์ที่มีระดับแอนติบอดีมากกว่าหรือเท่ากับ 1:80 จะแปลผลว่ามีภูมิคุ้มกันที่สามารถป้องกัน FMD ได้

ระยะเวลาในการทดสอบ: 2 วันทำการ ไม่รวมวันที่รับตัวอย่าง

ตัวอย่าง: ซีรัมของ โค กระบือ แพะ แกะ และสุกร ที่มีลักษณะใส ปริมาตรอย่างน้อย 0.5 มิลลิลิตร

หมายเหตุ: กรุณาระบุประวัติซีรัมให้ชัดเจน เช่น ประวัติวัคซีน ระยะเวลาที่เก็บซีรัมกี่วันหลังพบการ

2.2.2 การตรวจหาแอนติบอดีต่อ 3ABC non-structural protein ของ FMDV

เป็นการตรวจเชิงคุณภาพ เพื่อตรวจสอบสถานะสัมผัสเชื้อ FMDV โดยการตรวจหาแอนติบอดีต่อ 3ABC non-structural protein ของ FMDV ที่จำเพาะกับ 3ABC non-structural protein ของชุดทดสอบสำเร็จรูป โดยวิธี blocking ELISA

สัตว์ที่ติดเชื้อ FMDV จะสร้างแอนติบอดีต่อ structural protein (SP) และ non-structural protein (NSP) ตั้งแต่ 3-5 วันหลังติดเชื้อ สัตว์ที่ได้รับวัคซีนแต่ไม่เคยสัมผัสเชื้อจะสร้างแอนติบอดีต่อ SP เท่านั้น การตรวจหา 3 ABC non-structural protein (NSP) เป็นการตรวจหาแอนติบอดีต่อ NSP เพื่อตรวจสอบว่าสัตว์ได้รับหรือเคยได้รับการสัมผัส FMDV หรือไม่ การตรวจหา NSP เป็นวิธีที่ยอมรับในระดับสากลว่าสามารถแยกสัตว์ที่เคยสัมผัสเชื้อ FMDV ได้ ส่วนผลการทดสอบจะรายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์ของจำนวนสัตว์ในฝูงที่มีผลบวกต่อ NSP

การแปลผล: ค่า percent inhibition (PI) $\geq$ 50% อ่านผลเป็น positive หมายถึง มีแอนติบอดีต่อ 3ABC non- structural protein นั่นคือสัตว์ได้รับหรือ

เคยได้รับการสัมผัส FMDV ในขณะที่ ค่า PI < 50%
อ่านผลเป็น negative หมายถึง ไม่มีแอนติบอดีต่อ
3ABC non- structural protein

ระยะเวลาในการทดสอบ: 2 วันทำการ ไม่รวม
วันที่รับตัวอย่าง

ตัวอย่าง: ซีรัมของ โค กระบือ แพะ แกะ และ
สุกร ที่มีลักษณะใส ปริมาณอย่างน้อย 0.5 มิลลิลิตร

หมายเหตุ: กรณารับประวัติและวัตถุประสงค์
ของการเก็บซีรัมให้ชัดเจน เช่น ประวัติวัคซีน ระยะเวลา
ที่เก็บซีรัมหลังพบอาการ เพื่อตรวจสอบภาวะสัมผัส
เชื้อหรือเพื่อเคลื่อนย้ายสัตว์

บทที่ 3

การเตรียมความพร้อมด้านการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของแอนติเจนทางซีรั่มวิทยาของ FMDV (r-value) (OIE, 2019)

การใช้วัคซีนของ FMD สำหรับควบคุมและป้องกันโรคนั้น แต่ละซีโรไทป์ไม่ให้ภูมิคุ้มกันข้ามกัน แม้กระทั่งในซีโรไทป์เดียวกันแต่คนละสายพันธุ์ก็เป็นไปได้ว่าจะไม่ให้ภูมิคุ้มกันข้ามสายพันธุ์ ดังนั้นการใช้วัคซีนที่มีเชื้อ FMDV ที่แตกต่างสายพันธุ์แม้ว่าจะเป็นซีโรไทป์เดียวกัน สัตว์ก็อาจจะป่วยเป็น FMD ที่เกิดจากสายพันธุ์อื่นก็ได้

วิธีการคัดเลือกเชื้อไวรัสสำหรับผลิตวัคซีนที่ตรงและน่าเชื่อถือที่สุด คือ การใช้วัคซีน จากนั้นฉีดเชื้อที่พบในท้องที่ที่พบเพื่อดูว่าสามารถคุ้มกันโรคได้หรือไม่ แต่วิธีดังกล่าวต้องใช้สัตว์ทดลองจำนวนมาก และเนื่องจากเชื้อ FMDV เป็นไวรัสที่สามารถแพร่กระจายในอากาศจึงต้องทำการทดสอบในอาคารสัตว์ทดลองที่มีความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 3 (animal biosafety level 3, ABSL-3) ซึ่งเป็นห้องปฏิบัติการที่มีความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 3 ที่ออกแบบมาให้สามารถเลี้ยงสัตว์ทดลองได้ เพื่อป้องกันการรั่วไหลของเชื้อไวรัสออกนอกอาคารสู่สิ่งแวดล้อม แต่วิธีนี้ไม่นิยมใช้ เนื่องจากมีข้อจำกัดในเรื่องจรรยาบรรณสัตว์ทดลอง และต้องมีห้องปฏิบัติการ ABSL-3 ที่สามารถเลี้ยงสัตว์ทดลองขนาดใหญ่ได้โดยเฉพาะ

เนื่องจากเชื้อ FMDV เป็นเชื้อไวรัสที่มีสารพันธุกรรมชนิด RNA ที่มีความแปรปรวนสูงและมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมาก จึงมีสายพันธุ์ใหม่ ๆ เกิดขึ้นบ่อยครั้ง วิธีการคัดเลือกไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีนสำหรับ FMD ที่ได้รับการยอมรับกันมากที่สุดคือการหาความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัสในวัคซีนกับเชื้อไวรัสที่ระบาดในพื้นที่ทางซีรั่มวิทยา (vaccine matching, r-value หรือ ค่า r) ด้วยการศึกษาเปรียบเทียบการ neutralize ของเชื้อไวรัสในวัคซีนและเชื้อไวรัสที่ระบาดในพื้นที่กับซีรั่มที่ได้มาจากเชื้อไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีน และใช้ r-value มาจัดกลุ่มหรือหาความใกล้เคียงกันของเชื้อไวรัส โดยมีจุดประสงค์เพื่อทราบว่าวัคซีนยังสามารถใช้กับเชื้อ FMDV ที่พบในพื้นที่หรือไม่ ดังเช่นในปี พ.ศ. 2540 กรมปศุสัตว์ทดสอบหา r-value และพบสายพันธุ์ A/Sakol/97 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ใหม่ที่ r-value อยู่คนละกลุ่มโดยสิ้นเชิงกับไวรัสในวัคซีนเดิมที่ใช้อยู่ในขณะนั้น คือสายพันธุ์ A/132/87 แม้ว่า nucleotide sequence จะยังอยู่ในกลุ่ม A/Sea-97/ASIA เหมือนกันก็ตาม สิ่งสำคัญที่สุดที่ต้องพิจารณาคือเมื่อ r-value ของเชื้อไวรัสที่พบจัดอยู่คนละกลุ่มกับไวรัสในวัคซีนที่ใช้ในขณะนั้น ต้องหาไวรัสในวัคซีนที่เหมาะสมครอบคลุมเชื้อที่ระบาดในพื้นที่มาผลิตวัคซีนเพื่อควบคุมและป้องกันโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยเร็วที่สุด

ในกระบวนการผลิตวัคซีน มีปัจจัยหลายประการที่มีผลต่อประสิทธิภาพความคุ้มโรคของวัคซีน ไม่ว่าจะเป็นกระบวนการผลิต สารสื่อที่ใช้ ห่วงโซ่ความเย็น ฯลฯ กระบวนการทั้งหลายดังกล่าวที่เกี่ยวข้องกับการผลิตวัคซีน

กรมปศุสัตว์ได้ดำเนินการตามหลักมาตรฐานสากลของโรงงานผลิตวัคซีน อย่างไรก็ตามนอกจากกระบวนการผลิตวัคซีนแล้วยังต้องคำนึงถึง r-value ของไวรัสที่นำมาใช้ ถ้า r-value ของไวรัสในวัคซีนที่ใช้ไม่สามารถครอบคลุมเชื้อที่ระบาดในพื้นที่ เมื่อมีโรคระบาดการใช้วัคซีนเพื่อควบคุมและป้องกันโรคก็จะไม่ได้ผล

การคัดเลือกไวรัสในวัคซีนเพื่อเป็นตัวแทนในการผลิตวัคซีน จะใช้สายพันธุ์ของเชื้อไวรัสที่พบการระบาดในประเทศไทย หรือสายพันธุ์ท้องถิ่น (local strain) มาพัฒนาในเซลล์เพาะเลี้ยงในโรงงานผลิตวัคซีนและเก็บ stock เป็นไวรัสในวัคซีนพร้อมที่จะนำออกมาใช้ผลิตวัคซีนได้ตลอดเวลา โดยแต่ละซีโรไทป์จะมีสายพันธุ์ต่าง ๆ หลากหลายกันไป ซีโรไทป์ O/Udomthani/1987 (O/189/87) เป็นตัวหลักนอกนั้นเป็นสายพันธุ์เดิมที่เตรียมจากเชื้อไวรัสในพื้นที่อีกหลายสายพันธุ์ เช่น O/Chumphon/2010, O/Nakhonpathom/87, O/216 ซีโรไทป์เอประกอบด้วยสายพันธุ์ A/Sakol/97, A/Nakhonpathom/87 (A/132/87), A/Lopburi/2012, A/Saraburi/87 (A/118/87) ส่วนซีโรไทป์เอเซียวัน ก็มีสายพันธุ์ Asia1/Phetchaburi/85 เพียงสายพันธุ์เดียว จะเห็นได้ว่าสายพันธุ์ที่เป็นสายพันธุ์ท้องถิ่นของประเทศไทยจะตั้งชื่อตามจังหวัดที่พบเป็นส่วนใหญ่

3.1 บททั่วไปเรื่องการทดสอบ r-value

หลักการทดสอบหา r-value โดยการเปรียบเทียบปฏิกิริยาการ neutralize ระหว่างเชื้อไวรัสที่ระบาดในพื้นที่กับไวรัสที่ใช้ผลิตวัคซีน โดยใช้ซีรัมควบคุมบวกจากสัตว์ทดลองที่ได้รับวัคซีน ซึ่งผลิตจากไวรัสในวัคซีนแต่ละสายพันธุ์ นำมา neutralize กับไวรัสในพื้นที่และไวรัสในวัคซีนสายพันธุ์นั้น คำนวณ r-value โดยใช้ระดับแอนติบอดีจากการ neutralize ไวรัสในพื้นที่หารด้วยระดับแอนติบอดีจากการ neutralize ไวรัสในวัคซีน ถ้าซีรัมควบคุมบวกของไวรัสในวัคซีนสามารถ neutralize ไวรัสพื้นที่ได้ดีกว่าตัวของไวรัสในวัคซีนเอง

r-value ก็จะสูง แสดงว่ามีความสัมพันธ์กันใกล้ชิดหรือจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน แต่ถ้าซีรัมควบคุมบวกของไวรัสในวัคซีน neutralize ไวรัสในพื้นที่ได้น้อยกว่าไวรัสในวัคซีน r-value ก็จะต่ำ ถ้า r-value ต่ำกว่า 0.2 แสดงว่าไม่มีความสัมพันธ์กันหรือจัดอยู่คนละกลุ่มกัน ในกรณีที่ r-value ต่ำกว่า 0.2 เกิดเป็นภาพรวมในวงกว้าง ต้องมีการพิจารณาเปลี่ยนไวรัสในวัคซีนต่อไป

เมื่อมี FMD ระบาดในพื้นที่ เจ้าหน้าที่ของกรมปศุสัตว์จะเก็บตัวอย่างส่งตรวจหาและจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อ FMDV ที่ คออ. หลังจากตรวจตัวอย่างและทราบซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสแล้ว ก็จะนำตัวอย่างดังกล่าวไปทดสอบระดับของแอนติเจน (antigen titration) เพื่อหาระดับของแอนติเจนกับแอนติซีรัมของกระต่ายและหนูตะเภาโดยใช้ไวรัสในวัคซีนเป็นตัวควบคุมบวก เมื่อได้ระดับของแอนติเจนที่เหมาะสมแล้ว จึงนำมาทดสอบหา r-value กับไวรัสในวัคซีน ส่วนวิธีการคัดเลือกไวรัสในวัคซีนให้ครอบคลุมการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติดังกล่าว มีหลากหลายวิธีได้แก่ complement fixation (CF) test, virus neutralization (VN) test และ LPB ELISA ที่อาศัยหลักการ double antibody sandwich ELISA (DAS ELISA) ตามวิธีของ Hamblin *et al.*, 1986 โดยวิธี LPB ELISA เป็นวิธีที่นำมาใช้เป็นงานเป็นประจำเนื่องจากทำได้ง่ายกว่า ไม่ต้องใช้เทคนิคปลอดเชื้อและวิธี LPB ELISA ในภาพรวมให้ผล r-value ไม่แตกต่างจากวิธี VN test

วิธีการทดสอบระดับของแอนติเจน และ r-value มีดังนี้

3.1.1 การทดสอบระดับของแอนติเจน (antigen titration)

การทดสอบระดับของแอนติเจนด้วยวิธี DAS ELISA เป็นการหาความเข้มข้นของไวรัสแอนติเจนที่เหมาะสมสำหรับงานทดสอบ และจะแปลผล OD ที่ 1.5-1.8 โดยมีไวรัสในวัคซีนเป็นตัวควบคุมบวก จึงใช้นำมาทดสอบ r-value ได้ การทดสอบระดับของแอนติเจนในทางปฏิบัติจะทดสอบไวรัสในพื้นที่เปรียบเทียบกับไวรัสในวัคซีนทุกสายพันธุ์ที่มีในขณะนั้น เชื้อไวรัสในพื้นที่

ใช้ทดสอบเปรียบเทียบกับเชื้อ FMDV ซีโรไทป์เอ ได้แก่ เชื้อไวรัสในวัคซีนสายพันธุ์ A/Sakol/97, A/Lopburi/2012, A/132/87 และ A/118/87 สำหรับเชื้อ FMDV ซีโรไทป์โอ ก็จะทดสอบเชื้อไวรัสในพื้นที่เปรียบเทียบกับไวรัสในวัคซีนสายพันธุ์ O/189/87, O/Chumphon/2010, O/216 และ O/Nakhonpathom/87 ผลการทดสอบจะนำมาเลือกสารตรวจสอบในงาน LPB ELISA ของไวรัสในวัคซีนให้มีความเฉพาะเจาะจงกับไวรัสในวัคซีนแต่ละสายพันธุ์เพื่อทดสอบหา r-value โดยจะทดสอบกับไวรัสในวัคซีน สายพันธุ์ในขณะนั้นสายพันธุ์เดียว หรือร่วมกับไวรัสในวัคซีนสายพันธุ์ที่ค่าระดับของแอนติเจนสูงพอที่สามารถทดสอบได้ เช่น ในขณะนั้นใช้สายพันธุ์ A/118/87 เป็นไวรัสในวัคซีน ผลของระดับของแอนติเจนที่สามารถนำมาทดสอบหา r-value ได้มี 3 สายพันธุ์ คือ A/118/87, A/Sakol/97 และ A/Lopburi/2012 เป็นต้น

3.1.2 วิธีการทดสอบหา r-value

เตรียมซีรัมควบคุมบวกของไวรัสในวัคซีนจากโคทอลองที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพวัคซีน FMD ของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ (สทช.) กรมปศุสัตว์ โดยการฉีดวัคซีนชนิดสามไทป์ (trivalent) คือ ซีโรไทป์โอ เอ และ เอเซียวัน จากนั้นเจาะเลือดและเก็บซีรัมหลังจากฉีดวัคซีน 21-28 วัน เพื่อนำมาใช้ในการตรวจสอบโดยวิธี LPB ELISA โดยการทดสอบหา r-value ขั้นตอนจะคล้ายการทดสอบระดับของแอนติเจน ยกเว้นขั้นตอนที่เติมเชื้อไวรัสแอนติเจนให้เจือจางซีรัมควบคุมบวกของไวรัสในวัคซีน แบบ two-fold serial dilution แล้วเติมเชื้อไวรัสในพื้นที่และเชื้อไวรัสในวัคซีนตามปริมาณที่คำนวณได้จากการทดสอบ เพื่อให้ซีรัมควบคุมบวก neutralize กับเชื้อไวรัสในพื้นที่ และเชื้อไวรัสในวัคซีน โดยมีเชื้อไวรัสในวัคซีนเป็นตัวควบคุมบวก เชื้อไวรัสที่เหลือจากการ neutralize จะจับกับแอนติซีรัมที่ผลิตจากกระต่ายและหนูตะเภา จากนั้นอ่านค่าเป็นระดับแอนติบอดีของเชื้อไวรัสในพื้นที่ และเชื้อไวรัสในวัคซีน ทำปฏิกิริยาต่อซีรัมควบคุมบวก โดยทุกตัวอย่างทำการตรวจสอบซ้ำ

อย่างน้อย 2 ครั้ง แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

วิธีคำนวณหา r-value โดยคำนวณอัตราส่วนระหว่างแอนติบอดีของเชื้อไวรัสในพื้นที่ กับแอนติบอดีที่ได้จากเชื้อไวรัสในวัคซีน นำ r-value มาวิเคราะห์ผลความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยาตามวิธีของ Samuel *et al.*, 1990; Doughty *et al.*, 1995 ดังนี้

$$r\text{-value} = \frac{\text{ระดับแอนติบอดีในซีรัมของเชื้อไวรัสในพื้นที่}}{\text{ระดับแอนติบอดีในซีรัมที่ได้จากเชื้อไวรัสในวัคซีน}}$$

กำหนดหลักเกณฑ์ความหมายของ r-value ดังนี้

$r = 0 - 0.19$ เชื้อไวรัสในพื้นที่ที่มีการเปลี่ยนแปลงความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยาสูงหรือจัดอยู่คนละกลุ่มกับเชื้อไวรัสในวัคซีน (Poor matching, highly significant serological variation from the reference vaccine strain)

$r = 0.2 - 0.39$ เชื้อไวรัสในพื้นที่ที่มีการเปลี่ยนแปลงความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยาในระดับปานกลางเมื่อเทียบกับเชื้อไวรัสในวัคซีน แต่จะป้องกันโรคได้หรือไม่ขึ้นอยู่กับวิธีทดสอบประสิทธิภาพวัคซีน (อาจโดยวิธีฉีดเชื้อพิษทาบ) (Moderate matching, significant difference from the reference vaccine strain but protection may be satisfactory if using a sufficiently potent vaccine)

