การทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย สเตรนที่มีการระบาดในประเทศไทยด้วยความร้อน

นายสุพัฒนศักดิ์ ศุภารัตน์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสัตวแพทยสาธารณสุข ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-17-5461-2

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THERMAL INACTIVATION OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS STRAINS IN THAILAND

Mr. Supatsak Subharat

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A thesis Submitted in partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Veterinary Public Health
Department of Veterinary Public Health
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2005

ISBN 974-17-5461-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยสเตรนที่มีการระบาดในประเทศไทยด้วยความร้อน
โดย	นายสุพัฒนศักดิ์ ศุภารัตน์
สาขาวิชา	สัตวแพทยสาธารณสุข
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.ศุภชัย เนื้อนวลสุวรรณ

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.ณรงค์ศักดิ์ ชัยบุตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร.เบญจมาศ ปัทมาลัย)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.ศุภชัย เนื้อนวลสุวรรณ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร.รุ่งทิพย์ ชวนชื่น)

.....กรรมการ
(สพ.ญ.สมใจ กมลศิริพิชัยพร)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สุพัฒนศักดิ์ ศุภารัตน์ : การทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยสเตรนที่มีการระบาดในประเทศไทยด้วยความร้อน. (THERMAL INACTIVATION OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS STRAINS IN THAILAND) อ. ที่ปรึกษา : ผศ.น.สพ.ดร.ศุภชัย เนื้อนวลสุวรรณ , 56 หน้า. ISBN 974-17-5461-2

ประเทศไทยจัดเป็นประเทศที่มีศักยภาพสูงในการผลิตสุกรแต่กลับพบว่ามีการส่งออกเนื้อสุกรไปยังต่างประเทศในปริมาณที่น้อยมาก ทั้งนี้เนื่องมาจากการที่ประเทศไทยมีการระบาดของโรคปากและเท้าเปื่อยจึงทำให้ไม่สามารถส่งออกเนื้อสุกรสดไปยังประเทศที่ปลอดโรค สำหรับเนื้อสุกรที่ส่งออกได้นั้นต้องผ่านการปรุงสุกเพื่อทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย แต่เนื่องจากข้อกำหนดที่เข้มงวดทั้งช่วงอุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในการปรุงสุกจึงมีความจำกัดในเชิงความหลากหลายของผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรแปรรูป การศึกษาครั้งนี้ต้องการทราบถึงช่วงอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยสเตรนที่มีการระบาดในประเทศไทยโดยเฉพาะเพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการเจรจาต่อรองกับประเทศคู่ค้าถึงข้อจำกัดต่างๆต่อไป การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยสเตรนที่มีการระบาดในประเทศไทยจำนวน 3 ซีโรไทป์ รวม 6 สเตรน ได้แก่ O/Udornthani/1987, O/Nakhonpathom/1965, A/Saraburi/1987, A/Sakolnakorn/1997, A132/1989 และ Asia-1/Petchaburi/1985 ด้วยความร้อน 6 อุณหภูมิ คือ 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส ในระยะเวลาต่างๆกัน 6 ช่วงเวลาในสารละลาย PBS จากนั้นวัดระดับความเข้มข้นของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่เหลืออยู่เพื่อสร้างกราฟแสดงการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย และวิเคราะห์ค่าหา D-value ซึ่งหมายถึงระยะเวลาที่ใช้ในการลดระดับความเข้มข้นของไวรัสลง 1 Log_{10} หรือร้อยละ 90 ซึ่งจะมีความจำเพาะกับช่วงอุณหภูมิ และสเตรนของไวรัส การทดลองดังกล่าวทำซ้ำ 3 ครั้ง ผลจากการศึกษาพบว่า D-value ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสมีค่าอยู่ระหว่าง 400 ถึง 2,500 วินาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสมีค่าอยู่ระหว่าง 15 ถึง 23 วินาที ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสมีค่าอยู่ระหว่าง 7 ถึง 9 วินาที ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสมีค่าอยู่ระหว่าง 4 ถึง 7 วินาที ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสมีค่าอยู่ระหว่าง 2 ถึง 4 วินาที และที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสมีค่าอยู่ระหว่าง 2 ถึง 3 วินาที โดย D-value ที่อุณหภูมิต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ยกเว้นที่อุณหภูมิ 90 และ 100 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจเกิดจากระยะเวลาในการทำลายไวรัสที่รวดเร็วมากจนกระทั่งไม่สามารถบอกถึงความแตกต่างในการทำลายไวรัสได้ ส่วนการเปรียบเทียบกันของ D-value ระหว่างไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้ง 6 สเตรนที่ศึกษาพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แสดงถึงความต้านทานความร้อนที่ไม่แตกต่างกันระหว่างไวรัสทั้ง 6 สเตรนที่ศึกษาด้วย

ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข ลายมือชื่อนิสิต.....S. Suphanet.....
สาขาวิชาสัตวแพทยสาธารณสุข ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา 2548

##4775578631 : MAJOR VETERINARY PUBLIC HEALTH

KEY WORD : FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS/ THERMAL INACTIVATION/ TEMPERATURE/ TIME/ THAILAND

SUPATSAK SUBHARAT : THERMAL INACTIVATION OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS STRAINS IN THAILAND. THESIS ADVISOR : SUPHACHAI NUANUALSUWAN, D.V.M., MPVM, Ph.D. 56 PP. ISBN 974-17-5461-2

Thailand has high potential to produce pigs but each year pork products exporting to the world market is very limited. Since Thailand locates in Foot-and-mouth disease endemic areas thus making pork products exporting almost impossible. Although cooked pork can be exported, strict international cooking regulations make pork products less diversified in terms of cooking styles. The objective of this study was to investigate the suitable temperatures and times to inactivate Foot-and-Mouth Disease Virus strains (FMDV) in Thailand. Six FMDV strains (O/Udornthani/1987, O/Nakhonpathom/1965, A/Saraburi/1987, A/Sakolnakorn/1997, A132/1989 and Asia-1/Petchaburi/1985) of 3 serotypes were inactivated at 6 temperatures (50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C and 100°C) and 6 time intervals in PBS. Then, inactivated virus suspensions were enumerated by a virus titration method. The virus concentrations were plotted as a function of time to obtain virus inactivation curve and to calculate decimal reduction time (D-value). D-value is time required to reduce virus number by a factor of 10 which depends on temperature and virus strain. The inactivation experiment was repeated 3 times. D-value of 50°C ranged between 400-2,500 seconds, 60°C ranged between 15-23 seconds, 70°C ranged between 7-9 seconds, 80°C ranged between 4-7 seconds, 90°C ranged 2-4 seconds and 100°C ranged between 2-3 seconds. D-value of tested temperatures were significantly different ($P<0.05$) except for D-values of 90°C and 100°C which might result from instantaneous inactivation. However, there were no significant differences ($P<0.05$) of D-values among the tested strains of FMDV i.e. heat resistance among tested strains of FMDV was not different.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department of Veterinary Public Health — Student's signature S. Subharat