$r = 0.4 - 1.0$ เชื้อไวรัสในพื้นที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยา ยังจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับเชื้อไวรัสในวัคซีน (Good matching, not significant difference from reference strain)

3.2 การเปลี่ยนแปลง r-value ในช่วงเวลาที่ผ่านมา

3.2.1 การเปลี่ยนแปลง r-value ของเชื้อ FMDV ซีโรไทป์โอ

การศึกษา r-value ของเชื้อ FMDV ซีโรไทป์โอที่ระบาดในพื้นที่ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2533 จนถึงปัจจุบัน

พบว่าส่วนใหญ่มี r-value มากกว่า 0.4 คือ จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อไวรัสในวัคซีน O/189/87 แม้ว่าในช่วงเวลาที่ผ่านมามีการพัฒนาไวรัสในวัคซีนจากเชื้อไวรัสในพื้นที่และนำมาใช้ผลิตวัคซีนเพื่อใช้ควบคุมและป้องกันโรคเพิ่มเติมหลายสายพันธุ์ เช่น เมื่อปี พ.ศ. 2559 กรมปศุสัตว์ผลิตวัคซีนจากเชื้อไวรัส O/Chumphon/2010 เนื่องจากสามารถผลิตปริมาณเชื้อไวรัสต่อครั้งได้ปริมาณมากกว่า O/189/87 เมื่อนำมาทดสอบหา r-value พบว่าเชื้อไวรัสในพื้นที่ในปี พ.ศ. 2559 มีความสัมพันธ์จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ O/Chumphon/2010 จนกระทั่งปลายปี พ.ศ. 2559 เชื้อไวรัสในพื้นที่มี r-value เปลี่ยนไปมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ O/189/87 มากกว่า O/Chumphon/2010 จึงกลับมาใช้ O/189/87 เป็นเชื้อไวรัสในวัคซีน แต่อย่างไรก็ตามเชื้อไวรัสในพื้นที่หรือเชื้อไวรัสในวัคซีนที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ทั้งหมดก็ยังมี ความใกล้ชิดมี r-value เป็นกลุ่มเดียวกับเชื้อไวรัสในวัคซีน O/189/87

3.2.2 การเปลี่ยนแปลง r-value ของเชื้อ FMDV ซีโรไทป์เอ

ปี พ.ศ. 2532 กรมปศุสัตว์ใช้เชื้อไวรัสในวัคซีน A/132/87 เป็นตัวแทนในการผลิตวัคซีน ซีโรไทป์เอ เพื่อควบคุมและป้องกันโรค และมีการทดสอบหา r-value ของไวรัสในพื้นที่กับเป็นงานประจำ จนกระทั่งปี พ.ศ. 2540 เชื้อไวรัสในพื้นที่ซีโรไทป์เอ เริ่มมี r-value เปลี่ยนแปลงไปจากเชื้อไวรัสในวัคซีน A/132/87 โดยการเปลี่ยนแปลงเป็นสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสในวัคซีนในช่วงต่าง ๆ ดังนี้

3.2.2.1 A/Sakol/97 ในปี พ.ศ. 2540

ในปี พ.ศ. 2540 กรมปศุสัตว์ได้ตรวจพบเชื้อ FMDV ซีโรไทป์เอ ในตัวอย่างที่ส่งจากจากจังหวัดสกลนคร ซึ่งเป็นการพบซีโรไทป์เอเป็นครั้งแรกหลังจากไม่พบการระบาดในพื้นที่มากกว่า 1 ปี จากนั้นมีการแพร่กระจายของ FMD ซีโรไทป์เออย่างรวดเร็วภายในระยะเวลาสั้น ๆ พบการระบาดไปเกือบทั้งประเทศ แม้ว่าจะมีการใช้วัคซีนควบคุมและป้องกันโรคอย่าง

สม่ำเสมอก็ตาม เมื่อนำมาเพาะแยกเชื้อและเพิ่มปริมาณไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง ก็สามารถเพิ่มปริมาณไวรัสได้อย่างรวดเร็วโดยเกิด Cytopathic effect (CPE) ภายใน 18 ชั่วโมง ซึ่งถือว่าเป็นการเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสที่เร็วมาก กรมปศุสัตว์จึงนำเชื้อไวรัสในพื้นที่มาทดสอบหา r-value โดยวิธี LPB ELISA กับเชื้อไวรัสในวัคซีนในช่วงนั้นคือ A/132/87 พบว่า 69% (9/13) ให้ r-value ต่ำกว่า 0.19 แสดงว่าไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างไวรัสในวัคซีนกับไวรัสในพื้นที่ กรมปศุสัตว์จึงคัดเลือกเชื้อไวรัสในพื้นที่ไปพัฒนาเป็นไวรัสในวัคซีน โดยใช้ชื่อว่า A/Sakol/97 และนำมาใช้ควบคุมและป้องกันโรค ในขณะเดียวกันก็นำเชื้อไวรัสดังกล่าวมาผลิตสารตรวจสอบเพื่อใช้ในงาน ELISA ทั้งงานตรวจจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสและตรวจระดับแอนติบอดี

หลังจากใช้ A/Sakol/97 เป็นตัวแทนในการผลิตวัคซีนและใช้เพื่อการควบคุมและป้องกันโรคได้ไม่นาน การระบาดของ FMD ลดลงเรื่อย ๆ ตัวอย่างส่งตรวจลดลงอย่างเห็นได้ชัด แสดงว่า A/Sakol/97 สามารถใช้เป็นตัวแทนของเชื้อไวรัสในวัคซีนที่ใช้ควบคุมและป้องกันการระบาดได้อย่างมีประสิทธิภาพ

3.2.2.2 A/118/87 ในปี พ.ศ. 2544

ในปี พ.ศ. 2544 กรมปศุสัตว์ได้นำเชื้อ FMDV ซีโรไทป์เอ ที่ระบาดในพื้นที่มาทดสอบ r-value เทียบกับเชื้อไวรัสในวัคซีนในขณะนั้นคือ A/Sakol/97 พบว่าส่วนใหญ่ r-value ต่ำกว่า 0.19 คือจัดอยู่คนละกลุ่มกับเชื้อไวรัสในวัคซีน A/Sakol/97 แต่ให้ r-value มากกว่า 0.4 เมื่อเทียบกับเชื้อไวรัสในวัคซีน A/118/87 กรมปศุสัตว์จึงเปลี่ยนเชื้อไวรัสในวัคซีนจาก A/Sakol/97 เป็น A/118/87 และพบว่าสามารถใช้ควบคุมและป้องกันการระบาดได้อย่างมีประสิทธิภาพ หลังจากนั้นระหว่างปี พ.ศ. 2546-2551 ก็มีการทดสอบหา r-value ระหว่างไวรัสในวัคซีน 2 สายพันธุ์นี้อย่างสม่ำเสมอ พบว่าส่วนใหญ่ A/118/87 จะให้ r-value ครอบคลุมเชื้อไวรัสในพื้นที่มากกว่า A/Sakol/97

3.2.2.3 A/Sakol/97 ในปี พ.ศ. 2553

ในปี พ.ศ. 2553 จากรายงานของ Food and Agriculture Organization (FAO) และ OIE พบการระบาดของ เชื้อ FMDV ซีโรไทป์เอ คือ A/Iran/05 ในประเทศแถบตะวันออกกลางและเอเชียใต้ ได้แก่ อิหร่าน อิรัก จอร์แดน และปากีสถาน จากรายงานของ WRL สหราชอาณาจักร ในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 พบเชื้อ FMDV ซีโรไทป์เอ A/Iran/05 ในประเทศเมียนมา ดังนั้นประเทศไทยจึงต้องมีการเฝ้าระวังการระบาดของเชื้อไวรัสซีโรไทป์เอที่อาจเข้ามาระบาดในประเทศอย่างใกล้ชิด ต่อมาในเดือนพฤศจิกายน-ธันวาคม พ.ศ. 2553 กรมปศุสัตว์พบการระบาดของเชื้อ FMDV ซีโรไทป์เอ บริเวณภาคเหนือและภาคกลางของประเทศ หลังจากที่ไม่พบการระบาดของเชื้อ FMDV ซีโรไทป์เอตั้งแต่เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2552 การระบาดในครั้งนี้มีการแพร่กระจายของโรคอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะในเขตที่มีการเลี้ยงสัตว์หนาแน่นทางภาคตะวันตกของประเทศ จึงคาดว่าอาจจะเป็นเชื้อ FMDV ซีโรไทป์เอ ชนิด A/Iran/05 จากประเทศเมียนมา กรมปศุสัตว์จึงนำเชื้อไวรัสที่พบมาทดสอบระดับของแอนติเจนกับไวรัสในวัคซีนสายพันธุ์ที่มีอยู่ในขณะนั้น คือ A/132/87, A/Sakol/97 และ A/118/87 ผลระดับของแอนติเจนของ A/132/87 และ A/118/87 ได้ค่า OD อยู่ระหว่าง 0.3-0.6 ต่ำกว่าระดับที่ต้องการสำหรับทดสอบ r-value คือ 1.5-1.8 ในขณะที่ A/Sakol/97 ได้ค่าระดับของแอนติเจนสูงพอจึงนำมาทดสอบ r-value และพบว่าไวรัสในพื้นที่ทั้งหมดจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับไวรัสในวัคซีน A/Sakol/97 กรมปศุสัตว์จึงตัดสินใจเปลี่ยนเชื้อไวรัสในวัคซีนเป็น A/Sakol/97 และนำไปใช้ในการควบคุมและป้องกันโรค ภายในระยะเวลาไม่นาน การระบาดของโรคก็ลดลง แสดงว่า A/Sakol/97 สามารถนำมาใช้เป็นเชื้อไวรัสในวัคซีน และนำไปควบคุมและป้องกันการระบาดได้อย่างมีประสิทธิภาพ

3.2.2.4 A/Lopburi/2012 ในปี พ.ศ. 2555-2558

ในปี พ.ศ. 2555 กรมปศุสัตว์ได้ตรวจหาและจำแนกซีโรไทป์ของ FMDV ในตัวอย่างที่เก็บจากจังหวัดลพบุรีพบว่าเป็นซีโรไทป์เอ และมีการแพร่กระจายของโรคอย่างรวดเร็วไปทั่วประเทศ เมื่อนำมาเพาะแยกเชื้อและเพิ่มปริมาณของเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงก็สามารถเพิ่มปริมาณของเชื้อไวรัสได้อย่างรวดเร็ว จึงนำมาทดสอบระดับของแอนติเจนกับเชื้อไวรัสในวัคซีนสายพันธุ์ที่มีในขณะนั้นคือ A/132/87, A/Sakol/97, A/118/87 และไวรัสในวัคซีน A22/Iraq/64 ที่ได้มาจาก WRL ผลการทดสอบระดับของแอนติเจน เฉพาะ A/Sakol/97 และ A22/Iraq/64 เท่านั้นที่ได้ระดับของแอนติเจนสูงพอที่สามารถทดสอบ r-value ได้ ส่วนผลการทดสอบ r-value พบว่าทั้งหมดมีความสัมพันธ์จัดอยู่คนละกลุ่มกับ A/Sakol/97 แต่ส่วนใหญ่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ A22/Iraq/64 แสดงว่าสามารถใช้ไวรัส A22/Iraq/64 ในการควบคุมและป้องกันโรคได้ แต่กรมปศุสัตว์ไม่มีเชื้อไวรัสในวัคซีน A22/Iraq/64 จึงใช้เชื้อไวรัสในพื้นที่ที่ระบาดในขณะนั้นจากจังหวัดลพบุรีไปพัฒนาเป็นเชื้อไวรัสในวัคซีนโดยใช้ชื่อว่า A/Lopburi/2012 และนำมาผลิตเป็นวัคซีนเพื่อใช้ควบคุมและป้องกันโรค ซึ่งพบว่า FMD ที่เกิดการระบาดในขณะนั้นสงบลงอย่างรวดเร็ว จึงนำเชื้อไวรัสในวัคซีนดังกล่าวมาผลิตสารตรวจสอบเพื่อใช้ในการ ELISA ด้วย และเมื่อนำเชื้อไวรัสในพื้นที่ตัวอย่างเดิมที่เก็บไว้และเคยทดสอบ r-value แล้วว่าอยู่คนละกลุ่มกับ A/Sakol/97 กลับมาทดสอบหา r-value กับไวรัสในวัคซีน A/Lopburi/2012 โดยวิธี LPB ELISA พบว่าส่วนใหญ่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน

จากการระบาดของ A/Lopburi/2012 ครั้งนี้พบข้อมูลที่น่าสนใจคือ มีการเคลื่อนย้ายสัตว์เข้ามาในพื้นที่จังหวัดลพบุรี สัตว์ที่เคลื่อนย้ายได้ผ่านการกักกันโรคและทำวัคซีนชนิด 3 ซีโรไทป์ตามที่กรมปศุสัตว์กำหนด สัตว์ที่เคลื่อนย้ายดังกล่าวถูกย้าย

เข้ามาเลี้ยงปะปนกับสัตว์ในพื้นที่ และพบว่าสัตว์ที่เคลื่อนย้ายเป็นสัตว์กลุ่มแรกที่เริ่มป่วยก่อน สัตว์ในพื้นที่ยังไม่พบอาการป่วยทั้ง ๆ ที่สัตว์ในพื้นที่ไม่ได้รับวัคซีนมานาน อาจตั้งสมมุติฐานได้ว่าเชื้อ FMDV ซีโรไทป์เอยังคงอยู่ในพื้นที่จังหวัดลพบุรีมานานแล้ว แต่สัตว์ไม่แสดงอาการป่วยเนื่องจากสัตว์เหล่านั้นเป็น “สัตว์อมโรค” ซึ่งหมายถึง สัตว์ที่ไม่แสดงอาการของโรคแต่มีการติดเชื้อแอบแฝง (persistent Infection) ในสัตว์อมโรคจะสามารถพบเชื้อ FMDV ที่บริเวณรอยต่อระหว่างหลอดอาหารและคอหอย (esophageal-pharyngeal) ซึ่งจากงานวิจัยต่าง ๆ พบว่าในโคสามารถเป็นสัตว์อมโรคได้นาน 3 ปี แกะพบได้นาน 9 เดือน แพะพบได้นาน 4 เดือน และกระบือแอฟริกา พบได้นาน 5 ปี แต่ไม่พบการเป็นสัตว์อมโรคในสุกร ในกรณีนี้สงสัยว่ามีสัตว์อมโรคอยู่ในพื้นที่แต่ไม่แสดงอาการใด ๆ เมื่อมีสัตว์เคลื่อนย้ายเข้ามา ถึงแม้จะทำวัคซีนแล้วแต่ไม่คุ้มโรคเนื่องจากเชื้อไวรัสในวัคซีนที่ใช้ไม่ตรงกับเชื้อไวรัสในพื้นที่จังหวัดลพบุรี ข้อสังเกตอีกประการหนึ่งในการเลือกใช้วัคซีนจากการระบาดในครั้งนี้ คือ แม้ว่าการเรียงลำดับสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสในพื้นที่จะเหมือนเดิมคือเป็น A/Sea-97/ASIA ซึ่งจะแตกต่างกับไวรัสในวัคซีน A22/Iraq/64 ที่เป็น A/A22/ASIA แต่เมื่อทดสอบ r-value พบว่าสามารถใช้ A22/Iraq/64 เป็นตัวแทนเพื่อผลิตวัคซีนในการควบคุมและป้องกันโรคระบาดได้ แสดงให้เห็นว่าสามารถเลือกใช้วัคซีนในการควบคุมและป้องกันโรคได้จากเชื้อไวรัสในวัคซีนที่มี r-value ครอบคลุมเชื้อไวรัสในพื้นที่ การศึกษาการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสอาจใช้เพียงเพื่อประกอบการพิจารณาเท่านั้น

ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2555-2558 กรมปศุสัตว์ได้ทดสอบ r-value ของเชื้อไวรัสในพื้นที่อยู่สม่ำเสมอ และพบว่าส่วนใหญ่ยังคงจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับไวรัสในวัคซีน A/Lopburi/2012 โดยในปี พ.ศ. 2557-2558 เชื้อไวรัสในพื้นที่มี r-value จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ A/Lopburi/2012 และ A/Sako/97 ส่วนสายพันธุ์อื่นไม่สามารถทดสอบ r-value ได้

เนื่องจากระดับของแอนติเจนที่ได้ยังไม่สูงพอ

3.2.2.5 A/Sako/97 ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2559-2560

ในปี พ.ศ. 2559-2560 กรมปศุสัตว์ทดสอบ r-value ของเชื้อไวรัสในพื้นที่ พบว่าในช่วงนี้เชื้อไวรัสในพื้นที่ให้ r-value เป็นกลุ่มเดียวกับ A/Sako/97 และมีความแตกต่างจาก A/Lopburi/2012 ดังนั้นกรมปศุสัตว์จึงเลือกใช้ A/Sako/97 เป็นเชื้อไวรัสในวัคซีน จะเห็นได้ว่า r-value ของเชื้อไวรัสในพื้นที่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ A/Sako/97 มาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2557-2558 และต่อเนื่องมาในปี พ.ศ. 2559-2560 แต่ในช่วงปี พ.ศ. 2557-2558 ยังไม่ได้เปลี่ยนเชื้อไวรัสในวัคซีน เนื่องจาก A/Lopburi/2012 ก็ยังใช้ได้ดี แต่พอในปี พ.ศ. 2559-2560 เชื้อไวรัสในพื้นที่มีความแตกต่างจาก A/Lopburi/2012 ในขณะที่ยังคงจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ A/Sako/97

3.2.2.6 A/Lopburi/2012 ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2561 จนถึงปัจจุบัน

ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2561 จนถึงปัจจุบัน กรมปศุสัตว์ ทดสอบ r-value ของเชื้อไวรัสในพื้นที่ พบว่า ในปี พ.ศ. 2561 เชื้อไวรัสในพื้นที่ทั้งหมดให้ r-value จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ A/Lopburi/2012 ดีกว่า A/Sako/97 ที่เป็นไวรัสในวัคซีน กรมปศุสัตว์จึงเปลี่ยนเชื้อไวรัสในวัคซีน เป็น A/Lopburi/2012 ซึ่งในปี 2562 เชื้อไวรัสในพื้นที่ก็ยังให้ผล r-value ของ A/Lopburi/2012 เป็นกลุ่มเดียวกันถึง 93.93% ดีกว่า A/Sako/97 ที่ให้ผลเป็นกลุ่มเดียวกันเพียง 30.30%

ในปี พ.ศ. 2563 กรมปศุสัตว์ยังคงใช้ A/Lopburi/2012 เป็นเชื้อไวรัสในวัคซีน และไม่พบการระบาดของ FMD ซีโรไทป์เอจากพื้นที่ ซึ่งคาดว่าเป็ผลจากใช้เชื้อไวรัสในวัคซีนที่ตรงกับสายพันธุ์ของไวรัสที่ระบาดในพื้นที่อย่างต่อเนื่อง แต่อย่างไรก็ตามการเฝ้าระวังโดยการเก็บตัวอย่างเชื้อ FMDV จากพื้นที่มาจำแนกซีโรไทป์และทดสอบ r-value อย่างต่อเนื่องเป็นสิ่งจำเป็นและสำคัญอย่างยิ่ง โดยเฉพาะการเฝ้าระวังการกลับมาระบาดของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ A/Sako/97 ซึ่งคาดว่าจะยังมีเชื้อไวรัสสายพันธุ์นี้แฝงอยู่ในพื้นที่

3.3 การนำ r-value ไปใช้ในการควบคุมและป้องกันโรค

การนำ r-value ไปใช้ในการควบคุมและป้องกันโรคโดยพิจารณาเปลี่ยนเชื้อไวรัสในวัคซีน FMD ของกรมปศุสัตว์ เป็นเรื่องที่ต้องพิจารณาโดยรอบคอบ หน่วยงานหลักที่จะต้องพิจารณาเรื่องนี้ร่วมกันคือ สำนักควบคุม ป้องกัน และบำบัดโรคสัตว์ สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ และสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ โดยศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยฯ จะเป็นหน่วยงานที่เสนอความเห็นในช่วงเวลานั้น ๆ โดยข้อมูลที่ใช้ต้องมีข้อมูลจากหลาย ๆ ด้านโดยเฉพาะการระบาดของ FMD ในพื้นที่ โดยพิจารณา r-value เพื่อประกอบการคัดเลือกเชื้อไวรัสในวัคซีนมีดังนี้

3.3.1 r-value ทั้งหมดหรือส่วนใหญ่ มากกว่า 0.4

แสดงว่าเชื้อไวรัสในพื้นที่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับเชื้อไวรัสในวัคซีนขณะนั้น ดังนั้นไวรัสในวัคซีนที่ใช้อยู่สามารถใช้เป็นตัวแทนในการผลิตวัคซีนต่อไปได้ ถ้ามีเชื้อไวรัสในวัคซีนมากกว่า 1 สายพันธุ์ที่ให้ r-value มากกว่า 0.4 ก็อาจใช้เหตุผลอื่นเพิ่มเติมในการคัดเลือกเชื้อไวรัสในวัคซีน เช่น ใช้สายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งอยู่แล้วเปลี่ยนหรือไม่เปลี่ยนก็ไม่แตกต่างความยากง่ายของการเพาะเชื้อไวรัสลงเซลล์เพาะเลี้ยงหรือปริมาณของเชื้อไวรัสที่ได้ในการผลิตแต่ละสายพันธุ์ เป็นต้น

ในช่วงที่ผ่านมาเคยมีบางช่วงเวลาที่ r-value ทั้งหมดหรือส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับเชื้อไวรัสในวัคซีน มากกว่า 1 สายพันธุ์ เช่น

- ไทป์โอ สายพันธุ์ O/Chumphon/2010 กับ O/Udomthani/87 ในปี พ.ศ. 2559

- ไทป์เอ สายพันธุ์ A/Sakol/97 กับ A/Lopburi/2012 ในปี พ.ศ. 2557-2558

3.3.2 r-value ทั้งหมดหรือส่วนใหญ่ น้อยกว่า 0.19

แสดงว่าของเชื้อไวรัสในพื้นที่จัดอยู่คนละกลุ่มกับเชื้อไวรัสในวัคซีน ขณะนั้นเชื้อไวรัสในวัคซีน

ที่ใช้อยู่ไม่สามารถใช้เป็นตัวแทนในการผลิตวัคซีนต่อไปได้ ให้ปรับเปลี่ยนเชื้อไวรัสในวัคซีน เป็นสายพันธุ์ที่ให้ r-value มากกว่า 0.4 ถ้าไม่มีเชื้อไวรัสในวัคซีน ที่ให้ r-value ที่เหมาะสม ให้พัฒนาเชื้อไวรัสในพื้นที่เป็นไวรัสในวัคซีน และนำมาผลิตวัคซีน ที่ผ่านมาเคยเกิดกรณีนี้แล้ว 2 ครั้งคือ A/Sakol/97 ในปี พ.ศ. 2540 และ A/Lopburi/2012 ในปี พ.ศ. 2555

จะมีการเข้าใจผิดเรื่อง r-value อยู่เสมอ โดยเฉพาะการนำ r-value ไปใช้ในการเปลี่ยนเชื้อไวรัสในวัคซีน ไม่สามารถพิจารณาเป็นรายการทดสอบหรือรายตัว แต่ต้องพิจารณาในภาพรวมของพื้นที่หรือของประเทศและต้องพิจารณาด้านอื่นประกอบด้วยโดยเฉพาะด้านระบาดวิทยา เช่นมีตัวอย่างเชื้อไวรัสในพื้นที่จากจังหวัดแห่งหนึ่งให้ r-value ต่ำกว่า 0.19 อยู่ 1 ตัวอย่าง แต่ไม่พบการแพร่กระจายหรือระบาดเพิ่มเติมและโรคสงบไปเอง ในกรณีนี้ก็ไม่จำเป็นต้องเปลี่ยนเชื้อไวรัสในวัคซีน

3.3.3 r-value ทั้งหมดหรือส่วนใหญ่ อยู่ระหว่าง 0.2-0.39

ในการทดสอบที่ผ่านมาไม่เคยพบ r-value ทั้งหมดหรือส่วนใหญ่อยู่ระหว่าง 0.2-0.39 หรือมีการเปลี่ยนแปลงในระดับปานกลางเป็นส่วนใหญ่ การทดสอบในภาพรวมในช่วงเวลาหนึ่ง ๆ จะพบการเปลี่ยนแปลงในระดับปานกลางอยู่บ้าง แต่ส่วนใหญ่จะเป็นความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยาจัดในกลุ่มเดียวกัน หรือมีความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยาจัดอยู่คนละกลุ่มทางใดทางหนึ่ง เช่น พบความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยาจัดในกลุ่มเดียวกัน 90% (36/40 ตัวอย่าง) การเปลี่ยนแปลงในระดับปานกลาง 10% (4/40 ตัวอย่าง) ซึ่งผลการทดสอบการเปลี่ยนแปลงความสัมพันธ์ในระดับปานกลาง ไม่ว่าจะเป็นส่วนประกอบของความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยาจัดในกลุ่มเดียวกัน หรือความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยาจัดอยู่คนละกลุ่ม ก็จะสามารถตัดสินใจในการคัดเลือกเชื้อไวรัสในวัคซีนได้ชัดเจนตามฐานข้อมูลส่วนใหญ่

บทที่ 4

การเตรียมความพร้อมด้านการผลิตสารตรวจสอบทาง ELISA สำหรับ FMD

4.1 ไวรัสและซีรัมที่ใช้ในสารตรวจสอบ

การผลิตวัคซีนสำหรับควบคุมและป้องกัน FMD ในประเทศไทยจะคัดเลือกเชื้อไวรัสที่ระบาดในพื้นที่เป็นเชื้อไวรัสสำหรับผลิตวัคซีนควบคุมและป้องกันโรค ซึ่งการนำเชื้อไวรัสในพื้นที่แต่ละสายพันธุ์มาเตรียมเป็นวัคซีนเริ่มจากเมื่อพบการระบาดของ FMD ในพื้นที่ เจ้าหน้าที่หรือสัตวแพทย์ผู้มีหน้าที่ควบคุมโรคระบาดจะเก็บตัวอย่างส่ง ศอ. เพื่อตรวจหาและจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อไวรัส และศึกษาต่อเนื่องในทางระบาดวิทยาโดย การทำ nucleotide sequencing จากนั้น ศอ. จะเพิ่มปริมาณของเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงให้ปริมาณมากพอ เพื่อหา r-value ในกรณีที่ r-value ส่วนใหญ่ต่ำกว่า 0.19 คือเชื้อไวรัสในพื้นที่จัดอยู่คนละกลุ่มหรือไม่สัมพันธ์กับเชื้อไวรัสในวัคซีนและจำเป็นต้องเปลี่ยนเชื้อไวรัสในวัคซีน แต่ถ้าในขณะนั้นยังไม่มีวัคซีนที่เหมาะสมเนื่องจากเชื้อไวรัสในพื้นที่ไม่สัมพันธ์กับเชื้อไวรัสในสายการผลิตวัคซีนเลย (ในช่วง 25 ปีที่ผ่านมาพบว่าเชื้อไวรัสพื้นที่ที่เปลี่ยนแปลงไปจากเชื้อไวรัสในวัคซีนแบบไม่สัมพันธ์กันเคยอยู่ 2 ครั้ง คือสายพันธุ์ A/Sakol/97 ในปี 2540 และ A/Lopburi/2012 ในปี 2555) ศอ. ต้องเพิ่มเชื้อไวรัสให้มีปริมาณมากขึ้นและส่งเชื้อไวรัสนั้นให้ฝ่ายผลิตวัคซีน FMD สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ (สทช.) เพื่อพัฒนาไวรัสดังกล่าวให้เป็นเชื้อไวรัสในวัคซีนสำหรับผลิตวัคซีน และมีการทดสอบประสิทธิภาพก่อนนำไปแจกจ่ายให้เกษตรกรเพื่อใช้เป็นวัคซีนควบคุมและป้องกันโรค หน้าที่ต่อไปของ ศอ. คือตรวจระดับภูมิคุ้มกันหลังจากให้วัคซีนในสัตว์แล้ว โดยวิธีที่ใช้เป็นงานประจำคือ LPB ELISA โดยฝูงสัตว์ที่มีภูมิคุ้มกันต้องมีระดับแอนติบอดีในแต่ละซีโรไทป์ มากกว่า 1:80 มากกว่า 80% ของฝูง

การตรวจระดับภูมิคุ้มกันหรือตรวจระดับแอนติบอดีต่อ FMDV โดยวิธี LPB ELISA ต้องใช้สารตรวจสอบที่เตรียมจากเชื้อไวรัสสายพันธุ์เดียวกันกับที่ ศอ. ส่งให้ สทช. ไปพัฒนาเป็นวัคซีน สารตรวจสอบที่ได้ถึงจะมีความเหมาะสมกับการใช้ตรวจระดับแอนติบอดีของวัคซีนที่ผลิตจาก สทช. มากที่สุด โดยใช้ซีรัมควบคุมบวก ในกระบวนการทดสอบประสิทธิภาพวัคซีนและใช้เชื้อไวรัสสายพันธุ์เดียวกันเป็นไวรัสควบคุมบวก สารตรวจสอบที่ใช้ตรวจระดับแอนติบอดีโดยวิธี LPB ELISA ก็สามารถนำมาทดสอบหา r-value เช่นเดียวกัน จะเห็นได้ว่าที่มาของสารตรวจสอบโดยวิธี LPB ELISA ทั้ง ไวรัสควบคุมบวก ซีรัมควบคุมบวก และแอนติซีรัมที่ผลิตจากกระต่ายและหนูตะเภาเตรียมจากไวรัสสายพันธุ์เดียวกัน จึงมั่นใจได้ว่าผลการทดสอบมีความน่าเชื่อถือตรงตามวัคซีนที่ใช้

ในการเตรียมสารตรวจสอบเพื่องานทดสอบโดยวิธี LPB ELISA ทำได้โดยนำเชื้อไวรัสสายพันธุ์ที่จะนำมาผลิตสารตรวจสอบมาผ่านขั้นตอนต่าง ๆ เริ่มจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ การเพาะเลี้ยงไวรัส การเตรียมอนุภาค 146S ไวรัสแอนติเจน การเตรียมแอนติซีรั่มในสัตว์ทดลอง (กระต่ายและหนูตะเภา) และการทวนสอบสารตรวจสอบและทดสอบความใช้ได้ของสารตรวจสอบ ตามรายละเอียดดังนี้

4.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์

ใช้ BHK-21 cell line แบบ monolayer ที่เตรียมจาก cell stock เป็นเซลล์ตั้งต้นในการเพาะเลี้ยงโดยมีวิธีเตรียมดังนี้

4.2.1 คำนวณปริมาณอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรั่มของวัวเป็นส่วนประกอบสำหรับการเจริญเติบโต (growth medium) ที่จะใช้จากจำนวนเท่าของเซลล์ที่จะเพิ่มปริมาณ (4-8 เท่าขึ้นอยู่กับเซลล์แต่ละชุดและระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มเซลล์) เช่น ถ้าจะเพาะเซลล์จากขวดเลี้ยงเซลล์เดิม 250 ตารางเซนติเมตร (ปริมาณ growth medium เดิมคือ 100 มิลลิลิตร) อีก 6 เท่า แสดงว่าต้องเติม growth medium อีก 6 เท่าเช่นกัน คือ เพิ่มเป็น 600 มิลลิลิตรและใส่ในขวดเลี้ยงเซลล์ที่มีปริมาตรรวมเพิ่มขึ้น 6 เท่าเช่นกัน คือ 1,500 ตารางเซนติเมตร คือ อาจจะใช้ขวดเลี้ยงเซลล์ 250 ตารางเซนติเมตร จำนวน 6 ขวด หรือรวมกับขวดเลี้ยงเซลล์ขนาดอื่นก็ได้ ตามวัตถุประสงค์ของผู้ใช้

4.2.2 ล้าง BHK-21 cell สภาพสมบูรณ์ ในขวดเลี้ยงเซลล์ โดยทั่วไปจะดูจากลักษณะของเซลล์ที่คล้ายรูปกระสวย (fibroblast-like cells) ขนาดไม่พองจนเกินไป มีปริมาณเต็มพื้นที่ในขวดเลี้ยงเซลล์หรืออย่างน้อย 80% ของพื้นผิวมาเพาะเลี้ยงต่อ โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้งล้างเซลล์ด้วย 0.01 M phosphate buffer saline และดูดทิ้ง

4.2.3 เติม 0.125% Trypsin + 0.025 Versine ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในขวดเลี้ยงเซลล์เพื่อย่อยเซลล์ให้

แยกออกจากขวดเลี้ยงเซลล์ จากนั้นหยุดปฏิกิริยาของการย่อยด้วยการเติม growth medium จาก ข้อ 4.2.1 ประมาณ 8-10 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตอัตโนมัติดูดเซลล์ขึ้นมาปริมาตรประมาณ 5 มิลลิลิตร กดปล่อยตัวปล่อยปิเปตอัตโนมัติให้เซลล์กระทบกับข้างขวดด้านใน ในลักษณะการกระทบที่แรง ทำซ้ำประมาณ 20-25 ครั้ง เพื่อให้เซลล์แยกออกเป็นเซลล์เดี่ยวถ้าเซลล์แยกออกจากกันไม่หมด หรือยังมีลักษณะเป็นก้อน เซลล์ที่ได้อาจจะไม่โตหรือโตไม่เต็มพื้นที่ขวดเลี้ยงเซลล์

4.2.4 ดูดเซลล์ที่แยกเป็นเซลล์เดี่ยวแล้วลงใน growth medium จากข้อ 4.2.1 ผสมให้เข้ากัน

4.2.5 แยกเซลล์ใน growth medium ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ตามที่ต้องการไว้

4.2.6 นำไปวางไว้ที่ตู้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 48 ชั่วโมง เพื่อไม่ให้เซลล์เพิ่มปริมาณจนหนาแน่นเกินไป จะมีผลทำให้เซลล์ไม่สมบูรณ์หรือตายได้ เมื่อนำไปเลี้ยงไวรัส ระดับของแอนติเจนที่ได้อาจไม่ดีเท่าที่ควร

4.2.7 เมื่อครบ 48 ชั่วโมง ดูความสมบูรณ์ของเซลล์ ซึ่งปกติเซลล์จะเป็นรูปกระสวย ขนาดไม่พองจนเกินไป และเต็มขวดพอดี และ growth medium จะเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลืองใสไม่ขุ่นจากการปนเปื้อน

4.3 การเพาะเลี้ยงไวรัส

เป็นการเพิ่มปริมาณไวรัสสายพันธุ์ที่ต้องการบนเซลล์เพาะเลี้ยง BHK-21 จำนวน 5-9 passages (สามารถปรับเปลี่ยนได้ตามปริมาณไวรัสที่ผลิตได้ในแต่ละชุด) ให้มี CPE ภายใน 24 ชั่วโมง เริ่มแรกของการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณจะต้องทำการตรวจสอบปริมาณของเชื้อไวรัสที่เพาะเลี้ยงได้โดยวิธีทดสอบระดับของแอนติเจน หรือใช้วิธีการหาความรุนแรงของไวรัสที่การเจือจางไวรัสสูงสุดที่สามารถทำให้เซลล์ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ($TCID_{50}$) ซึ่งจะเป็นเชื้อไวรัสที่มีความรุนแรงเพียงพอที่จะนำไปใช้งานได้ โดยปกติระดับของแอนติเจนจะอยู่ที่ 1:120 หรือ ค่า $TCID_{50}$ ประมาณ 3.5

ขึ้นไป นำไปเพาะขยายเพิ่มปริมาณ จนได้ปริมาตร 2,000-4,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปหาระดับของแอนติเจนของไวรัสอีกครั้ง จึงจะเริ่มกระบวนการผลิตสารตรวจสอบโดยการเตรียมอนุภาค 146S ไวรัสแอนติเจน

4.4 การเตรียมอนุภาค 146S ไวรัสแอนติเจน

4.4.1 การทำให้ไวรัสสั่นสภาพ

เติม 2% Binary ethyleneimine (2% BEI) ปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ ลงในไวรัสที่เตรียมได้ นำไปปั่นอย่างช้าๆ ด้วยความเร็ว 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการสั่นสภาพอย่างสมบูรณ์ เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยาของ 2% BEI ด้วย 20% Sodium thiosulfate ปริมาตร 10% เพื่อเป็นการลดปฏิกิริยาของ 2% BEI และเป็นการป้องกันไม่ให้เซลล์ BHK-21 เกิดความเป็นพิษ นำไปปั่นบน magnetic stirrer เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติม Polyethylene glycol (PEG 6,000) ชนิดผง ปริมาตร 7% ลงในน้ำไวรัส นำไปปั่นส่วนผสมด้วย magnetic stirrer ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อไวรัสสั่นสภาพอย่างสมบูรณ์

4.4.2 การทำให้ไวรัสเข้มข้น (virus concentration)

4.4.2.1 นำน้ำไวรัสจากข้อที่ 4.4.1 ไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นแยกเอาน้ำไวรัสทิ้ง เหลือส่วนที่เป็นตะกอนไว้

4.4.2.2 เติม 0.01M PBS pH 7.6 ลงในตะกอนจากข้อ 4.4.2.1 ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เพื่อทำการละลายตะกอน จากนั้นนำไปปั่น 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จะได้น้ำไวรัส ให้เก็บไว้เป็นน้ำไวรัสส่วนที่ 1 จากนั้นเติม 0.01M PBS pH 7.6 ปริมาตร 50 มิลลิลิตรลงในตะกอนอีกครั้ง เพื่อทำการละลายตะกอน และนำไปปั่น 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จะได้น้ำไวรัสอีกครั้ง เก็บน้ำไวรัสนี้เป็นส่วนที่ 2 และทิ้งตะกอน