Field of study Veterinary Public Health — Advisor's signature S. Nuanualsuwan

Academic Year. 2005

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.ศุภชัย เนื้อนวลสุวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ตลอดจนข้อคิดเห็นต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัย ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบพระคุณ สพ.ญ.วิไล ลินจงสุบงกช สพ.ญ.สมใจ กมลศิริพิชัยพร น.สพ.ร่มพฤกษ์ อุดล น.สพ.ปณิธาน ทองทา และเจ้าหน้าที่ปฏิบัติการประจำศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา ซึ่งกรุณาให้ความช่วยเหลือในขั้นตอนการปฏิบัติการเป็นอย่างดี รวมถึงความรู้ คำแนะนำ ตลอดจนข้อคิดเห็นต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คุณพอจิต ชูใจ คุณปิยะ วงศ์ญาณิน และเจ้าหน้าที่ประจำหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งกรุณาถ่ายทอดความรู้เกี่ยวกับเทคนิคการใช้เครื่องมือทางห้องปฏิบัติการ การเพาะเลี้ยงเซลล์ และการเตรียมสารเคมีต่างๆ ตลอดจนข้อแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ เพื่อนๆ และพี่ๆ นิสิตปริญญาโท-เอก ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกๆท่าน ที่ช่วยให้คำแนะนำตลอดจนข้อคิดเห็นต่างๆที่เป็นประโยชน์ และกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณครอบครัวของผู้วิจัยที่ให้ความสนับสนุน และเป็นกำลังใจให้แก่ผู้วิจัยเสมอมา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญภาพ..... ญ

บทที่ 1 บทนำ..... 1

บทที่ 2 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 6

2.1 ลักษณะโดยทั่วไปของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย..... 6

2.2 การคงอยู่ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย..... 8

2.3 การพบไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในเนื้อสุกร..... 10

2.4 การทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยความร้อน..... 11

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย..... 15

3.1 อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย..... 15

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย..... 16

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล..... 20

บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล..... 22

4.1 ผลการวิเคราะห์หาอัตราการทำลายไวรัส (D-value)..... 22

4.2 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ..... 31

หน้า

บทที่ 5 อภิปรายผล สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ..... 36
5.1 อภิปรายผล..... 36
5.2 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ..... 40

รายการอ้างอิง..... 42

ภาคผนวก..... 46
ภาคผนวก ก 47
ภาคผนวก ข 51
ภาคผนวก ค 53
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 65

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1. ระยะเวลาการคงตัว (Stability time) ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย..... 9
2. อัตราการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (D-value) ด้วยความร้อน..... 14
3. ระยะเวลาที่ใช้ในการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในแต่ละช่วงอุณหภูมิ..... 17
4. การวิเคราะห์ค่าความชัน (β) ของกราฟแสดงการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ทั้ง 6 สเตรนที่อุณหภูมิ 50 °C..... 31
5. การวิเคราะห์ค่าความชัน (β) ของกราฟแสดงการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ทั้ง 6 สเตรนที่อุณหภูมิ 60 °C..... 32
6. การวิเคราะห์ค่าความชัน (β) ของกราฟแสดงการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ทั้ง 6 สเตรนที่อุณหภูมิ 70 °C..... 32
7. การวิเคราะห์ค่าความชัน (β) ของกราฟแสดงการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ทั้ง 6 สเตรนที่อุณหภูมิ 80 °C..... 32
8. การวิเคราะห์ค่าความชัน (β) ของกราฟแสดงการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ทั้ง 6 สเตรนที่อุณหภูมิ 90 °C..... 33
9. การวิเคราะห์ค่าความชัน (β) ของกราฟแสดงการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ทั้ง 6 สเตรนที่อุณหภูมิ 100 °C..... 33
10. ช่วงระยะความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 ของ D-value ระหว่างอุณหภูมิที่ใช้ในการทำลายไวรัสทั้ง 6 อุณหภูมิ..... 34
11. ช่วงระยะความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 ของ D-value ระหว่างสเตรนของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้ง 6 สเตรน..... 34
12. D-value (วินาที) ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้ง 6 สเตรนใน 6 ช่วงอุณหภูมิ..... 35

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

รูปที่ **หน้า**

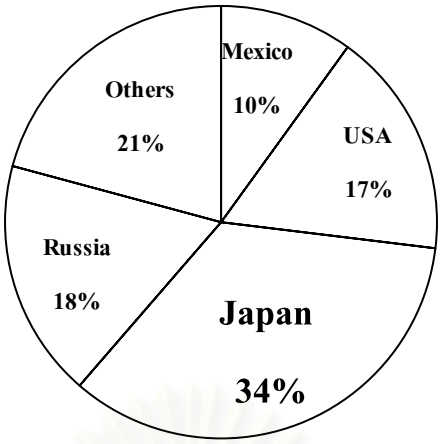
1. สัดส่วนการนำเข้าเนื้อสุกรของทั้งโลกในปีพ.ศ. 2546..... 2
2. สัดส่วนการนำเข้าเนื้อสุกรแปรรูปของประเทศญี่ปุ่นในปีพ.ศ. 2546..... 2
3. เขตการระบาดของโรคปากและเท้าเปื่อยในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้..... 4
4. โครงสร้างของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย..... 6
5. รอยโรคบริเวณโคนลิ้นสุกร..... 7
6. รอยโรคบริเวณกีบเท้าสุกร..... 7
7. การทำลายไวรัสด้วยความร้อน..... 18
8. เซลล์เพาะเลี้ยง BHK-21 ปกติ..... 19
9. เซลล์เพาะเลี้ยง BHK-21 ขณะเกิดภาวะ Cytopathic Effect (CPE) บางส่วน..... 20
10. เซลล์เพาะเลี้ยง BHK-21 ขณะเกิดภาวะ Cytopathic Effect (CPE) ทั้งหมด..... 20
11. กราฟแสดงการทำลายไวรัสซีโรไทป์ O และ D-value ที่ 50°C..... 22
12. กราฟแสดงการทำลายไวรัสซีโรไทป์ A และ D-value ที่ 50°C..... 23
13. กราฟแสดงการทำลายไวรัสซีโรไทป์ Asia-1และ D-value ที่ 50°C..... 23
14. กราฟแสดงการทำลายไวรัสซีโรไทป์ O และ D-value ที่ 60°C..... 24
15. กราฟแสดงการทำลายไวรัสซีโรไทป์ A และ D-value ที่ 60°C..... 24
16. กราฟแสดงการทำลายไวรัสซีโรไทป์ Asia-1 และ D-value ที่ 60°C..... 25
17. กราฟแสดงการทำลายไวรัสซีโรไทป์ O และ D-value ที่ 70°C..... 25
18. กราฟแสดงการทำลายไวรัสซีโรไทป์ A และ D-value ที่ 70°C..... 26
19. กราฟแสดงการทำลายไวรัสซีโรไทป์ Asia-1 และ D-value ที่ 70°C..... 26
20. กราฟแสดงการทำลายไวรัสซีโรไทป์ O และ D-value ที่ 80°C..... 27
21. กราฟแสดงการทำลายไวรัสซีโรไทป์ A และ D-value ที่ 80°C..... 27
22. กราฟแสดงการทำลายไวรัสซีโรไทป์ Asia-1 และ D-value ที่ 80°C..... 28
23. กราฟแสดงการทำลายไวรัสซีโรไทป์ O และ D-value ที่ 90°C..... 28
24. กราฟแสดงการทำลายไวรัสซีโรไทป์ A และ D-value ที่ 90°C..... 29
25. กราฟแสดงการทำลายไวรัสซีโรไทป์ Asia-1 และ D-value ที่ 90°C..... 29
26. กราฟแสดงการทำลายไวรัสซีโรไทป์ O และ D-value ที่ 100°C..... 30
27. กราฟแสดงการทำลายไวรัสซีโรไทป์ A และ D-value ที่ 100°C..... 30
28. กราฟแสดงการทำลายไวรัสซีโรไทป์ Asia-1 และ D-value ที่ 100°C..... 31