4.4.2.3 นำน้ำไวรัสส่วนที่ 1 และ ส่วนที่ 2 มารวมกัน จะได้ปริมาตรประมาณ 200 มิลลิลิตร

4.4.2.4 นำน้ำไวรัสที่รวมกันในข้อ 4.4.2.3 แบ่งใส่หลอด ๆ ละไม่เกิน 70 มิลลิลิตร และนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง (ultracentrifuge) ที่ 26,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อตกตะกอนไวรัส ซึ่งจะได้ตะกอนไวรัสเป็นคล้ายเป็นรูปเม็ดกระดุมเล็ก ๆ (small pellet)

4.4.3 ละลายตะกอนขนาดเล็ก

ทำการละลายตะกอนขนาดเล็กที่ได้ในข้อ 4.4.2.4 โดยเติม 0.01M PBS pH 7.6 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร/หลอด ลงบนตะกอนไวรัสที่เป็น small pellet แห่ค้างคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 0.01M PBS pH 7.6 จะทำให้ตะกอนไวรัสคลายตัวออก ไม่จับตัวกันแน่นเกินไป หลังจากแช่ตะกอนไวรัสค้างคืน นำตะกอนไวรัสมาตีด้วยปิเปต (pipetting technique) เบา ๆ ด้วยความระมัดระวัง อย่าทำให้เกิดฟอง การตีตะกอนแรงเกินไปอาจทำให้ไวรัสแตกตัวไม่ได้อนุภาค 146S ไวรัสตามวัตถุประสงค์ จากนั้นนำไปปั่น 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เพื่อตกตะกอน จะได้ส่วนของน้ำไวรัสเป็นครั้งที่ 1 ประมาณ 4 มิลลิลิตร ทำการละลายตะกอนอีกครั้งด้วย 0.01M PBS pH 7.6 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อหลอด นำไปปั่น 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จะได้ส่วนของน้ำไวรัสเป็นครั้งที่ 2 จากนั้นนำน้ำไวรัสครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 มารวมกัน เพื่อนำไปแยกอนุภาค 146S ใน sucrose gradient

4.4.4 การเตรียม sucrose gradient

ขั้นตอนการทำ sucrose gradient มีดังนี้ เตรียมสารละลาย sucrose ที่มีความเข้มข้น 15% และ 45% (pH 7.6) ใส่ลงในเครื่องทำ sucrose gradient โดยใส่ 45% sucrose ลงในคอลัมน์ปริมาตร 18 มิลลิลิตร จากนั้น ใส่ 15% sucrose ลงในคอลัมน์อีกด้าน ปริมาตร 18 มิลลิลิตรเท่ากัน เปิดวาล์วให้ sucrose 15% ไหลไปหา sucrose 45% โดยที่จังหวะของการไหลจะต้องไหลอย่างต่อเนื่องสม่ำเสมอ เนื่องจากมีผลต่อการสร้างคอลัมน์ของ sucrose ที่จะต้องมีการเรียงชั้นลำดับความเข้มข้นของ sucrose ให้ส่วนที่จะเป็นจุดรองรับรองรับ peak ของอนุภาค 146S ไวรัสแอนติเจนอยู่ที่กึ่งกลางของคอลัมน์พอดี

4.4.5 การแยก 146S ไวรัสแอนติเจน ใน sucrose gradient

เติมน้ำไวรัสที่ได้ในข้อ 4.4.3 ลงไปบน sucrose gradient ในข้อ 4.4.4 ปริมาตรไม่เกิน 1.8 มิลลิลิตรต่อหลอด นำไปใส่แกนหมุนปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูงที่ 26,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 30 นาที เพื่อให้อนุภาค 146S ของไวรัสที่ต้องการตกลงมาอยู่ตรงกึ่งกลาง sucrose gradient ระหว่าง 15% และ 45% พอดีแล้วนำไปทำการแยกให้ได้เฉพาะส่วนที่ต้องการใช้งานด้วยเครื่อง fraction collector ตั้งการหยดของ sucrose gradient ไม่เกิน 1 มิลลิลิตรต่อหลอด โดยกราฟจะขึ้นเป็น 2 ช่วง ช่วงแรกจะเป็นอนุภาค 75S ช่วงที่สองเป็นอนุภาค 146S ไวรัสแอนติเจน เก็บช่วงที่สอง โดยอาจบ่งชี้หลอดจุดที่กราฟเริ่มขึ้นจนหลอดสุดท้ายที่กราฟตกเก็บหลอดที่บรรจุ sucrose gradient ตลอดช่วงกราฟขึ้นครั้งที่ 2

4.4.6 การวัดปริมาณ 146S virus

นำ 146S ไวรัสแอนติเจน ที่ได้จากข้อ 4.4.5 ไปวัดความเข้มของแสงส่องผ่าน (Optimal Density, OD) ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Nanodrop) แล้วคำนวณอนุภาค 146S ไวรัสแอนติเจน เป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณอนุภาค 146S ไวรัสแอนติเจน ที่ได้ไม่ควรต่ำกว่า 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.5 การเตรียมแอนติซีรัมในสัตว์ทดลอง

การเตรียมแอนติซีรัมจากกระต่าย ทำโดยการฉีดอนุภาค 146S แอนติเจนที่เข้มข้นและบริสุทธิ์ของไวรัสสเตรนที่ต้องการ ผสมกับ complete freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ โดยใช้อนุภาค 146S แอนติเจนความเข้มข้นประมาณ 50 ไมโครกรัมต่อตัว หลังจากนั้น 28 วันฉีดซ้ำด้วยอนุภาค 146S แอนติเจนความเข้มข้นประมาณ 25 ไมโครกรัมต่อตัวของไวรัสสายพันธุ์เดิม ผสมกับ incomplete freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 เก็บเลือดและแยกซีรัมในวันที่ 10 หลังการฉีดแอนติเจนเข็มที่สอง

การเตรียมแอนติซีรัมจากหนูตะเภา ทำเช่นเดียวกับกระต่าย แต่ฉีดเพียงครั้งเดียวด้วยแอนติเจนที่เข้มข้นและบริสุทธิ์ของไวรัสประมาณ 25 ไมโครกรัมต่อตัว หลังจากนั้น 28 วัน ทำการเก็บเลือดและแยกซีรัม

4.6 การทวนสอบสารตรวจสอบและทดสอบความใช้ได้ของสารตรวจสอบ

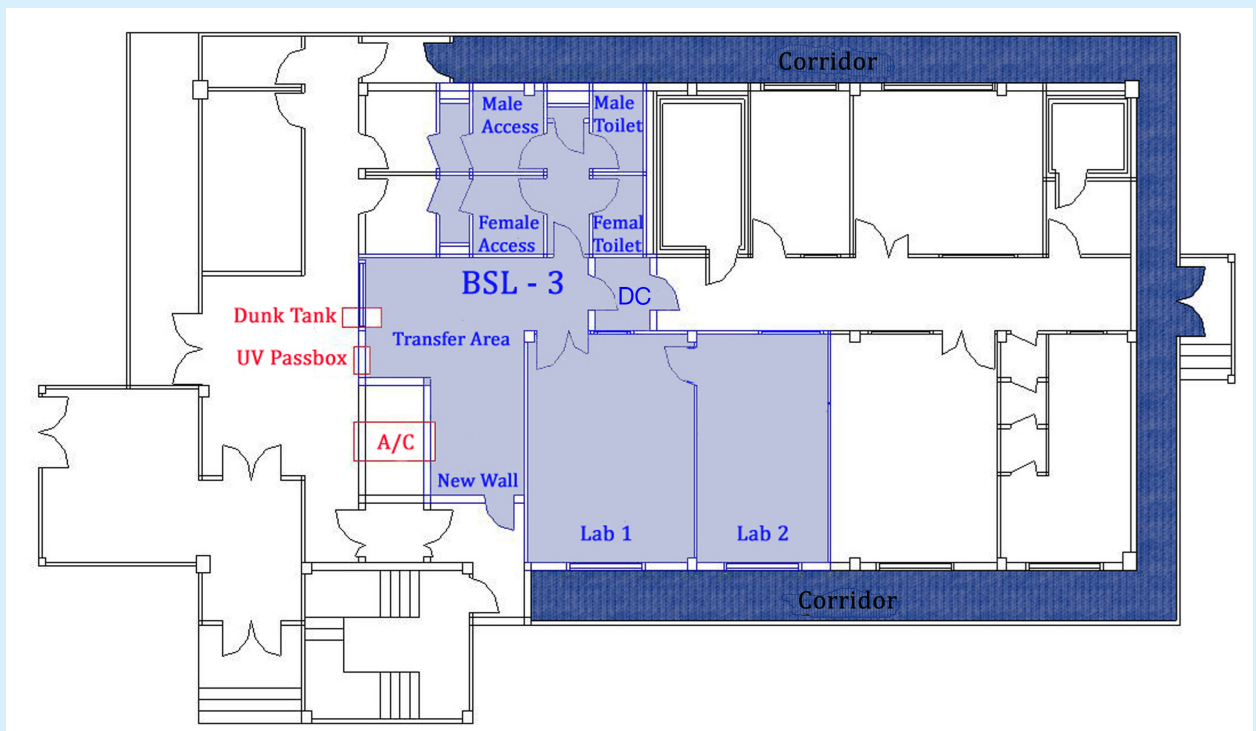
วิธีการทวนสอบสารตรวจสอบที่ใช้ในปัจจุบัน คือ การนำเอาแอนติซีรัมที่ได้จากการเก็บเลือดมาตรวจระดับค่าการใช้งานที่เหมาะสม ซึ่งค่าระดับแอนติซีรัมของกระต่ายและหนูตะเภา นั้น จะแตกต่างกันออกไป โดยระดับแอนติซีรัมของกระต่ายที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้งาน อยู่ประมาณ 1:5000 ส่วนของหนูตะเภา นั้นระดับแอนติซีรัมที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้งานอยู่ประมาณ 1:2000 จากนั้นนำไปทดลองใช้งานจริงเปรียบเทียบกับสารตรวจสอบที่ใช้งานอยู่ในปัจจุบัน ถ้าให้ผลการทดสอบที่ตรงกันถือว่าสารตรวจสอบชุดนี้ผ่านการทดสอบความใช้ได้ สามารถนำไปใช้ในงานทดสอบได้

บทที่ 5

การเตรียมความพร้อมของอาคารห้องปฏิบัติการที่มีความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 3 สำหรับตรวจวินิจฉัย FMD

อาคารห้องปฏิบัติการที่มีความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 3

อาคารห้องปฏิบัติการที่มีความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 3 เป็นอาคาร 3 ชั้น ชั้นทำงานเรียกว่า working floor หรือ working plant ชั้นบนเป็นระบบควบคุมอากาศ ส่วนชั้นล่างหรือชั้นใต้ดินเป็นระบบบำบัดน้ำเสีย บางห้องปฏิบัติการอาจเพิ่มชั้นของการวางท่อลมสำหรับอากาศเข้าออกหรือท่อน้ำเสียแยกออกมาอีก 2 ชั้นรวมเป็น 5 ชั้น ชั้นทำงานของอาคาร BSL-3 จะใช้หลักการ box in box เปรียบเสมือนมีกล่องซ้อนอยู่ในกล่องอีกชั้น โดยกล่องชั้นนอกจะเป็นโครงอาคารและกล่องชั้นในจะเป็นห้องปฏิบัติการ BSL-3 หรือ secure zone ที่มีความดันติดลบ



รูปที่ 1 แสดงแผนภูมิชั้นทำงานของห้องปฏิบัติการ BSL-3
สีเทาอักษรสีน้ำเงินแสดงส่วน BSL-3 หรือ Secure zone

(negative pressure) ระหว่างโครงอาคารและห้องปฏิบัติการ BSL-3 จะมีทางเดินโดยรอบห้องปฏิบัติการ (corridor) ซึ่งเป็นส่วน non-secure zone ที่มีความดันบวก (positive pressure) เพื่อดันอากาศเข้าในห้องปฏิบัติการและดันออกข้างนอกอาคารด้วยเสมือนเป็นสิ่งกีดขวาง (barrier) ป้องกันสิ่งแวดล้อมอีกชั้นนอกเหนือจากระบบความดันติดลบภายในห้องปฏิบัติการผนังระหว่างห้องปฏิบัติการกับ corridor รอบชั้นทำงานจะมีระบบอุปกรณ์ต่าง ๆ เพื่อป้องกันการรั่วไหลของเชื้อซึ่งจะเป็นจุดเชื่อมต่อหรือทางเข้าออกของผู้ปฏิบัติงานและวัสดุสิ่งของต่าง ๆ ด้วย

5.1 ระบบหมุนเวียนอากาศ

เป็นระบบควบคุมอากาศที่ไหลเวียนภายในห้องปฏิบัติการของอาคาร อยู่บริเวณชั้นบนของอาคารเป็นระบบปิดมีอุปกรณ์ที่สำคัญ เช่น pre-filter, air handling unit, exhaust fan, HEPA canister ท่อลมและปั๊มลมต่าง ๆ ส่วน chiller สำหรับทำความเย็นของอาคารจะอยู่บนหลังคาของอาคาร

หลักการ

เป็นการควบคุมอากาศออกจากห้องปฏิบัติการ BSL-3 หรือ secure zone ให้มากกว่าอากาศเข้าทำให้ภายใน secure zone มีความดันติดลบ (negative pressure) โดยระบบจะใช้พัดลม (exhaust fan) ขนาดใหญ่ ดึงอากาศจากภายนอกอาคาร กรองฝุ่นละอองเบื้องต้น pre-filter เข้ามาภายในอาคารผ่าน chiller เพื่อทำความเย็นแล้วปล่อยอากาศผ่าน filter ใน air handling unit (AHU) อีกครั้งก่อนปล่อยสู่ secure zone และดึงอากาศจาก secure zone กรองผ่าน HEPA filter ใน HEPA canister ก่อนปล่อยสู่ภายนอกโดยไม่หมุนเวียนอากาศกลับมาใช้

บางห้องปฏิบัติการอาจลดการใช้พลังงาน โดยผ่านอากาศจาก chiller ลงมาที่ corridor ก่อน จากนั้นจึงดูดอากาศเย็นจาก corridor (ไม่ได้ดูดอากาศจาก

ภายนอกโดยตรง) เข้า secure zone กลับมาผ่าน filter ใน AHU อีกครั้งก่อนจ่ายไปยัง secure zone

5.2 การทดสอบ HEPA canister

HEPA canister มีรูปทรงหลายแบบแล้วแต่การออกแบบของผู้ผลิตแต่ละแห่ง อาจเป็นรูปทรงคล้ายกล่อง หรือทรงกระบอกมีขนาดแตกต่างกัน HEPA canister บรรจุด้วยแผ่นกรองที่มีประสิทธิภาพสูงหรือ HEPA filter ไว้ภายใน ปกติจะอยู่ในชั้นบนของอาคาร บางห้องปฏิบัติการจะติดตั้ง HEPA filter ไว้ที่ผนังของห้องปฏิบัติการ HEPA filter ทำหน้าที่กรองอากาศที่ออกจาก secure zone ให้ปราศจากเชื้อก่อนปล่อยสู่สิ่งแวดล้อมภายนอก HEPA filter จะกรองอนุภาคที่ปนมากับอากาศที่มีขนาดเกินกว่า 0.3 ไมครอน หรือ 300 นาโนเมตร ได้ 99.997% โดย HEPA canister แต่ละเครื่องจะควบคุม secure zone แต่ละห้องแยกส่วนกันชัดเจน

หลักการ

เป็นการตรวจสอบ HEPA filter ที่ถูกบรรจุอยู่ใน HEPA canister โดยทำให้ปราศจากเชื้อก่อนแล้วจึงทดสอบการรั่วซึม ความเร็วลม ตามมาตรฐานที่ต้องการ

วิธีการ

5.2.1 การทำให้ปราศจากเชื้อใน HEPA canister (HEPA canister decontamination)

5.2.1.1 หยุดการทำงานในห้องปฏิบัติการ

5.2.1.2 ปิดวาล์วทางเดินอากาศทั้งจาก secure zone เข้าที่ HEPA canister และวาล์วทางเดินอากาศที่ออกจาก HEPA canister

5.2.1.3 ใช้เครื่องพ่นยาฆ่าเชื้อฟอร์มาลิน หรือไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แบบเคลื่อนที่ได้ กรณีใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะใช้อัตราส่วนและระยะเวลาตามที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ ส่วน formalin ให้ใส่ formalin 40 มิลลิลิตรต่อลูกบาศก์เมตร รวมกับน้ำ

สะอาดประมาณ 20 มิลลิเมตรต่อลูกบาศก์เมตร เพื่อเพิ่มความชื้นในอากาศ โดย formaldehyde gas จะฆ่าเชื้ออย่างมีประสิทธิภาพที่ความชื้นสัมพัทธ์สูงกว่า 70%

5.2.1.4 ต่อท่อ formaldehyde gas หรือ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ กับวาล์วทางเดินอากาศ HEPA canister ทั้งสองด้านกับเครื่องพ่นยาฆ่าเชื้อ

5.2.1.5 เมื่อเปิดเครื่องให้เริ่มทำงานพัดลมของเครื่องพ่นยาฆ่าเชื้อแบบเคลื่อนที่ได้จะเป็นตัวขับเคลื่อนให้ formaldehyde gas หรือ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไหลวนจากเครื่องพ่นยาฆ่าเชื้อเข้าสู่ HEPA canister ฝั่งด้าน secure zone ผ่าน HEPA filter แล้วเวียนออกจาก HEPA canister กลับเข้าสู่เครื่องพ่นยาฆ่าเชื้อเป็นวงกลมอย่างต่อเนื่อง แล้ววนเข้า HEPA canister อีกครั้งในระบบปิดเป็นเวลา 18 ชั่วโมง (ความเข้มข้นของ formaldehyde gas ใน HEPA canister มากกว่า 1000 ส่วนในล้านส่วน)

5.2.1.6 เมื่อครบ 18 ชั่วโมง ถ้าใช้ formaldehyde gas ให้ลดปฏิกิริยา โดยวิธีทำให้ formaldehyde gas สลายตัวด้วย Hydrogen peroxide

5.2.2 การทดสอบ HEPA canister

5.2.2.1 ทดสอบการรั่วซึมใช้ aerosol generator (smoke generator) ฉายอนุภาค Dioctylphthalate (DOP) หรืออนุภาคตัวอื่น ขนาด 300 นาโนเมตร ด้วยความดัน 140 ± 5 กิโลพาสกาล แล้วใช้ photometer scan HEPA filter ใน HEPA canister ระยะจาก probe ถึง filter 2.5 เซนติเมตร ระยะห่าง scan ความเร็วไม่เกิน 5 เซนติเมตรต่อวินาที

5.2.2.2 ทดสอบความเร็วลม โดยใช้ anemometer ทดสอบความเร็วลม 5 จุดแล้วหาค่าเฉลี่ยและความเร็วลมแต่ละจุดต้องห่างจากค่าเฉลี่ยไม่เกิน 15%

5.2.2.3 ทำความสะอาดใน HEPA canister ปิดฝา เปิดวาล์วทางเดินอากาศทั้งจาก secure zone ที่เข้า HEPA canister และวาล์วทางเดินอากาศที่ออกจาก HEPA canister

5.3 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อแบบ 2 ประตู

เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อแบบ 2 ประตู (2 door autoclave) อยู่ในชั้นทำงาน ใช้สำหรับนึ่งฆ่าเชื้อวัสดุสิ่งของที่ปนเปื้อนหรือคาดว่าจะปนเปื้อนออกจากห้องปฏิบัติการ

หลักการ

เป็นการลดการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ ก่อนนำวัสดุอุปกรณ์ เสื้อผ้า เครื่องมือพลาสติกและเครื่องแก้วออกจากห้องปฏิบัติการ ด้วยความร้อนจากไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (Lb/inch^2) เป็นเวลา 15 - 20 นาที

วิธีการ

5.3.1 เปิดประตูเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อแบบ 2 ประตู ฝั่ง secure zone

5.3.2 นำสิ่งของที่ต้องการจะนึ่งฆ่าเชื้อใส่เข้าไปภายในเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ

5.3.3 วาง indicator ต่าง ๆ ทางกลไก (probe) เคมี (strip) และทางชีวภาพ (biological test) สำหรับทดสอบการนึ่งฆ่าเชื้อของเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ โดยจุดที่จะวาง indicator ต่าง ๆ จะวางระหว่างผ้าหนา ๆ หรือในส่วนของห่ออุปกรณ์ที่ไอน้ำต้องผ่านเข้าถึงแล้วปิดประตู

5.3.4 เปิดทำงานเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ เพื่อเตรียมระบบอุณหภูมิ ความดัน ให้ถึงระดับที่ต้องการประมาณ 20 นาที โดยเครื่องแต่ละรุ่นจะมีสัญญาณเตือนเมื่อเครื่องพร้อมทำงานต่างกัน จากนั้นกดปุ่ม start

5.3.5 ใส่ password (ถ้ามี) แล้วให้เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อทำงานโดยจะอัตโนมัติประมาณ 1 ชั่วโมง

5.3.6 เมื่อเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อทำงานครบรอบสมบูรณ์/ไม่สมบูรณ์ เครื่องจะมีสัญญาณไซร้ต่างกันไป ถ้าเครื่องทำงานไม่สมบูรณ์ ประตูจากทางด้านนอก (non-secure zone) จะเปิดไม่ได้

5.3.7 เปิดประตูเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อจากทางด้าน non-secure zone นำเอาสิ่งของที่ทำการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วออกจากเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ

5.3.8 ปิดประตูเครื่องนิ่งฆ่าเชื้อจากทางด้าน non-secure zone

5.3.9 ปิดการทำงานของเครื่องนิ่งฆ่าเชื้อภายใน secure zone

5.4 การทดสอบประสิทธิภาพการทำให้ปราศจากเชื้อเครื่องนิ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำโดย biological test

เป็นการทดสอบการทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้ biological test ที่เป็น spore ของเชื้อแบคทีเรีย *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 สปอร์ของเชื้อนี้มีความคงทนกว่าจุลินทรีย์อื่น ๆ และไม่ก่อโรค จึงถูกนำมาใช้เป็นตัวชี้วัด หากสปอร์ของเชื้อนี้ถูกทำลายย่อมบ่งชี้ว่าเชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ จะถูกทำลายจากกระบวนการที่ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยไอน้ำ โดยดำเนินการดังนี้

5.4.1 นำ biological test หรือ spore test เป็น tube นำไปวางในจุดที่ไอน้ำต้องผ่านเข้าถึงความเข้มข้นสปอร์ *Geobacillus stearothermophilus* ตามที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด

5.4.2 ดำเนินการทำให้ปราศจากเชื้อในเครื่องนิ่งฆ่าเชื้อ

5.4.3 นำ spore test ไปบ่มที่ 56 องศาเซลเซียส อ่านผลที่ 24 และ 48 ชั่วโมง

5.4.4 การอ่านผล

อ่านผลการเปลี่ยนสีของ spores test ตามคู่มือจากบริษัทผู้ผลิต หากพบว่า spores test ให้สีบ่งชี้ว่ากระบวนการทำให้ปราศจากเชื้อไม่สมบูรณ์ให้ตรวจสอบหรือซ่อมแซมเครื่องนิ่งฆ่าเชื้อทันทีและเริ่มกระบวนการใหม่

5.5 air lock shower room

air lock shower room อยู่ในชั้นทำงาน ใช้เป็นทางเข้าและออก จาก secure zone ของผู้ปฏิบัติงาน โดยเวลาเข้าห้องปฏิบัติการผู้ปฏิบัติงานต้องถอดเสื้อผ้า เครื่องประดับ ทั้งหมดที่ห้องด้าน non-secure zone เดินผ่าน air lock shower room และเปลี่ยนชุดปฏิบัติการใน secure zone เพื่อทำงานในห้องปฏิบัติการ เวลาออกจากห้องปฏิบัติการ ผู้ปฏิบัติงานต้องถอดชุดปฏิบัติการไว้ด้านใน secure zone อาบน้ำ ทำความสะอาดร่างกายใน air lock shower room แล้วจึงสวมใส่เสื้อผ้าที่ถอดไว้ใน non-secure zone ออกมา

หลักการ

เป็นการลดการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์โดยการอาบน้ำ สระผม และทำความสะอาดร่างกาย เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 3 นาที ขณะออกจากห้องปฏิบัติการ

วิธีการ

5.5.1 การเข้าห้องปฏิบัติการ BSL-3 (secure zone) ของ ศอ.

5.5.1.1 บุคคลภายนอกที่ไม่ใช่เจ้าหน้าที่ของห้องปฏิบัติการ ต้องแจ้งห้องปฏิบัติการล่วงหน้า ก่อนเข้าปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ โดยแจ้งรายละเอียด จำนวนคน กำหนดวันเวลา พร้อมขนาดเครื่องแต่งกายและรองเท้า

5.5.1.2 ผู้ที่จะเข้าห้องปฏิบัติการ BSL 3 ได้ ต้องผ่านการอบรมตามกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์รับรอง หัวหน้าห้องปฏิบัติการ หรือเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ต้องให้ความรู้และความเข้าใจเพิ่มเติมเกี่ยวกับการทำงานภายใน BSL-3 ของ ศอ. ทั้งระบบการทำงาน ระบบความปลอดภัย และเชื้อต่าง ๆ ให้กับบุคคลภายนอกในข้อที่ 5.5.1.1 พร้อมลงลายมือชื่อในเอกสาร ใน “ข้อตกลงกับห้องปฏิบัติการ BSL-3 ศูนย์อ้างอิง FMD” ที่มีรายละเอียดเรื่องการห้ามเข้าฟาร์มที่เลี้ยงสัตว์กับคู่ เช่น โค กระบือ หรือสุกร เป็นระยะ

เวลา 7 วัน

5.5.1.3 เมื่อจะเข้าไปในพื้นที่ BSL-3 ผู้ปฏิบัติงานจะต้องลงลายมือชื่อ เหตุผล และเวลา พร้อมเซ็นชื่อกำกับใน “แบบฟอร์มการเข้า-ออก BSL-3” เปิดเข้าไปด้านในห้องล็อกเกอร์ถอดเสื้อผ้าทุกชิ้น ได้แก่ รองเท้า ถุงเท้า เครื่องประดับ หรืออื่น ๆ ใส่ในตู้ล็อกเกอร์ ที่จัดให้ ยกเว้นแว่นสายตา สามารถใส่คอนแทกซ์เลนส์ ใน secure zone แต่ให้ถอดทิ้งเมื่อออกจาก BSL-3

5.5.1.4 ผ่านเข้าประตู airlock โดยกดปุ่ม เปิดประตูถึงประตูบานที่ 1 ด้านนอกออกมา (อาจต้องใช้กำลังเล็กน้อยในการดึงเปิดประตูบานที่ 1 ด้านนอก เพราะใน air lock shower room มีความดันติดลบ) เข้าไปในห้องอาบน้ำ (ไม่ต้องอาบน้ำตอนเข้า BSL-3) ปิดประตูบานที่ 1 ด้านนอกให้สนิท

5.5.1.5 เปิดประตูบานที่ 2 ด้านใน โดยดึง ประตูบานที่สองเข้าหาตัว เข้าไปในห้องล็อกเกอร์ด้าน ใน secure zone ดึงปิดประตูให้สนิท ถ้าปิดไม่สนิทจะมีสัญญาณเตือน

5.5.1.6 แต่งตัวด้วยชุดปฏิบัติการที่เตรียมไว้ให้ จากนั้นเข้าไปด้านในห้องปฏิบัติการโดยที่เครื่อง แต่งกายทุกชนิด และรองเท้า จะถูกจัดไว้ในตู้ล็อกเกอร์ ด้านใน locker room ตามชื่อที่ระบุ

5.5.2 การออกจากห้องปฏิบัติการ BSL-3

5.5.2.1 เคาะประตูเพื่อให้สัญญาณกับบุคคล ที่อาจจะอยู่ในห้อง เปิดเข้าห้องล็อกเกอร์ถอดเครื่อง ชุดปฏิบัติการ ถุงเท้า รองเท้า แว่นสายตาเก็บใส่ตู้ ล็อกเกอร์เดิมที่เตรียมไว้กรณีมีความจำเป็นต้องนำ แว่นตาออกนอก secure zone ให้ทำการแช่แว่นตาใน ถึงยาฆ่าเชื้อ 1% glutaraldehyde ขณะที่ถอดชุด ปฏิบัติการ

5.5.2.2 เครื่องแต่งกายที่ใช้แล้วให้ใส่ใน ตะกร้าที่จัดไว้ให้

5.5.2.3 กดเปิดประตูบานที่ 2 ด้านใน secure zone ดันเปิดประตูบานที่ 2 เข้าไปใน air lock shower room

5.5.2.4 เข้าไปใน air lock shower room

แล้วดันประตูบานที่ 2 ด้านในปิดให้สนิท ถ้าปิดไม่สนิท จะมีสัญญาณเตือน ระหว่างนี้ประตูบานที่ 1 ด้านนอก จะเปิดไม่ได้ อาจมีไฟสัญญาณเตือนโชว์

5.5.2.5 ใช้สบู่น้ำกับแชมพูที่จัดไว้ให้ อาบน้ำ สระผม ขัดเล็บ บ้วนปาก และพ่นลมหายใจเข้า-ออกแรง ๆ เพื่อขจัดสิ่งนี้อาจปนเปื้อนออกจากร่างกายและลม หายใจ

5.5.2.6 หลังปิดประตูบานที่ 2 ด้านในสนิท (อาจจะ 3-5 นาที) เมื่อครบเวลาจะมีสัญญาณเตือน ให้ เปิดประตูบานที่ 1 ด้านนอกได้ให้ใช้แรงดันประตูบานที่ 1 ออกไปที่ห้อง ล็อกเกอร์ด้านนอกแล้วปิดประตูให้สนิท

5.5.2.7 แต่งตัว ใส่ผ้าเช็ดตัวและผ้าเช็ดเท้า ที่ใช้แล้วลงในตะกร้าผ้าที่จัดไว้ให้

5.5.2.8 ออกมาด้านห้องล็อกเกอร์

5.5.2.9 ลงลายมือชื่อและเวลาออกใน “แบบฟอร์มการเข้า-ออก BSL-3”

5.6 Dunk tank

Dunk tank มีลักษณะเป็นถังบรรจุยาฆ่าเชื้อ ติดตั้งแบบถาวรอยู่ในชั้นทำงาน dunk tank อาจมี ขนาดแตกต่างกันแล้วแต่ห้องปฏิบัติการโดยใช้ระยะ เวลาสั้น ๆ ในการฆ่าเชื้อวัสดุหรืออุปกรณ์ที่ต้องการ เช่น คีม ค้อน หรือหีบห่อบรรจุตัวอย่างที่มีเชื้อไวรัส ออกจากห้องปฏิบัติการ BSL-3

หลักการ

เป็นการลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์โดยใช้ การฆ่าเชื้อพื้นผิวด้วยยาฆ่าเชื้อ 1% glutaraldehyde ใน dunk tank เป็นเวลา 20 นาที

วิธีการ

5.6.1 เมื่อนำสิ่งของจากด้าน secure zone ออกไปใน non-secure zone ให้ใส่ลงในกล่องบรรจุ (dunk tank box) ซึ่งเป็นกล่องโปร่งที่ยาฆ่าเชื้อผ่านได้ ถ้าเป็นวัสดุที่ต้องการฆ่าเชื้อเฉพาะพื้นผิวให้นำใส่

dunk tank box ได้เลย สำหรับเชื้อไวรัส ให้ตรวจการรั่วซึมของหลอดบรรจุไวรัสก่อนใส่ใน dunk tank box หลอดที่บรรจุไวรัส ควรเป็นหลอดฝาเกลียวที่ปิดเกลียวได้สนิท มีการพันด้วยพาราฟิล์มรอบฝาอีกครั้งป้องกันการหกรั่วไหลของไวรัส และควรบรรจุในถุงซิปปิดสนิทก่อนใส่ลงในกระบอกพลาสติกทรงกลมที่มีฝาเกลียวปิดสนิท และควรพันรอบฝากระบอกพลาสติกทรงกลมด้วยเทปกาวยีกครั้ง

5.6.2 กดปุ่มสีเขียวให้ไฟกระพริบ เปิดฝา dunk tank ด้าน secure zone ค่อย ๆ วาง dunk tank box ใน dunk tank แล้วดัน dunk tank box ออกด้านนอกไปสู่บริเวณที่จะหยิบออกได้ง่ายจาก non-secure zone ปิดฝา dunk tank ระหว่างนี้ไฟสีเขียวและแดงด้าน secure zone จะกระพริบและเปิดไม่ได้ (ผู้ใช้งานอาจตั้งโปรแกรมให้เปิดด้านในใหม่ได้)

5.6.3 ระหว่างรอ 20 นาที ไฟแดงด้าน non-secure zone จะกระพริบและเปิดฝา dunk tank ไม่ได้

5.6.4 เมื่อครบ 20 นาที เปิดฝา dunk tank ด้าน non-secure zone โดยผู้ปฏิบัติงานควรสวมใส่ถุงมือยาง จากนั้นเอา dunk tank box ออกมาจาก dunk tank นำของออกจาก dunk tank box ขับน้ำให้แห้งถ้าเป็นเชื้อไวรัสให้ใส่ในภาชนะมีฝาปิด ที่เตรียมไว้ จากนั้นปิดกล่อง dunk tank box ค่อย ๆ วางไว้ที่เดิมใน dunk tank แล้วดันเข้าด้าน secure zone ปิดฝา dunk tank

5.6.5 นำ dunk tank box ออกทางด้าน secure zone ล้างเก็บไว้ใช้ครั้งต่อไป

5.7 UV pass box

UV pass box เป็นพื้นที่คล้ายห้องว่างเล็ก ๆ อยู่ในพื้นที่การปฏิบัติงาน ใช้สำหรับนำกล่องตัวอย่าง เครื่องมือหรือวัสดุอุปกรณ์ชิ้นที่ไม่ใหญ่จาก non-secure zone เข้าห้องปฏิบัติการ BSL-3 หรือ secure zone บางห้องปฏิบัติการอาจดัดแปลงเป็นรูปแบบอื่น เช่น ท่อลมที่มีรางเลื่อนจากนอกห้องเข้าสู่ในห้อง

อย่างไรก็ตาม วัตถุประสงค์การใช้งานจะเหมือนกันคือนำสิ่งของเข้า secure zone เท่านั้น

หลักการ

เป็นการลดการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ใน UV pass box เพื่อลดความเสี่ยงเรื่องการรั่วซึมของอากาศ โดยการใช้การฆ่าเชื้อด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตใน UV pass box ที่ความเข้มของแสง 400 มิลลิวัตต์ต่อตารางเมตร เป็นเวลา 20 นาที แบบอัตโนมัติทุก ๆ ครั้งหลังจากปิดประตู pass box จากด้าน secure zone คือ หลังจากนำกล่องตัวอย่าง เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบเข้าไปใน secure zone แล้ว

วิธีการ

5.7.1 เมื่อนำสิ่งของจากด้าน non-secure zone เข้าไปใน secure zone ให้กดปุ่ม เปิดประตูนำสิ่งของ เข้าไปภายใน pass box ปิดประตูให้สนิท สังเกตจากไฟที่สวิทช์ปิด-เปิดจะโชว์สีเขียวตามเดิม สามารถนำสิ่งของใส่เพิ่มเติมได้ทราบใดที่ด้าน secure zone ยังไม่เปิดนำของเข้าด้านใน

5.7.2 เมื่อต้องการนำสิ่งของจาก pass box เข้าไปใน secure zone ให้กดปุ่มเปิดจากด้านสีเขียว ดึงคันโยกเข้าหาตัวเพื่อปลดล็อกสลักของประตู เปิดประตูนำสิ่งของจาก pass box ออกมาให้หมด แล้วปิดประตูให้สนิท ระบบฆ่าเชื้อด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตจะทำงานโดยอัตโนมัติเป็นเวลา 20 นาที โดยระหว่างที่ระบบการฆ่าเชื้อทำงานจะไม่สามารถเปิดประตูทั้งสองข้างได้ สังเกตจากไฟที่สวิทช์ปิด-เปิด จะโชว์สีแดง ทั้งด้านนอกและด้านใน (ผู้ใช้งานอาจตั้งโปรแกรมให้เปิดด้านในใหม่ได้ โดยเฉพาะกรณีที่ปิดประตูโดยไม่ตั้งใจ หรือลืมนำของออกจาก UV pass box แต่เวลาฆ่าเชื้อด้วย UV จะเริ่มนับใหม่)

5.7.3 เมื่อระบบฆ่าเชื้อทำงานครบ 20 นาที ไฟที่สวิทช์ปิด-เปิด จะโชว์สีเขียว ทั้งด้าน secure zone และด้าน non-secure zone แสดงว่าจบการทำงานของระบบฆ่าเชื้อด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต ประตูปิด-เปิด

ของ UV pass box จะสามารถเปิดได้ที่ละ 1 ด้านเท่านั้น และเมื่อเปิดด้าน secure zone ระบบฆ่าเชื้อด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตจะเริ่มทำงานใหม่ทุกครั้ง