บทที่ 1

บทนำ

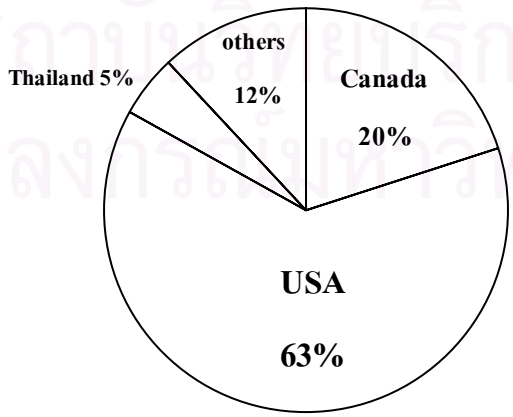
การเลี้ยงสุกรของประเทศไทยมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องทั้งด้านสายพันธุ์ อาหาร การจัดการ และการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต ปัจจุบันถือได้ว่าประเทศไทยเป็นประเทศที่มีศักยภาพในการผลิตสุกรใกล้เคียงกับประเทศผู้ผลิตและส่งออกสุกรรายใหญ่ของโลก เช่น ประเทศสหรัฐอเมริกา แคนาดา และกลุ่มประเทศในทวีปยุโรป ถึงแม้ว่าการผลิตสุกรในประเทศไทยจะมีความก้าวหน้าไปมากแต่สุกรของไทยที่ผลิตได้เกือบทั้งหมดใช้สำหรับการบริโภคภายในประเทศเท่านั้น ส่วนการส่งออกเนื้อสุกรและผลิตภัณฑ์สุกรแปรรูปไปยังต่างประเทศนั้นยังมีปริมาณและมูลค่าน้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณการนำเข้าเนื้อสุกรของทั้งโลก

จากการสำรวจข้อมูลในปีพ.ศ. 2546 พบว่า ปริมาณการนำเข้าเนื้อสุกรของทั้งโลกมีปริมาณสูงถึง 3,500,000 ตัน โดยพบว่า 1 ใน 3 ของปริมาณการนำเข้าเนื้อสุกรทั้งหมดเป็นของประเทศญี่ปุ่น (1,200,000 ตัน) (รูปที่ 1) ซึ่งแบ่งเป็นการนำเข้าเนื้อสุกรแช่แข็ง 860,000 ตัน เนื้อสุกรแช่เย็น 290,000 ตัน และเนื้อสุกรแปรรูป 50,000 ตัน โดยประเทศผู้ส่งออกหลักได้แก่ สหรัฐอเมริกา กลุ่มประเทศในทวีปยุโรป และแคนาดา (บุญเพ็ง, 2547) ประเทศญี่ปุ่นจัดเป็นประเทศที่มีการนำเข้าเนื้อสุกรเป็นอันดับหนึ่งของโลก โดยเฉลี่ยแล้วคนญี่ปุ่นมีอัตราการบริโภคเนื้อสุกรประมาณ 10.2 กิโลกรัม/ คน/ ปี หรือเฉลี่ยปีละประมาณ 2,200,000 ตัน ปริมาณการบริโภคเนื้อสุกรนี้ได้มาจากการนำเข้าถึงประมาณร้อยละ 50 ในขณะที่แนวโน้มของปริมาณการบริโภคเนื้อสุกรในประเทศญี่ปุ่นกำลังสูงขึ้นแต่กลับพบว่าปริมาณการผลิตสุกรในประเทศญี่ปุ่นนั้นลดลงอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ปีพ.ศ. 2532 เนื่องจากต้นทุนค่าอาหารและแรงงานในการเลี้ยงสุกรที่สูงขึ้น ประกอบกับพื้นที่ที่จำกัด และการหลีกเลี่ยงปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อมที่เกิดจากอุตสาหกรรม การเลี้ยงสุกรส่งผลให้ในอนาคตประเทศญี่ปุ่นมีแนวโน้มที่จะเพิ่มปริมาณการนำเข้าเนื้อสุกรจากต่างประเทศมากขึ้นเรื่อยๆ อีกทั้งปัจจุบันคนญี่ปุ่นมีวัฒนธรรมการกินอยู่และวิถีการดำเนินชีวิตที่เปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากภาวะการทำงานและการแข่งขันทางเศรษฐกิจซึ่งทำให้คนมีเวลาน้อยลง คนญี่ปุ่นจึงมีแนวโน้มในการบริโภคผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรแปรรูปมากขึ้นเพื่อลดเวลาและความยุ่งยากในขั้นตอนการปรุงอาหาร ดังนั้นจึงเห็นได้ว่า ตลาดเนื้อสุกรแปรรูปของประเทศญี่ปุ่นมีความน่าสนใจและยังมีโอกาสในการขยายตัวได้อีกมาก (Obara et al., 2003)



รูปที่ 1 สัดส่วนการนำเข้าเนื้อสุกรของทั้งโลกในปีพ.ศ. 2546
ที่มา : ดัดแปลงจาก บุญเพ็ง (2547)