5.8 Decontamination chamber

Decontamination chamber (DC) จะอยู่ในชั้นทำงานโดยเชื่อมต่อระหว่าง secure zone กับ non-secure zone เป็นห้องที่จัดทำมาสำหรับการฆ่าเชื้อที่อาจปนเปื้อนมากับเครื่องมือ วัสดุ อุปกรณ์ต่าง ๆ ที่มีขนาดใหญ่ เมื่อถูกนำออกมาจากห้องปฏิบัติการโดยเฉพาะการออกแบบ DC ออกแบบมาเฉพาะให้สามารถใช้กับสารเคมีที่ห้องปฏิบัติการต้องการใช้ฆ่าเชื้อ ในที่นี่จะอธิบายห้องปฏิบัติการที่ใช้ formaldehyde gas ในการฆ่าเชื้อใน DC ซึ่งห้องปฏิบัติการอื่นสามารถปรับเปลี่ยนใช้สารเคมีตัวอื่นที่เหมาะสมแทนได้ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หรือคลอรีนไดออกไซด์

หลักการ

เป็นการฆ่าเชื้อด้วย formaldehyde gas ในระบบปิดโดยการทำให้ paraformaldehyde ระเหยเป็นก๊าซด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส โดยใช้ silicon oil เป็นสื่อให้ความร้อน เมื่อให้ความร้อน silicon oil (ที่มีจุดเดือด 220 องศาเซลเซียส) จนอุณหภูมิสูงเกิน 120 องศาเซลเซียส ทำให้ paraformaldehyde ระเหยกลายเป็นก๊าซ โดยไม่ไหม้ (burn) ติดกระทะ และใช้ไอน้ำเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ (RH) ให้อยู่ในระดับที่จะทำให้ formaldehyde gas ฆ่าเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพคือ 75-90%

เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีที่สำคัญ

5.8.1.1 paraformaldehyde ให้ใช้ปริมาณ paraformaldehyde 5 กรัมต่อคิวบิกเมตร จะทำให้เกิด formaldehyde gas เป็นตัวฆ่าเชื้อ

5.8.1.2 silicon oil ที่ระดับความหนืด 350-450

เซนตริสโตก โดย silicon oil จะมีจุดเดือดจะสูงกว่า paraformaldehyde โดย silicon oil จะทำหน้าที่ให้ paraformaldehyde เป็นก๊าซอย่างสมบูรณ์

5.8.1.3 น้ำสะอาด 15-25 มิลลิลิตรต่อคิวบิกเมตร ใช้เพื่อเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศให้อยู่ในช่วง 75-90%

5.8.1.4 เครื่องมือวัดความเข้มข้นของ formaldehyde gas

5.8.1.5 เครื่องมือบันทึกความชื้นและอุณหภูมิ

วิธีการ

5.8.2 การเตรียมห้อง DC ก่อนฆ่าเชื้อ การเตรียมห้องจะดำเนินการด้าน secure zone โดยเจ้าหน้าที่จะจัดเตรียมอุปกรณ์สำหรับใส่ paraformaldehyde น้ำ พัดลม พร้อมต่อระบบสายไฟของอุปกรณ์ต่าง ๆ ให้พร้อมทำงานได้ทันทีเมื่อกดปุ่ม start โดยจะทำงานเรียงตามลำดับดังนี้

- เติม paraformaldehyde ในกระทะที่บรรจุ silicon oil ตั้งเวลาให้พอดีหรือมากกว่ากับ paraformaldehyde ระเหยหมด แล้วเปิดสวิตซ์ทิ้งไว้

- เปิดสวิตซ์พัดลมทิ้งไว้ ซึ่งพัดลมที่ใช้นี้เป็นพัดลมแบบตั้งโต๊ะ ขนาดประมาณ 12 นิ้ว ทั้งนี้ห้องปฏิบัติการอื่น สามารถเลือกใช้ขนาดของพัดลมได้ตามความเหมาะสมของขนาดของห้อง DC

- เติมน้ำสะอาดในกระทะ ตั้งเวลาให้น้ำระเหยเป็นไอน้ำทั้งหมดแล้วเปิดสวิตซ์ทิ้งไว้

- ติดตั้งเครื่องมือบันทึกความชื้นและอุณหภูมิ

- ปิดท่อน้ำทิ้งทั้งหมด (ถ้ามี) เพราะ formaldehyde gas จะละลายได้ดีในน้ำ ทำให้ความเข้มข้นไม่พอต่อการฆ่าเชื้อ

5.8.3 เมื่อเตรียมห้อง DC เรียบร้อยแล้วเจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการจะแจ้งเจ้าหน้าที่ผู้รับผิดชอบซึ่งอยู่ด้าน non-secure zone กดปุ่มสตาร์ทเพื่อเปิดระบบฆ่าเชื้อ ระบบจะทำงานดังนี้

- ความร้อนจะทำให้ silicon oil มีอุณหภูมิ

สูงเกิน 120 องศาเซลเซียส ทำให้ Paraformaldehyde กลายเป็น formaldehyde gas (มีปริมาณความเข้มข้นในอากาศมากกว่า 1000 ส่วนในล้านส่วน) ผู้เปิดระบบด้าน non-secure zone ต้องคอยสังเกตกระทะที่บรรจุ Paraformaldehyde ว่ามีคล้ายฟองเดือดขึ้นหรือไม่ ถ้ามีแสดงว่าระบบการระเหยของ formaldehyde gas ทำงาน

- พัฒนาระบบทำงานกระจาย formaldehyde gas ไปทั่วห้อง
- น้ำจะกลายเป็นไอน้ำ เพื่อเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ

5.8.4 หลังจากระบบฆ่าเชื้อทำงานอย่างน้อย 15 ชั่วโมง ระบบควบคุมอากาศจะปล่อยลม (purge) ออกนอกห้อง DC เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

5.8.5 หลังจากระบบฆ่าเชื้อทำงานครบ 18 ชั่วโมง ให้ปฏิบัติดังนี้

- เจ้าหน้าที่ด้าน non-secure zone ใส่ full face mask และ PPE ที่เหมาะสมเปิดประตูห้อง DC ใช้ formaldehyde meter วัด formaldehyde gas ในห้อง DC ไม่ควรสูงกว่า 1 ส่วนในล้านส่วน
- เปิดห้อง นำวัสดุ อุปกรณ์ออก ทำความสะอาดใน DC แล้วแจ้งเจ้าหน้าที่ใน secure zone ว่าการฆ่าเชื้อใน DC เสร็จเรียบร้อยแล้ว

5.9 ระบบบำบัดน้ำเสีย (waste water treatment)

ระบบบำบัดน้ำเสียจะอยู่บริเวณชั้นล่างของอาคาร โดยการบำบัดน้ำเสียของอาคาร BSL-3 จะตั้งระบบโปรแกรมให้ทำงานโดยอัตโนมัติ ระบบบำบัดน้ำเสียสามารถเลือกใช้ได้ทั้งความร้อนและสารเคมี สำหรับ FMD จะเลือกใช้สารเคมีในการฆ่าเชื้อแทนระบบการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน เนื่องจาก FMDV ไม่ได้มีความทนทานมากนักและเมื่อเทียบต้นทุนสารเคมีกับการใช้พลังงานพบว่าการใช้สารเคมีมีต้นทุนในภาพรวมถูกกว่าและมีความปลอดภัยสูงกว่า

หลักการ

เป็นการฆ่าเชื้อ FMDV ในน้ำเสียโดยใช้สภาพความเป็นด่างที่ pH ประมาณ 12 ซึ่งสามารถฆ่าเชื้อ FMDV ได้อย่างสมบูรณ์ แล้วปรับสภาพให้เป็นกลางก่อนปล่อยออกจากอาคาร โดยน้ำเสียต่าง ๆ จากห้องปฏิบัติการ BSL-3 จะไหลผ่านท่อน้ำทิ้งในระบบปิดมารวมกันที่ถังน้ำเสีย (septic tank) เพื่อกักเก็บของเสียที่เป็นของแข็งไว้ น้ำเสียจะถูกส่งไปที่ถังกักเก็บน้ำเสีย (storage tank) สะสมไว้จนถึงระดับหนึ่งที่ตั้งไว้ก็จะถูกส่งไปเติมต่างให้ pH ประมาณ 12 เพื่อฆ่าเชื้อที่ถังบำบัดเชื้อ (decontamination tank) แล้วส่งไปเติมกรดปรับสภาพให้เป็นกลางที่ถังปรับค่ากรด-ด่าง (neutralization tank) ก่อนปล่อยออกสู่น้ำทิ้งนอกอาคาร

วิธีการ

5.9.1 ของเหลวหรือน้ำที่ใช้แล้วจากส่วนห้องปฏิบัติการ ได้แก่ น้ำเสียจากอาคาร BSL-3 ทั้งน้ำเสียจากห้องอาบน้ำชาย-หญิง ห้องสุขา น้ำจากอ่างภายในห้องปฏิบัติการ ท่อน้ำทิ้งจาก dunk tank และ เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อแบบ 2 ประตูจะไหลลงมารวมกันที่ถังน้ำเสียซึ่งเป็นถังไฟเบอร์ขนาดใหญ่ เพื่อกักแยกของเสียที่เป็นของแข็งออกจากส่วนที่เป็นส่วนน้ำเสีย จากนั้นน้ำเสียจะถูกปั๊มไปยังถังกักเก็บน้ำเสียซึ่งเป็นถังไฟเบอร์ขนาดใหญ่ (ความจุ 20 ลูกบาศก์เมตร)

5.9.2 เมื่อระดับน้ำเสียในถังกักเก็บน้ำเสียมีปริมาณได้ระดับถึงขีดที่ตั้งลูกลอยไว้ (2-3 ลูกบาศก์เมตร) ระบบควบคุมการบำบัดน้ำเสียจะเริ่มทำงานแบบอัตโนมัติโดยจะปั๊มน้ำเสียจากถังกักเก็บน้ำเสียไปยังถังบำบัดเชื้อ โดยมีเซนเซอร์เป็นตัวตัดปั๊มเมื่อระดับน้ำเสียในถังบำบัดเชื้อถึงระดับลูกลอยที่ตั้งไว้คือ 1 ลูกบาศก์เมตร

5.9.3 มอเตอร์ปั่นผสมของ ถังบำบัดเชื้อจะเริ่มทำการปั่นผสมน้ำเสียในขณะเดียวกันระบบจะสั่งการให้ปั๊มต่างเข้มข้นหรือ 32% sodium hydroxide (NaOH) จากถังสต็อกที่ตั้งอยู่ภายนอกอาคารมาที่ถังบำบัดเชื้อ เพื่อเพิ่มความเป็นด่าง ให้ได้จนถึง pH 12

โดยภายในถังจะมี pH probe วัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำเสียในถัง ซึ่งระยะนี้จะเป็นกระบวนการฆ่าเชื้อ FMDV (ถ้าค่า pH ของน้ำเสียในถังต่ำกว่า 12 ปัมพ์ของถังจะทำงานโดยเติมด่างอัตโนมัติเพื่อปรับค่า pH ให้ถึง 12 แล้วปัมพ์จะหยุดทำงาน) มอเตอร์ปั่นผสมจะปั่นน้ำเสียผสมกับด่างเข้มข้นให้เข้ากันเพื่อฆ่าเชื้อไวรัสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นปัมพ์ของถังบำบัดเชื้อจะถ่ายน้ำเสียที่ถูกฆ่าเชื้อแล้วแต่ยังมี pH 12 จากถังบำบัดเชื้อไปยังถังปรับค่ากรด-ด่าง จนถึงระดับลูกลอยตัวต่ำสุดของถังบำบัดเชื้อจึงหยุดทำงาน

5.9.4 มอเตอร์ปั่นผสมของถังปรับค่ากรด-ด่างจะทำงานโดยเริ่มปั่นผสมน้ำเสียที่ฆ่าเชื้อไวรัสแล้วในขณะเดียวกันระบบจะสั่งการให้ปัมพ์กรดเข้มข้นหรือ 35% hydrochloric acid (HCl) จากถังสต็อกที่ตั้งอยู่ภายนอกอาคารมาที่ถังปรับค่ากรด-ด่าง มอเตอร์ปั่นผสมจะปั่นน้ำเสียผสมกับกรดเข้มข้นให้เข้ากันเพื่อปรับ pH ให้เป็นกลางเป็นเวลา 30 นาที (ถ้าค่า pH ของน้ำเสียในถังสูงกว่า 7 ปัมพ์ของกรดจะทำงานโดยเติมกรดอัตโนมัติเพื่อปรับค่า pH ลงมาให้ถึง 7 แล้วปัมพ์จะหยุดทำงาน) จากนั้นปัมพ์ของอีกตัวหนึ่งถึงถังปรับค่ากรด-ด่างจะปัมพ์น้ำเสียที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างแล้ว ทิ้งออกไปยังบ่อพักซึ่งเป็นระบบปิด และมีการติดตั้งระบบสูบน้ำเสียเหล่านี้ไปรวมที่บ่อใหญ่เพื่อรอเข้าระบบบำบัดน้ำเสียส่วนกลางอีกครั้ง ซึ่งเป็นการจบระบบการบำบัดน้ำเสียใน 1 รอบ

บรรณานุกรม

- ไชยา สว่างประโคน และนพพร พัฒนประสิทธิ์. 2543. การทดสอบหาปริมาณอนุภาค 146S ในวัคซีน FMD สำหรับสุกรชนิดน้ำมันแบบรวม 3 ไทป์ โดยวิธี sucrose density gradient ultracentrifugation. วารสารชีวภัณฑ์. 10(1-2): 61-71.
- ปณิธาน ทองทา วิไล ลินจงสูงภักข และรัตน์ ทองทา. 2555. การศึกษาด้านระบาดวิทยาาระดับโมเลกุลของไวรัส FMD ไทป์โอที่ระบาดในประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ.2458–2550. วารสารสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ. 3(1): 18-27.
- มนตรี มนต์มธุรพจน์ และเชาวฤทธิ์ บุญมาทิต. 2535. การวัดหาปริมาณ 146S อนุภาคสมบูรณ์ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย. วารสารชีวภัณฑ์. 3(1): 31-41.
- ร่มพฤษ อุดล และสมใจ กมลศิริพิชัยพร. 2545. การหาความสัมพันธ์ทางซีโรโลยีระหว่างไวรัสท้องที่ กับไวรัสที่ใช้ในการผลิตวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยไทป์โอ ในประเทศไทยโดยวิธีลิควิดเฟส นิวทรอลไลซิง อีไลซ่า. วารสารชีวผลิตภัณฑ์. 11(1-2): 37-44.
- ร่มพฤษ อุดล และวิไล ลินจงสูงภักข. 2549. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแอนติเจนของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่แยกได้จากประเทศไทย และในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ในปี พ.ศ. 2547-2548. สัตวแพทย์สาร. 57(1): 15-23.
- ร่มพฤษ อุดล ดิลก อ้วนพรมมา และปณิธาน ทองทา. 2551. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแอนติเจนทางซีรัมวิทยา (ค่า r) ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ระบาดในประเทศไทย และในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในปี 2549-2550. วารสารสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ. 3(1): 52-60.
- วิไล ลินจงสูงภักข สุนันท์ ร่มลำดวน สมใจ กมลศิริพิชัยพร และธนรัตน์จามกิจ. 2543. การเปลี่ยนคุณสมบัติทางแอนติเจนของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ระบาดในประเทศไทย. บทความประกอบการประชุมทางวิชาการ สัตวแพทย์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38, 1-4 กุมภาพันธ์ 2543
- Alexandersen, S., Zhang, Z., Donaldson, A.I. and Garland, A.J.M. 2003. The pathogenesis and diagnosis of foot-and-mouth disease. J. Comp. Pathol. 129, 1-36.
- Basara, M., Catley, A., Machuch, D., Laqua, H., Puot, E., Tap Kot and Dikior, D. 2008. Foot-and-mouth disease vaccination in South Sudan: benefit-cost analysis and livelihood impact. Transbound. Emerg Dis. 55, 339-351.
- Bayissa, B., Ayelet, G., Kyule, M., Jibril, Y. and Gelaye, E. 2011. Study on seroprevalence risk factor and economic impact of foot- and-mouth disease in Borena pastoral and agro-pastoral system, southern Ethiopia. Trop. Ani. Health Prod. 43, 759-766.
- Beck, E. and Strohmaier, K. 1987. Subtyping of European FMDV outbreak strains by nucleotide sequence determination. Virol J. 61: 1621-1629
- Bittle, J.L., Houghten, R.A., Alexander, H., Shinnick, T.M., Sutcliffe, J.G. and Lerner, R.A. 1982. Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized

- peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature*. 298: 30-33.
- Bird, B.R. and Forrester, F.T. 1981. Basic Laboratory Techniques in Cell Culture. U.S. Department of Health and Human Services. Appendix I. Basic reagent for cell culture. p. 148-149.
- Brooksby, J.B. 1968. Definition for serological investigation. International Symposium on Foot and Mouth Disease. Variants and immunity :Lyon. Symposium Series. Immuno. Standard. 8: 1-10.
- Burman, A., Clark,S., Abrescia,G.A.N., Fry,E.E., Stuart,I.D. and Jackson,T. 2006. Specificity of the VP1 GH Loop of Foot-and-Mouth Disease Virus for α v Integrins. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1617245/> Accessed April 1, 2020.
- Domingo, E., Escarmis, C., Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C.M., Carrillo, E, Nunez, J.I. and Sobrino, F.2003. Evolution of foot-and-mouth disease virus. *Virus Res*. 91:47-63.
- Doughty, W.J., Lunt, R.A., Linchongsubongkoch, W., Gleeson, L.J. and Kongthon, A. 1995. Serological comparison of type A foot and mouth disease virus isolates from Thailand. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Eqiz*. 14(3): 547-555.
- Hamblin, C., Barnett, I.T.R. and Hedger, R.S. 1986. A new enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the antibodies against foot and mouth disease virus. *J. Immunol. Methods*. 93: 122-129.
- Jamal, S.M. and Belsham, G.J. 2013. Foot-and-mouth disease: past, present and future. *Vet. Res*. 44, 116.
- Kamolsiripichaiporn, S. and Udon, R. 2006. Serological Correlation of Type A Foot-and-Mouth Disease Virus Isolated from Thailand during 2003-2005. 1(2) 117-125. [Online]. Available: http://www.dld.go.th/niah/Publishing/eJournal/Index_v1n2.html.
- Kitching, R.P., Rendle, R. and Ferris, N.P. 1988. Rapid correlation between field isolates and vaccine strains of foot and mouth disease virus. *Vaccine*. 6: 403-408.
- Knight-Jones, T.J.D. and Rushton, J. 2013. The economic impacts of foot and mounth disease what are they, how big are they and where do they occur. *Prev. Vet. Med*. 112, 161-173.
- Knowles, N.J., Wadsworth, J., Bachanek-Bankowska, K. and King, D.P. 2016. VP1 sequencing protocol for foot and mouth disease virus molecular epidemiology. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz*. 35(3): 1-28.
- Linchongsubongkoch, W., Kamolsiripichaiporn, S., Romlumdoan, S. and Janukit S. 1991. Subtyping of type Asia1 foot and mouth disease virus by liquid phase neutralizing ELISA. *Proceedings in the 10th Annual Livestock Conference*. 404-415.
- Linchongsubongkoch,W., Kamolsiripichaiporn S. and Janukit S. 1992. Subtyping of type O foot and mouth disease virus by liquid phase neutralizing ELISA. *J. Thai.Vet Med. Associ*. 43(3): 29-39.
- Lunt, R.A., Linchongsubongkoch, W. and Gleeson, L.J. 1994. A modified liquid phase blocking ELISA used to assess type O foot and mouth disease virus antigenic variation in Thailand. *Vet. Microbiol*. 42: 79-90.
- Pereira, H.G. 1977. Subtyping of foot and mouth disease virus. International Symposium on foot and mouth disease, Lyon, 1976. *Develop. Boil. Standard*. 35: 167-174.
- Pluimer, F., Akkerman, A., Van Der Wal P., Dekker, A. and Bianchi, A. 2002. Lessons from the foot and mouth disease outbreak in the Netherlands in 2001. *Rev. Sci. Tech*. 21, 711-721.
- Rodriguez, L.L. and Gay, C.G. 2011. Development of vaccines toward the global control and eradication of foot-and-mouth disease. *Expert Rev. Vaccines*. 10, 377–387.
- Roeder, P.L. and Le Blanc Smith, P.M. 1987. Detection and typing of foot and mouth disease virus by enzyme linked immunosorbent assay : a sensitive, rapid and reliable technique for primary diagnosis. *Res. Vet. Sci*. 43: 225-232.
- Rweyemamu, M.M. 1978. The selection of vaccine strains of foot and mouth disease virus. *Br. Vet. J*. 134: 63-67.

- Samuel, A.R., Ouldrige E.J., Arrowsmith, A.E.M., Kitching, R.P. and Knowles, N.J. 1990. Antigenic analysis of serotype O of foot and mouth disease virus isolates from the Middle East 1981-1988. *Vaccine*. 8: 390-396.
- Seeyo, K.B., Nishi, T., Kawaguchi, R., Uagvanijban, S., Udon, R., Fugai, K., Yamakawa, M. and Rukkwamsuk, T. 2020. Evolution of antigenic and genetic characteristics of foot-and-mouth disease virus serotype A circulating in Thailand, 2007-2019. *Virus Research*. V.290 December 2020. [Online] Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016817022031073X> Accessed December 5, 2020.
- Thompson, D., Muriel, P., Russell, D., Osborne, P., Bromley, A., Rowland, M., Creigh-Tyte, S. and Brown, C. 2002. Economic costs of the foot and mouth disease outbreak in the United Kingdom in 2001. *Rev. Sci. Tech.* 21, 675-687.
- World Organisation for Animal Health (OIE). 2019. Chapter 3.1.8 Foot and mouth disease (Infection with foot and mouth disease virus), version Adopted in May 2017. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* 2019. [Online] Available: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.08_FMD.pdf. Accessed April 1, 2020.

ภาคผนวก

การเตรียมตัวอย่างสารละลายแขวนลอยสำหรับตรวจแอนติเจน

ก่อนที่จะนำตัวอย่างตรวจหาและจำแนกซีโรไทป์ไวรัส ตัวอย่างที่ส่งมาจากพื้นที่ที่จะถูกเตรียมให้เป็นสารละลายแขวนลอย 10% (10% suspension) ใน 0.04M PBS โดยการเตรียมตัวอย่างจะดำเนินการในตู้ชีวนิรภัย (Biosafety cabinet class II) มีขั้นตอนดังนี้

1. ใช้กรรไกรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ตัดชิ้นตัวอย่างที่เป็นชิ้น ๆ มาปริมาณ 1 กรัม
2. ตัดตัวอย่างเนื้อเยื่อเป็นชิ้นเล็ก ๆ ค่อย ๆ บดตัวอย่างด้วยทรายละเอียดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
3. เติม 0.04M PBS ปริมาตร 9 มิลลิลิตร (ให้เป็น 10% ของสารละลายแขวนลอย)
4. นำไปปั่นเพื่อตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดทำความเย็น (refrigerated centrifuge) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วประมาณ 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที
5. กรองด้วย syringe filter ขนาด 0.45 ไมครอน แล้วแยกเก็บตัวอย่างสารละลายแขวนลอย หลอดละ 1 มิลลิลิตร

การตรวจหาและจำแนกซีโรไทป์ FMDV โดยวิธี ELISA typing

1. เคลือบเพลทด้วย rabbit trapping antibody FMDV ซีโรไทป์โอ เอ และ เอเซียวัน หรือซีโรไทป์ที่ต้องการตรวจ ซึ่งปรับความเข้มข้นเหมาะสมแล้ว (working dilution) เจือจางโดยใช้ coating buffer (0.05M carbonate bicarbonate buffer pH 9.5) หยดลงบน ELISA plate กันเรียบปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปวางบนเครื่องเขย่าแนวราบ (orbital shaker) ใช้ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน
2. ล้างเพลทด้วย 0.01M PBS จำนวน 5 ครั้ง เคาะเพลทให้แห้ง
3. เตรียมสารละลายแอนติเจนควบคุม (antigen control) และสารละลายแขวนลอย 10% ของตัวอย่างที่ต้องการจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสใน microtube โดยใช้ ELISA diluent (PBST) ทำการเจือจางแอนติเจนควบคุม (ตัวอย่างไม่ต้องเจือจาง) แบบ 2 fold serial dilution ไป 3 dilution หยดลงในเพลท ปริมาตร 50

ไมโครลิตรต่อหลุม ปิดฝาเพลท หรือใช้ plate sealer ปิด นำไปวางบนเครื่องเขย่าแนวราบ (orbital shaker) ใช้ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4. ล้างเพลทด้วย 0.01M PBS จำนวน 5 ครั้ง เคาะเพลทให้แห้ง

5. ใส่สารละลาย guinea pig detecting antibody สำหรับเชื้อ FMDV ตามข้อ 1 ซึ่งปรับความเข้มข้นเหมาะสมแล้ว ลงใน ELISA blocked diluent (PBST+5% skimmed milk) หยดลงเพลท ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปวางบนเครื่องเขย่าแนวราบ (orbital shaker) ใช้ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

6. ล้างเพลทด้วย 0.01M PBS จำนวน 5 ครั้ง เคาะเพลทให้แห้ง

7. เติมสารละลาย horseradish peroxidase conjugate ซึ่งปรับความเข้มข้นเหมาะสมแล้วใน ELISA blocked diluent หยดลงเพลท ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปวางบนเครื่องเขย่าแนวราบ (orbital shaker) ใช้ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

8. ล้างเพลทด้วย 0.01M PBS จำนวน 5 ครั้ง เคาะเพลทให้แห้ง

9. เติมสารละลาย 0.01% TMB substrate (tetramethylbenzidine substrate) หยดลงในเพลท ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที

10. เติม Stop solution (1M H₂SO₄) ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ substrate

11. อ่านค่าความเข้มของแสง (optical density; OD) ด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 450 nm (กรณีใช้ orthophenylene diamine; OPD เป็น substrate จะอ่านค่า OD ที่ความยาวคลื่น 492 nm)

การเพาะแยกเชื้อและเพิ่มปริมาณเชื้อ FMDV (Virus isolation)

1. นำเซลล์ปฐมภูมิ ที่มีอายุ 5-10 วัน หรือ cell line (BHK-21) ที่มีอายุ 2 วัน ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง

2. เติมสารละลายแขวนลอยที่ได้จากการเตรียมตัวอย่าง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อให้เกิดการ adsorb เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3. เติม Maintenance Medium (MM) (ขวดเพาะเซลล์พื้นที่ 25 ตารางเซนติเมตร เติม MM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร) ใส่เข้าไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน อ่านผลการเกิดพยาธิสภาพของเซลล์ (Cytopathic effect : CPE) ทุกวัน โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ inverted microscope

4. แยกเชื้อไวรัสออกจากเซลล์โดยการ freeze-thaw ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นแยกส่วนน้ำใสออกจากส่วนกากเซลล์ ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดทำความเย็น ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

5. นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปผ่านลงบนเซลล์เพาะเลี้ยงอีกครั้ง โดยปฏิบัติตามวิธีการข้อ 1 ถึงข้อ 5 รวมทั้งหมด 3 ครั้ง (3 passages)

6. นำส่วนน้ำใสไปทำการตรวจจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อไวรัส ด้วยวิธี ELISA typing

การทดสอบระดับของแอนติเจน (antigen titration)

1. เคลือบเพลทด้วย rabbit trapping antibody FMDV ซีโรไทป์โอ เอ และเอเซียวัน หรือซีโรไทป์ที่ต้องการตรวจ ซึ่งปรับความเข้มข้นเหมาะสมแล้ว (working dilution) เจือจางโดยใช้ coating buffer (0.05 M carbonate bicarbonate buffer pH 9.5)

หยอดลงบน ELISA plate กันเรียบปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปวางบนเครื่องเขย่าแนวราบ (orbital shaker) ใช้ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

2. ล้างเพลทด้วย 0.01M PBS จำนวน 5 ครั้ง เคาะเพลทให้แห้ง

3. เตรียมสารละลายไวรัสในวัคซีนและไวรัสในพื้นที่ที่ต้องการทดสอบระดับของแอนติเจนใน microtube โดยใช้ ELISA diluent (PBST) ทำการเจือจางแบบ 2 fold serial dilution หยอดลงในเพลท ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ปิดฝาเพลท หรือใช้ plate sealer ปิด นำไปวางบนเครื่องเขย่าแนวราบ (orbital shaker) ใช้ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4. ล้างเพลทด้วย 0.01M PBS จำนวน 5 ครั้ง เคาะเพลทให้แห้ง

5. ใส่สารละลาย guinea pig detecting antibody สำหรับเชื้อ FMDV ตามข้อ 1 ซึ่งปรับความเข้มข้นเหมาะสมแล้ว ลงใน ELISA blocked diluent (PBST+5% skimmed milk) หยอดลงเพลท ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปวางบนเครื่องเขย่าแนวราบ (orbital shaker) ใช้ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

6. ล้างเพลทด้วย 0.01M PBS จำนวน 5 ครั้ง เคาะเพลทให้แห้ง

7. เตรียมสารละลาย horseradish peroxidase conjugate ซึ่งปรับความเข้มข้นเหมาะสมแล้วใน ELISA blocked diluent หยอดลงเพลท ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปวางบนเครื่องเขย่าแนวราบ (orbital shaker) ใช้ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

8. ล้างเพลทด้วย 0.01M PBS จำนวน 5 ครั้ง เคาะเพลทให้แห้ง

9. เตรียมสารละลาย 0.01% TMB substrate (tetramethylbenzidine substrate) หยอดลงในเพลท ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที

10. เตรียม Stop solution (1M H_2SO_4) ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ทุกหลุม เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ substrate

11. อ่านค่าความเข้มของแสง (optical density; OD) ด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 450 nm (กรณีใช้ orthophenylene diamine; OPD เป็น substrate จะอ่านค่า OD ที่ความยาวคลื่น 492 nm)

การทดสอบหา r-value

1. เคลือบเพลทด้วย rabbit trapping antibody FMDV ซีโรไทป์โอ เอ หรือเอเซียวัน สายพันธุ์ที่ต้องการตรวจ ซึ่งปรับความเข้มข้นเหมาะสมแล้ว (working dilution) เจือจางโดยใช้ coating buffer (0.05M carbonate bicarbonate buffer pH 9.5) หยอดลงบน ELISA plate กันเรียบปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

2. ล้างเพลทด้วย 0.01M PBS จำนวน 5 ครั้ง เคาะเพลทให้แห้ง

3. เตรียม virus serum mixture โดย

3.1 เจือจาง ซีรัมควบคุมบวกของไวรัสในวัคซีน โดยใช้ ELISA diluent (PBST) 1:8 และทำ two fold serial dilution ของซีรัมควบคุมบวก ใน U-shape plate

3.2 เตรียมไวรัสในพื้นที่และไวรัสในวัคซีนที่ทราบระดับของแอนติเจนแล้ว ลงใน U-shape plate ปิดฝาเพลท นำไปวางบนเครื่องเขย่าแนวราบในตู้ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

3.3 ถ่าย Virus serum mixture ลงใน ELISA plate ตามข้อ 1 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ปิดฝาเพลท หรือใช้ plate sealer ปิด นำไปวางบน

เครื่องเขย่าแนวราบ (orbital shaker) ใช้ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4. ล้างเพลทด้วย 0.01M PBS จำนวน 5 ครั้ง
เคาะเพลทให้แห้ง

5. ใส่สารละลาย guinea pig detecting antibody สำหรับเชื้อ FMDV ตามข้อ 1 ซึ่งปรับความเข้มข้นเหมาะสมแล้ว ลงใน ELISA blocked diluent (PBST+5% skimmed milk) หยดลงเพลท ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปวางบนเครื่องเขย่าแนวราบ (orbital shaker) ใช้ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

6. ล้างเพลทด้วย 0.01M PBS จำนวน 5 ครั้ง
เคาะเพลทให้แห้ง

7. เติมสารละลาย horseradish peroxidase conjugate ซึ่งปรับความเข้มข้นเหมาะสมแล้วใน ELISA blocked diluent หยดลงเพลท ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปวางบนเครื่องเขย่าแนวราบ (orbital shaker) ใช้ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

8. ล้างเพลทด้วย 0.01M PBS จำนวน 5 ครั้ง
เคาะเพลทให้แห้ง

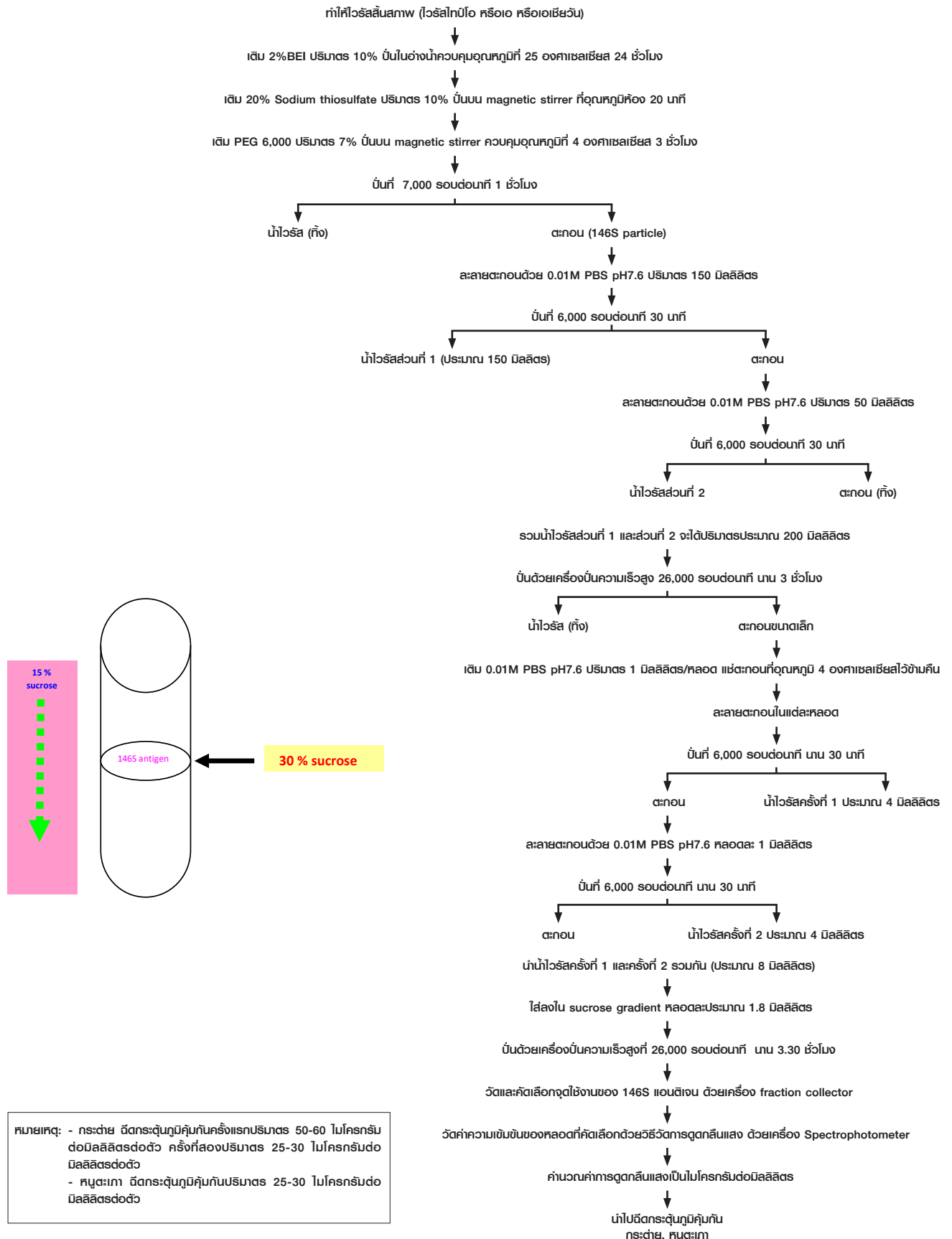
9. เติมสารละลาย 0.01% TMB substrate (tetramethylbenzidine substrate) หยดลงในเพลท ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที

10. เติม Stop solution (1M H_2SO_4) ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ทุกหลุม เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ substrate

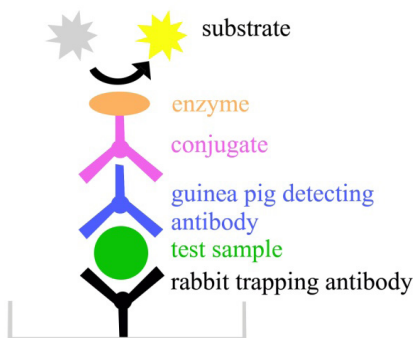
11. อ่านค่าความเข้มของแสง (optical density; OD) ด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 450 nm (กรณีใช้ orthophenylene diamine; OPD เป็น substrate จะอ่านค่า OD ที่ความยาวคลื่น 492 nm)