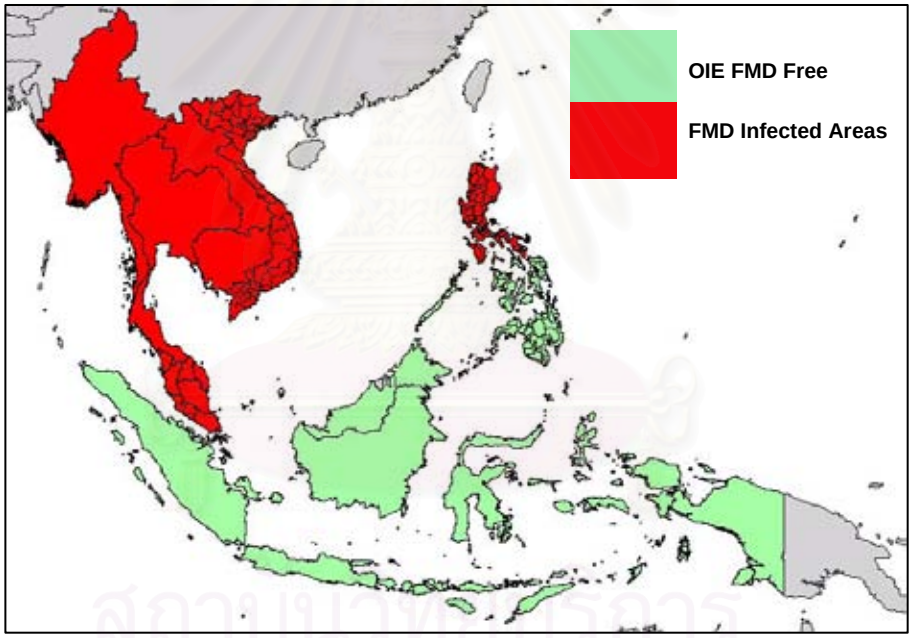
ในปีพ.ศ. 2546 ประเทศไทยสามารถผลิตเนื้อสุกรได้ประมาณ 753,000 ตัน แต่มีการส่งออกเนื้อสุกรตลอดทั้งปีเพียง 14,300 ตัน หรือคิดเป็นเพียงร้อยละ 1.9 ของปริมาณการผลิตเนื้อสุกรทั้งหมด โดยที่ตลาดหลักคือ ประเทศฮ่องกง ซึ่งมีปริมาณการนำเข้าเนื้อสุกรจากประเทศไทยตลอดทั้งปีประมาณ 11,000 ตัน หรือคิดเป็นร้อยละ 77 ของปริมาณการส่งออกเนื้อสุกรทั้งหมดของไทย ส่วนตลาดรองลงมาคือ ประเทศญี่ปุ่น ซึ่งมีปริมาณการนำเข้าเนื้อสุกรจากประเทศไทยตลอดทั้งปีประมาณ 2,500 ตัน หรือคิดเป็นร้อยละ 18 ของปริมาณการส่งออกเนื้อสุกรทั้งหมดของไทย สำหรับเนื้อสุกรที่ส่งออกไปยังประเทศฮ่องกงนั้นจะเป็นเนื้อสุกรแช่แข็งและเนื้อสุกรแช่เย็น ส่วนเนื้อสุกรที่ส่งออกไปยังประเทศญี่ปุ่นนั้นจะเป็นเนื้อสุกรแปรรูปปรุงสุกทั้งหมด และเมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนของปริมาณการนำเข้าเนื้อสุกรแปรรูปปรุงสุกของประเทศญี่ปุ่นตลอดทั้งปี พบว่า ประเทศไทยมีส่วนแบ่งการตลาดคิดเป็นเพียงร้อยละ 5 เท่านั้น (รูปที่ 2) (บุญเพ็ง, 2547)



รูปที่ 2 สัดส่วนการนำเข้าเนื้อสุกรแปรรูปของประเทศญี่ปุ่นในปีพ.ศ. 2546
ที่มา : ดัดแปลงจาก บุญเพ็ง (2547)

สาเหตุหนึ่งที่ทำให้ประเทศไทยส่งออกเนื้อสุกรได้น้อยนั้น เนื่องมาจากการที่ประเทศไทยอยู่ในเขตที่มีการระบาดของโรคปากและเท้าเปื่อย (รูปที่ 3) โดย Office International des Epizooties; OIE (2004a) ได้จัดให้โรคปากและเท้าเปื่อยอยู่ในกลุ่มของ List A ซึ่งเป็นโรคระบาดสัตว์ที่มีความสำคัญ การที่เกิดโรคปากและเท้าเปื่อยระบาดขึ้นจะทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก นอกจากการที่สัตว์เจ็บป่วยจนกระทั่งไม่ได้ผลผลิตตามที่ต้องการแล้วนั้น โรคปากและเท้าเปื่อยยังเป็นอุปสรรคสำคัญต่อการค้าขายระหว่างประเทศอีกด้วย เนื่องจากประเทศที่ปลอดโรคจะไม่อนุญาตให้มีการนำเข้าผลิตภัณฑ์ทุกชนิดจากสัตว์ที่อยู่ในประเทศที่มีการระบาดของโรคปากและเท้าเปื่อยเพราะไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยอาจปนเปื้อนไปกับสินค้าปศุสัตว์ และทำให้เกิดการระบาดของโรคขึ้นกับปศุสัตว์ภายในประเทศที่นำเข้าได้ จากสาเหตุดังกล่าวจึงทำให้ประเทศไทยถูกกีดกันในการส่งออกเนื้อสุกรสดไม่ว่าจะเป็นในรูปของเนื้อสุกรสดแช่แข็ง หรือเนื้อสุกรสดแช่เย็นไปยังประเทศที่ปลอดโรคปากและเท้าเปื่อย ส่วนเนื้อสุกรแปรรูปปรุงสุกที่ทำการส่งออกได้นั้นก็ถูกจำกัดให้เป็นไปตามข้อกำหนดของ OIE ซึ่งระบุไว้ว่าในการส่งออกผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์จากประเทศที่มีการระบาดของโรคปากและเท้าเปื่อยจำเป็นต้องมีการผ่านความร้อนโดยให้อุณหภูมิใจกลาง (Core Temperature) สูงกว่าหรือเท่ากับ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 30 นาที เพื่อทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยอย่างสมบูรณ์ (OIE, 2004b) ส่วนการส่งออกเนื้อสุกรปรุงสุกไปยังประเทศญี่ปุ่นนั้นยังมีกฎระเบียบเกี่ยวกับมาตรฐานผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรนำเข้าจากประเทศที่มีการระบาดของโรคปากและเท้าเปื่อยซึ่งกำหนดโดยกระทรวงเกษตร ป่าไม้ และ ประมง (Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries) ของประเทศญี่ปุ่นกำกับดูแลอีกขั้นหนึ่ง ซึ่งกฎระเบียบระบุไว้ว่า เนื้อสุกรที่แปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์จะต้องเป็นเนื้อถอดกระดูกจากสุกรที่ได้รับการตรวจก่อนและหลังฆ่าว่าไม่มีอาการป่วย หรือไม่มีอาการน่าสงสัยว่าอาจมีโรคติดเชื้อ และเนื้อสุกรดังกล่าวจะต้องผ่านกระบวนการปรุงสุกตามมาตรฐาน กล่าวคือหากเป็นการปรุงสุกโดยใช้ความร้อนเปียก (Moist heat method) เช่น การต้ม ตุ๋น หรือนึ่ง ต้องต้มเนื้อสุกรในน้ำเดือด หรือนึ่งด้วยไอน้ำร้อนที่มีอุณหภูมิสูงกว่าหรือเท่ากับ 100 องศาเซลเซียส จนกระทั่งอุณหภูมิใจกลางเนื้อสูงกว่าหรือเท่ากับ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 1 นาที และหากเป็นการปรุงสุกโดยใช้ความร้อนแห้ง (Dry heat method) เช่น การทอด ย่าง หรืออบ จำเป็นต้องให้ความร้อนจนกระทั่งเนื้อสุกรมีอุณหภูมิใจกลางสูงกว่าหรือเท่ากับ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 30 นาที (JETRO, 1996 อ้างโดย สุวิมล และคณะ, 2540) ซึ่งระยะเวลาในการปรุงสุกเนื้อสุกรตามเกณฑ์ดังกล่าวจะทำให้การควบคุมในขั้นตอนการผลิตเป็นไปได้ยาก และไม่เหมาะสมในทางปฏิบัติจริง

จากการพิจารณาข้อกำหนดต่างๆในการปรุงเนื้อสุกรสุกดังกล่าวพบว่า ทำให้เกิดข้อจำกัดในเชิงความหลากหลายของผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรแปรรูป เนื่องจากต้องใช้วิธีการให้ความร้อนแบบเปียกอย่างเช่น การต้ม ตุ๋น หรือนึ่ง ในการปรุงสุกเนื้อสุกรเท่านั้น สำหรับการใช้ความร้อนแบบแห้งอย่างเช่น การทอด ย่าง หรืออบ ในการปรุงสุกเนื้อสุกรนั้นแทบไม่มีความเป็นไปได้ เนื่องจากระยะเวลาในการให้ความร้อนที่กำหนดไว้นานถึง 30 นาที จะทำให้ผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรแปรรูปที่ได้ขาดคุณลักษณะที่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ดังนั้น เพื่อลดความเข้มงวดดังกล่าวลง จึงควรมีการศึกษาเพื่อหาช่วงอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยสเตรนที่มีการระบาดในประเทศไทยอย่างแท้จริง เนื่องจาก มีความเป็นไปได้ว่าช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยนั้นอาจต่ำกว่า หรือใช้ระยะเวลาสั้นกว่าเกณฑ์กำหนด



รูปที่ 3 เขตการระบาดของโรคปากและเท้าเปื่อยในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Abila, 2004)

การประเมินช่วงอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยจำเป็นต้องศึกษาหาอัตราการทำลายไวรัส หรือที่เรียกกันว่า “Decimal Reduction Time” หรือ “D-value” ของไวรัสเสียก่อน โดย D-value คือ ระยะเวลาที่ใช้ในการลดระดับความเข้มข้นของไวรัสลง 1 Log_{10} หรือร้อยละ 90 ซึ่งจะมีความจำเพาะกับช่วงอุณหภูมิ และสเตรนของไวรัส

ที่ทำการศึกษา (Juneja et al., 1997) ดังนั้น D-value จึงสามารถใช้เป็นดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยความร้อนได้ และในทางกลับกัน D-value ยังสามารถชี้วัดความต้านทานความร้อนของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยแต่ละสเตรน จากประโยชน์และคุณสมบัติของ D-value ดังกล่าว จึงสามารถประเมินช่วงอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยสเตรนที่มีการระบาดในประเทศไทยได้

ก่อนหน้านี้เคยมีรายงานการศึกษาการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยความร้อน (Forbes and Cottral, 1969; De Leeuw et al., 1980; Nettleton et al., 1982; Blackwell et al., 1982; Blackwell et al.,1988; Garcia-Vidal et al., 1988; Masana et al., 1995; Turner et al., 2000) แต่จากการวิเคราะห์ค่าหาอัตราการทำลายไวรัส (D-value) ของการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าข้อมูลที่รายงานนั้นขาดความสอดคล้องกันระหว่างช่วงเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำลายไวรัส จึงไม่สามารถทำการสรุปถึงช่วงเวลา หรืออุณหภูมิที่ใช้ในการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยอย่างแท้จริงได้ ดังนั้น จึงจำเป็นต้องทำการทดลองเพื่อหาช่วงเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย และควรเป็นไวรัสสเตรนที่มีการระบาดในประเทศไทยโดยตรงเพื่อเก็บเป็นฐานข้อมูลซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการใช้เจรจาต่อรองทางการค้าต่อไป

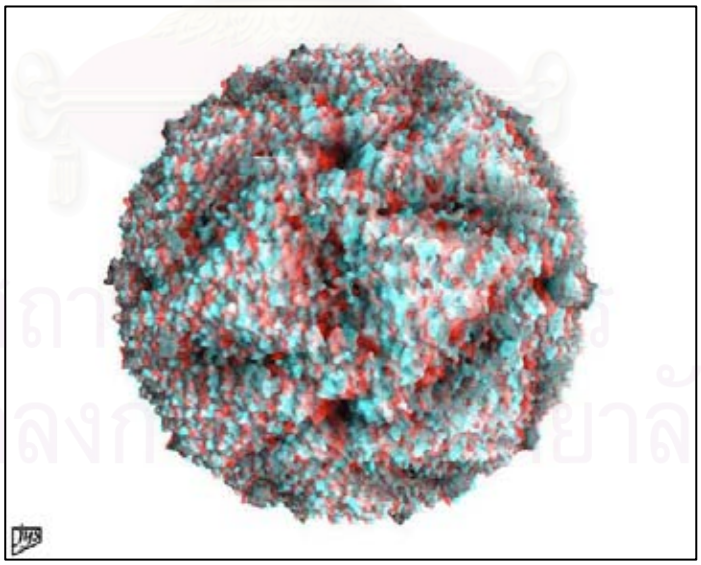
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

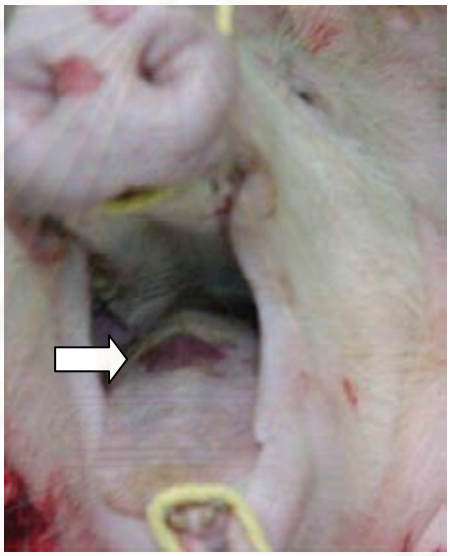
2.1 ลักษณะโดยทั่วไปของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (Characteristics of Foot-and-Mouth Disease Virus)

ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (Foot-and-Mouth Disease Virus; FMDV) จัดอยู่ในวงศ์ *Picornarviridae* สกุล Apthovirus มีขนาดประมาณ 23-29 นาโนเมตร แบ่งออกเป็น 7 ซีโรไทป์ (Serotype) ได้แก่ ซีโรไทป์ O, A, Asia-1, C, SAT1, SAT2 และ SAT3 โดยแต่ละซีโรไทป์นั้นไม่มีภูมิคุ้มกันข้าม (Cross Immunity) ต่อกัน สำหรับซีโรไทป์ที่พบว่ามีการระบาดในประเทศไทยคือ ซีโรไทป์ O, A และ Asia-1 สำหรับลักษณะโครงสร้างของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยนั้นพบว่ามีรูปร่างแบบ Icosahedral เป็นไวรัสที่ไม่มีเปลือกหุ้ม (Non-Enveloped) (รูปที่ 4) โครงสร้างภายนอกประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็นโปรตีน (Structural Protein) ที่เรียกว่า “Capsid” ส่วนโครงสร้างภายในประกอบด้วยโมเลกุลของ RNA ที่เป็นสายเดี่ยว (Single-Stranded RNA) (Taylor, 1995)



รูปที่ 4 โครงสร้างของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (Crowther, 2004)