การเตรียมอนุภาค 146S ไวรัสเอนเทอโร

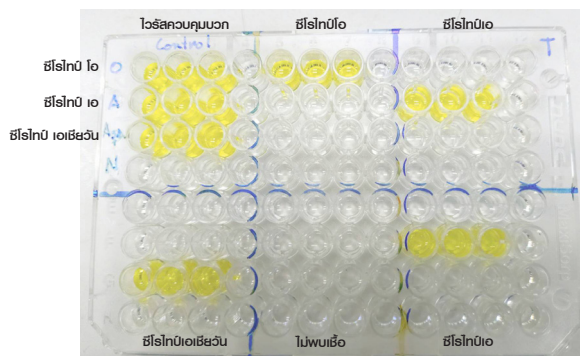
การเตรียมอนุภาค 146S ไวรัสเอนเทอโร



รูปที่ 2 แสดงวิธีการทดสอบ



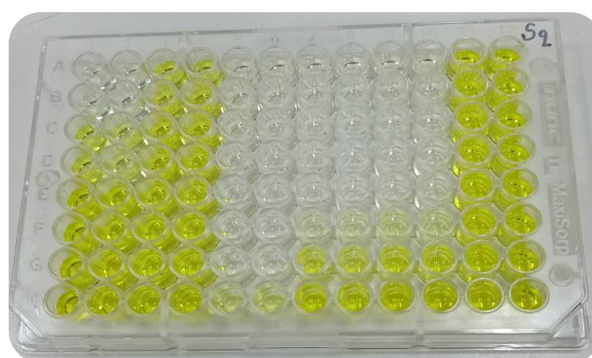
รูปที่ 2.1 แสดงหลักการของการตรวจจำแนกซีโรไทป์ของไวรัสด้วยวิธี ELISA typing



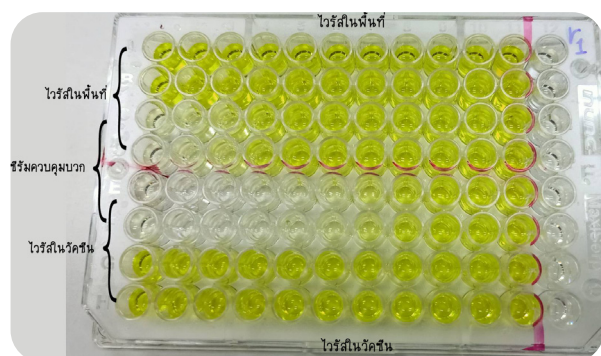
รูปที่ 2.2 แสดงปฏิกิริยาการเกิดสีในเพลตด้วย วิธี ELISA typing

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Dilution
ซีรัมควบคุมบวก (อ้างอิง)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1:40
ซีรัมควบคุมบวก (ตัวอย่าง)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1:80
ซีรัมควบคุมลบ	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1:160
ไวรัสควบคุมบวก	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1:320
	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1:640
	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1:1280
	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1:2560
	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1:5120
	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	

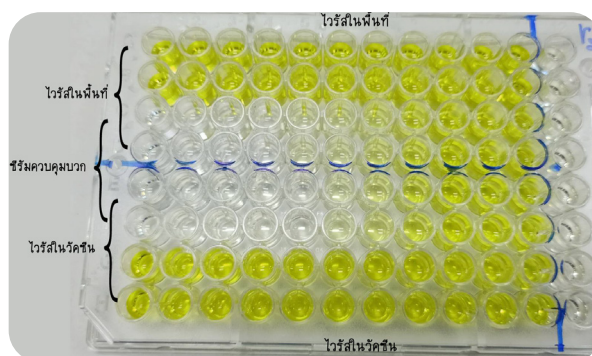
รูปที่ 2.3 diagram แสดงรูปแบบการจัด plate ของ test serum, control serum, control antigen ของวิธี LPB ELISA



รูปที่ 2.4 แสดงผล การตรวจระดับแอนติบอดี โดยวิธี LPB ELISA

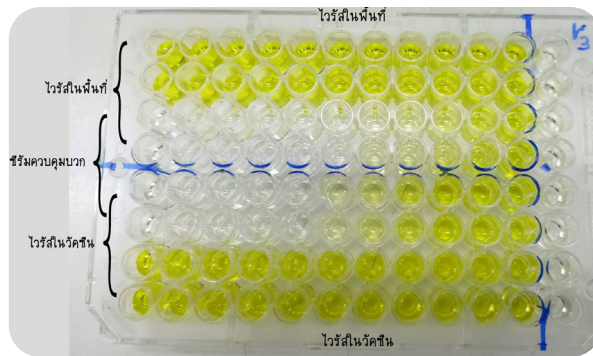


รูปที่ 2.5 แสดงผล r-value ซีรัมควบคุมบวก neutralize ไวรัสในพื้นที ได้น้อยกว่าไวรัสในวัคซีน ทำให้ r-value ต่ำกว่า 0.19

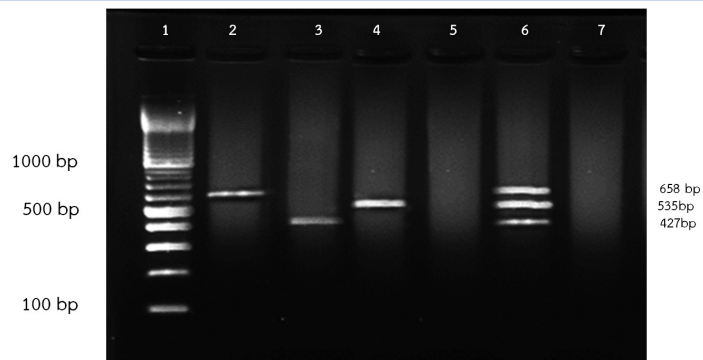


รูปที่ 2.6 แสดงผล r-value ซีรัมควบคุมบวก neutralize ไวรัสในพื้นที ได้เท่ากับไวรัสในวัคซีน ทำให้ r-value เท่ากับ 1

รูปที่ 2 แสดงวิธีการทดสอบ (ต่อ)



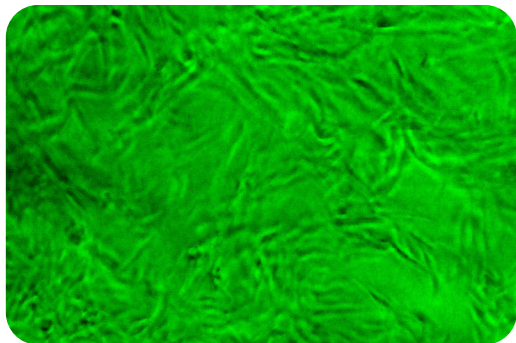
รูปที่ 2.7 แสดงผล r-value ซีรัมควบคุมบวก neutralize ไวรัสในพินท์ได้ดีกว่าไวรัสในวัคซีน ทำให้ r-value มากกว่า 1



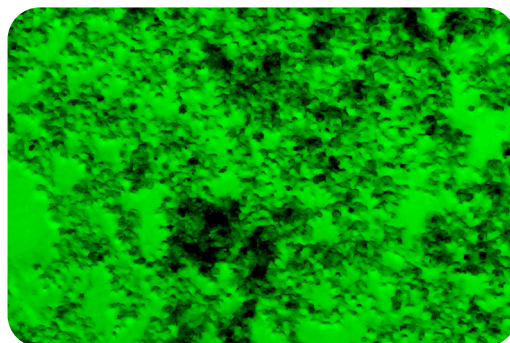
รูปที่ 2.8 แสดงผลของวิธีทดสอบ one-step multiplex RT-PCR:

- 1 = DNA marker (100 bp);
- 2 = field sample (positive serotype O);
- 3 = field sample (positive serotype A);
- 4 = field sample (positive serotype Asia1);
- 5 = field sample (negative);
- 6 = positive controls (serotypes O = 658 bp, A= 427 bp and Asia1 = 535 bp);
- 7 = negative control (PBS)

รูปที่ 3 แสดงการผลิตสารตรวจสอบทาง ELISA สำหรับ FMD



รูปที่ 3.1 แสดงการเจริญของเซลล์ BHK-21 ที่เจริญเต็มที่มีรูปลักษณะแบบกระสวย (กำลังขยาย 40 เท่า)



รูปที่ 3.2 แสดงการเกิด cytopathic effect (CPE) ของไวรัส ในเซลล์ BHK-21 (กำลังขยาย 40 เท่า)



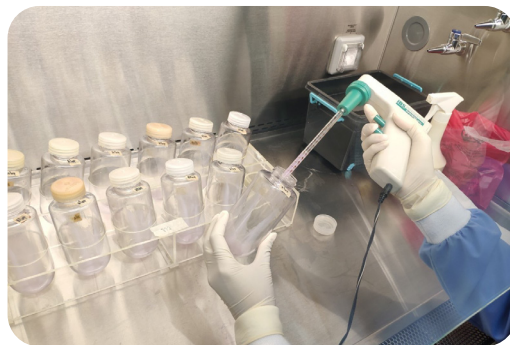
รูปที่ 3.3 แสดงการปั่นน้ำไวรัสภายในอ่างควบคุมอุณหภูมิ หลังจากการใส่ 2% BEI (Inactivated virus)



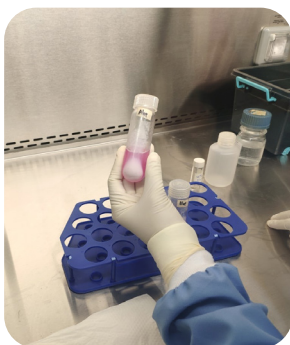
รูปที่ 3.4 แสดงการหยุดปฏิกิริยาของการ Inactivation ด้วย 20% sodium thiosulfate



รูปที่ 3.5 แสดงการนำไวรัสที่ Inactivated แล้วใส่ในหลอด ก่อนนำไปปั่นที่ 7,000 รอบต่อนาที



รูปที่ 3.6 แสดงการละลายตะกอน โดยใส่ 0.01 M PBS, pH 7.6



รูปที่ 3.7 แสดงตะกอนไวรัสที่ได้จากการปั่น 6,000 รอบ/นาที



รูปที่ 3.8 แสดงวงแหวนของอนุภาค 146S ใน sucrose gradient layers

รูปที่ 4 แสดงระบบหมุนเวียนอากาศ BSL-3



รูปที่ 4.1 อากาศจากภายนอกอาคารผ่าน pre-filter



รูปที่ 4.2 อากาศที่ผ่านการทำความเย็นผ่านท่อที่หุ้มฉนวนสีดำง่ายเข้า BSL-3



รูปที่ 4.3 อากาศจาก BSL-3 ผ่านท่อสีขาวที่ปิดสนิทไปกรองที่ HEPA canister



รูปที่ 4.4 Exhaust fan 2 ตัว ดึงอากาศออก ทำงาน สลับกัน กรณีที่อีกตัวต้องซ่อมบำรุงหรือเสียหาย

รูปที่ 5 แสดงการทดสอบและการทำให้ปราศจากเชื้อใน HEPA canister



รูปที่ 5.1 HEPA canister



รูปที่ 5.2 การตรวจเช็คความเร็วลม HEPA filter ด้วย anemometer



รูปที่ 5.3 การตรวจเช็คครอยรั่วของ HEPA filter ด้วย photometer

รูปที่ 6 แสดงเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อแบบ 2 ประตู



รูปที่ 6.1 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อแบบ 2 ประตู (2 door-autoclave)



รูปที่ 6.2 เปิดประตู นำตะแกรงออก เพื่อนำของเข้าเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ จากด้าน secure zone



รูปที่ 6.3 นำของเข้าเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ จากด้าน secure zone



รูปที่ 6.4 กดปิดประตูเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ จากด้าน secure zone



รูปที่ 6.5 ใส่รหัสเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ เลือกโปรแกรม ก่อนกดปุ่มเริ่มทำงาน



รูปที่ 6.6 เครื่องจะแสดงว่าฆ่าเชื้อได้สมบูรณ์เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการ



รูปที่ 6.7 เอาของที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ออกทางด้าน non-secure zone



รูปที่ 6.8 ปิดประตูเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ จากด้าน non-secure zone

รูปที่ 7 แสดงการทวนสอบประสิทธิภาพการทำให้ปราศจากเชื้อโดย Biological test



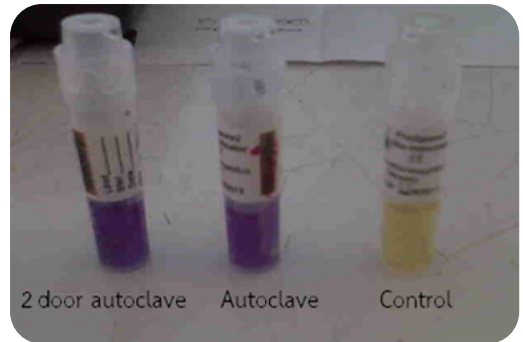
รูปที่ 7.1 เตรียม Biological test ใส่ห่อหนึ่งที่ให้ความร้อนหรือกึ่งผ่านได้



รูปที่ 7.2 วาง Biological test ระหว่างผ้าหนา ๆ



รูปที่ 7.3 ผล biological test ที่ให้ผลบวกจะมีสีเหลืองตามคำบ่งชี้ของบริษัท



รูปที่ 7.4 ผล biological test ที่ให้ผลลบจะมีสีม่วง ตามคำบ่งชี้ของบริษัท

รูปที่ 8 แสดงการเข้า BSL - 3



รูปที่ 8.1 ถอดเสื้อผ้าและเครื่องประดับไว้ในตู้ล็อกเกอร์



รูปที่ 8.2 กดปุ่มเปิดประตูแล้วดึงประตูเข้าหาตัว แล้วเข้าไปใน air lock shower room



รูปที่ 8.3 กดปุ่มเปิดประตูจากใน air lock shower room แล้วเข้าไปด้าน secure zone



รูปที่ 8.4 ใส่เสื้อผ้า รองเท้า ที่เตรียมไว้ด้านใน

รูปที่ 9 แสดงการออกจาก BSL - 3



รูปที่ 9.1 ถอดเสื้อผ้า และรองเท้าออก



รูปที่ 9.2 กดปุ่มเปิดประตูจากห้อง secure zone แล้วเข้าไปใน air lock shower room



รูปที่ 9.3 ประตูออกไปด้านนอกจะไม่สามารถเปิดได้ 3 นาที เพื่อให้ผู้วิจัยอาบน้ำ

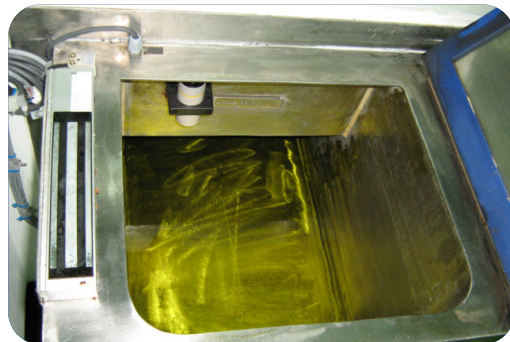


รูปที่ 9.4 เมื่ออาบน้ำเสร็จ กดปุ่มเปิดประตูแล้วเดินประตูออกด้าน non-secure zone

รูปที่ 10 แสดงการเปลี่ยนน้ำยาฆ่าเชื้อใน dunk tank



รูปที่ 10.1 เปิด dunk tank จาก secure zone



รูปที่ 10.2 ปล่อยน้ำยาฆ่าเชื้อเดิมที่ใช้แล้ว



รูปที่ 10.3 ทำความสะอาดใน dunk tank



รูปที่ 10.4 เติมน้ำประมาณครึ่งหนึ่งของปริมาตร dunk tank

รูปที่ 10 แสดงการเปลี่ยนน้ำยาฆ่าเชื้อใน dunk tank (ต่อ)



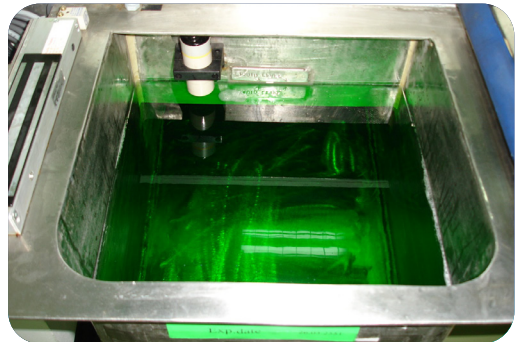
รูปที่ 10.5 เติมน้ำยาฆ่าเชื้อ glutaraldehyde ตามปริมาณที่คำนวณไว้



รูปที่ 10.6 ระดับน้ำของ dunk tank ที่ต้องการ



รูปที่ 10.7 เติมน้ำให้เต็มตามระดับ



รูปที่ 10.8 แสดงภาพ dunk Tank หลังเปลี่ยนยาฆ่าเชื้อเสร็จ

รูปที่ 11 UV pass box



รูปที่ 11.1 กดปุ่มเปิด UV pass box ด้านนอก หรือ non-secure zone



รูปที่ 11.2 เอากล่องตัวอย่างเข้าใน UV pass box



รูปที่ 11.3 ปิดเอากล่องตัวอย่างออกจาก UV pass box ด้าน secure zone



รูปที่ 11.4 ระบบจะตั้งให้ UV ทำงาน 20 นาที เมื่อปิดประตูจากด้าน secure zone

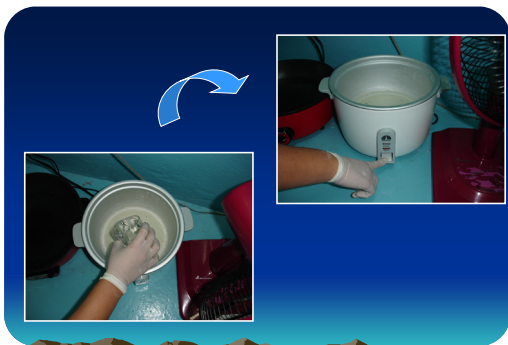
รูปที่ 12 decontamination chamber



รูปที่ 12.1 เปิดประตูด้าน secure zone นำของที่ต้องฆ่าเชื้อใส่ใน decontamination chamber



รูปที่ 12.2 เครื่องมือวัสดุ อุปกรณ์ ที่จะนำออกจาก BSL-3



รูปที่ 12.3 เติมน้ำเพื่อที่จะทำให้เดือดเมื่อเปิดระบบ DC สำหรับเพิ่มความชื้น



รูปที่ 12.4 เท paraformaldehyde ในกระทะที่มี silicon oil เปิด สวิตช์อุปกรณ์ต่าง ๆ



รูปที่ 12.5 ปิดประตูด้านใน secure zone



รูปที่ 12.6 เปิดระบบ DC ด้านนอกหรือ non-secure zone



รูปที่ 12.7 paraformaldehyde เริ่มเดือด และ ระเหย เป็นไอ (formaldehyde gas)



รูปที่ 12.8 เก็บอุปกรณ์ออกจากห้อง decontamination chamber

รูปที่ 13 ระบบบำบัดน้ำเสีย



รูปที่ 13.1 ถังน้ำเสีย



รูปที่ 13.2 ถังกักเก็บน้ำเสีย



รูปที่ 13.3 ตู้ควบคุมระบบบำบัดน้ำเสีย



รูปที่ 13.4 ถังบำบัดเชื้อ และ ถังปรับค่ากรด-ด่าง

The background features several light blue and medium blue geometric shapes, primarily diamonds and squares, arranged in a pattern that suggests a stylized 'X' or a series of overlapping planes. The shapes have soft shadows, giving them a three-dimensional appearance.

ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้
1213/1 หมู่ที่ 11 ตำบลปากช่อง อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา 30130
โทรศัพท์ 044-314889, 064-5068560 อีเมล rrl@dld.go.th