โรคปากและเท้าเปื่อยเป็นโรคที่มีการแพร่ระบาดได้อย่างรวดเร็วในสุกร อาการทางคลินิคที่สำคัญของสุกรที่ติดเชื้อ คือ พบตุ่มน้ำใสขนาดเล็ก (Small vesicles) ที่บริเวณ ไรกีบ ราวนม และภายในช่องปาก (รูปที่ 5 และ 6) มีไข้ขึ้นสูง ขาเจ็บ เดินกะเผลก และไม่ยอมลุกมากินอาหาร ส่งผลให้สุกรซูบผอม และผลผลิตที่ได้จากสุกรลดลงอย่างรวดเร็ว โดยมากสุกรที่ติดเชื้อมักมีอัตราการตายต่ำ (ประมาณร้อยละ 5) ยกเว้นในลูกสุกรดูดนมที่ติดเชื้อแบบเฉียบพลันซึ่งอาจมีอัตราการตายสูงถึงร้อยละ 50 เนื่องจาก ลูกสุกรดูดนมเกิดภาวะหัวใจล้มเหลวจากการตายของกล้ามเนื้อหัวใจ ซึ่งจะมีลักษณะเป็นแถบเนื้อตายสีขาว หรือที่เรียกว่า “Tiger heart” โดยมากสุกรที่หายป่วยจากโรคจะไม่มีภาวะเป็นตัวกักเก็บไวรัสต่อไป (Taylor, 1995)



รูปที่ 5 รอยโรคบริเวณโคนลิ้นของสุกร (Crowther, 2004)

รูปที่ 6 รอยโรคบริเวณกีบเท้าของสุกร (Crowther, 2004)

2.2 การคงอยู่ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (Stability of Foot-and-Mouth Disease Virus)

ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยสามารถคงอยู่ได้ในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลานานหากอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม ในปี 1960 Cottral และคณะ ได้รายงานถึงการคงอยู่ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์ A ในต่อมน้ำเหลือง และไขกระดูกจากโคที่ทดลองฉีดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเข้าสู่เนื้อเยื่อลิ้น เมื่อโคแสดงอาการทางคลินิคแล้วจึงชำแหละซากและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากการทดลองพบว่าไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์ A สามารถคงอยู่ในต่อมน้ำเหลืองเป็นเวลาอย่างน้อย 50 วัน และในไขกระดูกเป็นเวลาอย่างน้อย 73 วัน เนื่องจาก เมื่อนำไวรัสที่แยกได้ดังกล่าวไปฉีดเข้าสู่เนื้อเยื่อลิ้นของโคปกติ (Cattle Inoculation) ยังทำให้โคแสดงอาการทางคลินิคของโรคปากและเท้าเปื่อยได้

Parker (1971) ศึกษาการคงอยู่ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์ O ในอุจจาระของโคที่ทำการทดลองฉีดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเข้าสู่เนื้อเยื่อลิ้น โดยพบว่าอุจจาระที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ยังให้ผลบวกจากการฉีดเข้าสู่ช่องท้องของหนูทดลอง (Mice Inoculation) เป็นเวลาอย่างน้อย 66 วัน

Mebus และคณะ (1993, 1997) ได้รายงานถึงการคงอยู่ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์ C ในขั้นตอนการผลิตแฮมจากเนื้อสุกรที่ทดลองให้มีการติดเชื้อจากการฉีดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเข้าสู่หลอดเลือดดำ โดยพบว่าไวรัสสามารถคงอยู่ในขั้นตอนการผลิต Iberian loin เป็นเวลา 42 วัน Iberian shoulder เป็นเวลา 112 วัน Iberian ham เป็นเวลา 168 วัน และ Serrano ham เป็นเวลา 182 วัน การศึกษาครั้งนี้ตรวจแยกไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยโดยใช้ Lamb Kidney Cells

ในปี 1995 Mccoll และคณะ ได้รายงานถึงการคงอยู่ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในขนแกะที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิแตกต่างกัน โดยในการศึกษาครั้งนี้มีไวรัสซีโรไทป์ Asia-1(TAI 1/90) ซึ่งได้มาจากประเทศไทยรวมอยู่ด้วย การศึกษานี้ใช้วิธีการตรวจแยกไวรัสจากเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Primary Bovine Thyroid cells พบว่าในขนแกะที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ยังคงมีไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยคงอยู่ได้นานเฉลี่ยเท่ากับ 63.3 วัน ส่วนขนแกะที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ยังคงมีไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยคงอยู่ได้นานเฉลี่ยเท่ากับ 11.7 วัน และในปีเดียวกันนี้ได้มีการรายงานถึงการคงอยู่ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในน้ำล้างอุจจาระ

โค (Bovine slurry) โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยสามารถคงอยู่ได้นานถึง 101 วัน และที่อุณหภูมิ 17 องศาเซลเซียส ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยสามารถคงอยู่ได้นานถึง 80 วัน (Haas et al.,1995 cited by Bartley et al.,2002)

จากการประเมินข้อมูลการศึกษาการคงอยู่ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ผ่านมา สามารถสรุปได้ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งพบว่าปัจจัยสำคัญปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยคงอยู่ได้นานในสิ่งแวดล้อม ก็คือ อุณหภูมิ โดยยิ่งอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมต่ำก็จะส่งผลให้ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยสามารถคงอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้นานยิ่งขึ้น

ตารางที่ 1 ระยะเวลาการคงตัว (Stability time) ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย

ซีโรไทป์	อุณหภูมิ (°C)	Stability time (วัน)	สื่อ	วิธีการตรวจแยกไวรัส	เอกสารอ้างอิง
A	4	50.0	ต่อมน้ำเหลือง	Cattle Inoculation	Cottral และคณะ (1960)
	4	73.0	ไขกระดูก		
O	4	66.0	อุจจาระโค	Mice Inoculation	Parker (1971)
C	ไม่ระบุ	42.0	Iberian loin	Lamb Kidney Cells	Mebus และคณะ (1993,1997)
		112.0	Iberian shoulder		
		168.0	Iberian ham		
		182.0	Serrano ham		
Asia-1	4	63.3	ขนแกะ	Primary bovine thyroid cells	Mccoll และคณะ (1995)
	18	11.7			
ไม่ระบุ	4	101.0	น้ำล้างอุจจาระโค (Bovine slurry)	ไม่ระบุ	Haas และคณะ (1995) อ้างโดย Bartley และคณะ (2002)
	17	80.0			

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 การพบไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในเนื้อสุกร (Presence of Foot-and-Mouth Disease Virus in Pork)

การตรวจพบไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในเนื้อสัตว์จากสัตว์ที่ถูกส่งมายังโรงฆ่านั้นมีโอกาสน้อยมาก เนื่องจากสัตว์ที่หายป่วยจากโรค หรือมีภาวะเป็นตัวนำโรค (Carrier) จะไม่พบว่ามีไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยคงอยู่ในกล้ามเนื้อ (Sutmoller, 2001) ยกเว้นในกรณีที่สัตว์นั้นเพิ่งได้รับไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยมาและกำลังอยู่ในภาวะแสดงอาการเท่านั้น ซึ่งในกรณีนี้สัตว์ก็มักจะถูกคัดทิ้งก่อนที่จะถูกยอมรับเข้าสู่โรงฆ่า นอกจากนี้แล้วหลังผ่านกระบวนการฆ่า กล้ามเนื้อของสัตว์จะมีการหดเกร็งตัวหลังฆ่า (Rigor Mortis) ซึ่งกระบวนการสลาย Glycogen ที่สะสมภายในกล้ามเนื้อเพื่อสร้างพลังงานแบบไม่ใช้อ็อกซิเจนส่งผลให้กล้ามเนื้อมีการสะสมของกรดแลคติคและมีสภาวะที่เป็นกรดสูงขึ้น โดย Knight (1975) ได้อ้างว่าสภาวะที่เป็นกรดสูงขึ้นนั้นสามารถทำให้โครงสร้างที่เป็นโปรตีนของไวรัสเสื่อมสภาพ (Denature) เท่ากับเป็นการป้องกันการเพิ่มจำนวนของไวรัส ดังเช่นที่มีการรายงานโดย Saunders (1986) ซึ่งพบว่าหลังจากที่ทำการชำแหละเนื้อโคและได้ทำการบ่มซากทิ้งไว้ (Maturation) พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของกล้ามเนื้อลดลงเหลือเพียง 5.5 ซึ่งสามารถทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้ แต่อย่างไรก็ตามเนื้อสุกรกลับไม่พบว่าเป็นเช่นนั้นเนื่องจากในเนื้อสุกรมี Glycogen สะสมอยู่น้อยกว่าในเนื้อโค จึงทำให้ระดับการสะสมของกรดแลคติคไม่เพียงพอที่จะทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ลดลงจนถึงระดับที่สามารถทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้ (Cottral et al., 1960)

Panina และคณะ (1989) ได้รายงานถึงผลของกระบวนการหมักเนื้อสุกรในขั้นตอนการผลิตไส้กรอกหมักแบบอิตาเลียน (Italian salami) จากเนื้อสุกรที่ได้ทำการทดลองให้ติดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย หลังจากที่ทำการชำแหละซากพบว่ากล้ามเนื้อและไขมันของสุกรมีระดับความเข้มข้นของไวรัสสะสมสูงถึง 5.0 Log_{10} PFU/mg แต่เมื่อเนื้อสุกรได้ผ่านกระบวนการหมักตามกระบวนการผลิตเป็นเวลา 60 วัน ซึ่งมีผลทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของเนื้อสุกรลดลงต่ำกว่า 5.6 พบว่าไม่มีไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยหลงเหลืออยู่ในเนื้อสุกร

Mebus และคณะ (1993) รายงานว่าหลังจากที่ได้ทำการฉีดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเข้าสู่สุกรจำนวน 31 ตัวทางหลอดเลือดดำแล้วทำการชำแหละซากหลังจากนั้นเป็นเวลา 2 วัน พบว่าในเลือด ต่อมน้ำเหลือง ไขกระดูก ไขมัน และกล้ามเนื้อมีระดับความเข้มข้นเฉลี่ยของไวรัสเท่ากับ 4.3, 4.1, 2.7, 0.8 และ 0.1 Log_{10} PFU/ml ตามลำดับ โดยระดับความเข้มข้นสูงสุดของไวรัสที่พบในไขมัน และกล้ามเนื้อเท่ากับ 3.7 และ 1.0 Log_{10} PFU/ml

Chou and Yang (2004) ได้ทดลองฉีดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเข้าทางผิวหนังสุกรจำนวน 5 ตัว เมื่อสุกรแสดงอาการทางคลินิคจึงทำการชำแหละซาก จากการวัดระดับความเข้มข้นของไวรัสโดยใช้ Baby Hamster Kidney Cells (BHK-21) พบว่าในซีรั่ม ต่อมน้ำเหลือง และเลือดที่แข็งตัวแล้ว (Blood Clot) มีระดับความเข้มข้นของไวรัสเฉลี่ยเท่ากับ 4.82, 3.76 และ 4.68 Log_{10} $TCID_{50}$/ml ตามลำดับ ส่วนในกล้ามเนื้อนั้นไม่พบว่ามีไวรัส โดยที่มีขอบเขตจำกัดของการตรวจ (Detection Limit) อยู่ที่ 1.52 Log_{10} $TCID_{50}$/ml

2.4 การทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยความร้อน (Thermal Inactivation of Foot-and-Mouth Disease Virus)

การทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยนั้นสามารถทำได้หลายวิธีไม่ว่าจะเป็นการใช้ความร้อน สารเคมีบางชนิดอย่างเช่น Formaldehyde และ Guanidine หรือแม้กระทั่งการใช้สารกัมมันตภาพรังสี (Dekker, 1998; Nettleton et al.,1982) แต่สำหรับในกรณีที่ต้องการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่มีการปนเปื้อนในสิ่งที่จะนำมาเป็นอาหารของมนุษย์อย่างเช่นเนื้อสัตว์นั้น การใช้ความร้อน (Thermal Inactivation) เป็นวิธีการมาตรฐานที่มีความเหมาะสมและความปลอดภัยมากที่สุด โดยกลไกในการทำลายไวรัส คือ ความร้อนทำให้เกิดการทำลาย Viral Capsid และโครงสร้างทุติยภูมิ (Secondary Structure) ของโมเลกุล RNA ของไวรัส ส่งผลให้ขบวนการเข้าสู่เซลล์และการเพิ่มจำนวนของไวรัสสูญเสียไป (Chou and Yang, 2004)

ในอดีตที่ผ่านมามีการรายงานการใช้ความร้อนในการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในสื่อชนิดต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นหยดเลือด น้ำนม เนื้อสัตว์ หรือน้ำล้างอุจจาระสุกร (Swine slurry) ดังเช่นที่มีการรายงานโดย Forbes และ Cottral ในปี 1969 ซึ่งได้ทำการทดลองการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์ O ในหยดเลือด และผงเลือดแห้ง โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสสามารถทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่อยู่ในหยดเลือดได้ภายในเวลา 30 วินาที และพบว่าที่อุณหภูมิ 86 องศาเซลเซียสสามารถทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่อยู่ในผงเลือดแห้งได้ภายในเวลา 8 นาที จากการตรวจแยกไวรัสโดยใช้ Calf Kidney Cells ต่อมา De Leeuw และคณะ (1980) ได้ทดลองทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์ O ในน้ำนมจากแม่โคที่ทำการทดลองให้ติดเชื้อจากการฉีดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเข้าทางเต้านม และตรวจแยกไวรัสโดยใช้ Bovine Embryo Thyroid cells จากการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสสามารถทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้ในเวลา 4 นาที และที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียสสามารถทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้ในเวลา 2 นาที

Nettleton และคณะ (1982) ได้ศึกษาการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทุกซีโรไทป์ในสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) ที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์ O, A และ Asia-1 ซึ่งเป็นซีโรไทป์ที่มีรายงานการระบาดในประเทศไทยนั้นมีการลดลงเท่ากับ 2.53, 3.39 และ 2.37 Log_{10} PFU/ml ตามลำดับ จากการตรวจแยกไวรัสโดยใช้ Baby Hamster Kidney cells และในปีเดียวกันนี้ Blackwell และคณะ (1982) ได้รายงานถึงการทดลองทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์ O ในต่อมน้ำเหลืองโคจากโคที่ได้รับการหยดไวรัสเข้าสู่จมูกแล้วทำการชำแหละซากหลังจากนั้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลการทดลองระบุว่าไวรัสถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิ 82 องศาเซลเซียส ในเวลา 2 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที จากการตรวจแยกไวรัสโดยวิธี Cattle Inoculation

ในปี 1988 Blackwell และคณะได้รายงานถึงผลการทดลองการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในเนื้อโคจากโคที่ได้ทำการหยดไวรัสเข้าสู่จมูกแล้วทำการชำแหละซากเมื่อแสดงอาการทางคลินิคโดยเนื้อที่ได้นั้นจะนำมาทำการบดผสมกับต่อมน้ำเหลืองแล้วทำการอัดลงในแบบจำลองพลาสติกขนาด 17.5 X 32 ซม. หนา 80 ไมครอน ผลการทดลองพบว่าไวรัสถูกทำลายที่อุณหภูมิ 79.4 องศาเซลเซียส ในเวลา 2 ชั่วโมง จากการตรวจแยกไวรัสโดยวิธี Cattle Inoculation และในปีเดียวกันนี้ Garcia-Vidal และคณะ (1988) ได้รายงานถึงการทดลองทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์ O ในเนื้อโคในรูปแบบเดียวกัน ต่างกันตรงที่ลักษณะของเนื้อที่ใช้นั้นจะมีหลายลักษณะได้แก่ เนื้อบดผสมต่อมน้ำเหลือง เนื้อหั่นเป็นลูกเต๋าผสมต่อมน้ำเหลือง และเนื้อหั่นสไลด์บางผสมต่อมน้ำเหลือง ผลการทดลองพบว่าไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยถูกทำลายได้เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากการตรวจแยกไวรัสโดยใช้ Baby Hamster Kidney Cells และ Cattle Inoculation

Masana และคณะ (1995) รายงานถึงการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์ O ในเนื้อโคจากโคที่ฉีดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเข้าสู่เนื้อเยื่อลิ้นแล้วชำแหละซากเมื่อแสดงอาการทางคลินิคเช่นกัน โดยแบ่งชิ้นเนื้อให้ได้ขนาด 8 X 20 ซม. น้ำหนัก 1 กิโลกรัม ผลการทดลองพบว่าไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยถูกทำลายที่อุณหภูมิ 71 องศาเซลเซียส ในเวลา 10.6 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส ในเวลา 5.75 ชั่วโมง จากการตรวจแยกไวรัสโดยวิธี Cattle Inoculation

ต่อมาได้มีการรายงานถึงการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์ O ในน้ำล้างอุจจาระสุกร (Swine slurry) ซึ่งพบว่าสุกรที่ทำการทดลองให้ติดเชื้อมีการขับไวรัสออกมาได้ทางอุจจาระ เปรียบเทียบกับไวรัสที่อยู่ในสารละลาย Glasgow Eagles Medium จากการทดลองพบว่าไวรัสที่อยู่ในน้ำล้างอุจจาระถูกทำลายที่อุณหภูมิ 67 องศาเซลเซียส ในเวลา 3 นาที ส่วนไวรัสที่อยู่ในสารละลาย Glasgow Eagles Medium ถูกทำลายที่อุณหภูมิ 67 องศาเซลเซียส ในเวลา 5 นาที จากการตรวจแยกไวรัสโดยใช้ Baby Hamster Kidney Cells (Turner et al., 2000)

จากการประเมินข้อมูลการศึกษาการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยความร้อนที่ผ่านมาสามารถทำการสรุปและวิเคราะห์อัตราการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (D-value) ได้ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งจากการประเมินอัตราการทำลายไวรัส (D-value) พบว่า ข้อมูลที่ได้นั้นไม่มีความสอดคล้องกันระหว่างอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำลายไวรัส ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในแต่ละการทดลองมีการใช้สื่อที่แตกต่างกันไม่ว่าจะเป็น น้ำนม หรือ เนื้อ นอกจากนี้ขนาดและปริมาตรของสื่อก็เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลให้เกิดความแตกต่างอีกด้วย ดังนั้น จึงควรทำการทดลองเพื่อหาช่วงเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยอย่างแท้จริง และควรเป็นไวรัสสเตรนที่มีการระบาดในประเทศไทยโดยตรงเพื่อนำมาเก็บเป็นฐานข้อมูลซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการใช้เจรจาต่อรองทางการค้าต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 อัตราการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (D-value) ด้วยความร้อน

ซีโรไทป์	อุณหภูมิ (°C)	D-value (นาที)	สื่อ	วิธีการตรวจแยกไวรัส	เอกสารอ้างอิง
O	80	0.15	หยดเลือด	Calf Kidney Cells	Forbes and Cottral (1969)
	86	2.42	ผงเลือดแห้ง		
O	60	0.65	น้ำนม	Bovine Embryo Thyroid Cells	De Leeuw และคณะ (1980)
	63	0.32			
O	54	23.70	PBS	Baby Hamster Kidney Cells	Nettleton และคณะ (1982)
A	54	17.70	PBS	Baby Hamster Kidney Cells	Nettleton และคณะ (1982)
Asia-1	54	25.30	PBS	Baby Hamster Kidney Cells	Nettleton และคณะ (1982)
O	82	23.52	ต่อมน้ำเหลืองบด 1 กรัม	Cattle Inoculation	Blackwell และคณะ (1982)
	90	5.88			
ไม่ระบุ	79	30.00	เนื้อบดผสมต่อมน้ำเหลือง ขนาด 17.5 x 32 ซม.	Cattle Inoculation	Blackwell และคณะ (1988)
O	75	3.00	เนื้อบด, เนื้อหั่นเป็นลูกเต๋า, เนื้อหั่นสไลด์บาง	Baby Hamster Kidney Cells, Cattle Inoculation	Garcia-Vidal และคณะ (1988)
	80	4.00			
O	71	147.00	เนื้อโค 1 กิโลกรัม ขนาด 8 x 20 ซม.	Cattle Inoculation	Masana และคณะ (1995)
	75	79.30			
O	67	0.75	น้ำล้างอุจจาระ (Swine slurry)	Baby Hamster Kidney Cells	Turner และคณะ (2000)
	67	1.00	Glasgow Eagles Medium		

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1 วัตถุดิบที่ใช้ในงานวิจัย (สามารถดูเทคนิคการเตรียมประกอบได้ในภาคผนวก ก และ ข)

3.1.1.1 อาหารเลี้ยงเซลล์ Eagle's Minimum Essential Medium

3.1.1.2 Tryptose Phosphate Broth

3.1.1.3 L-Glutamine

3.1.1.4 Fetal Bovine Serum

3.1.1.5 สารต้านเชื้อรา (Fungizone)

3.1.1.6 สารต้านจุลชีพ (Antibiotic)

3.1.7.7 สารละลาย Trypsin-Versene

3.1.7.8 เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Baby Hamster Kidney 21 (BHK-21)

3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.2.1 โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$)

3.1.2.2 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

3.1.2.3 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)

3.1.2.4 โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต(KH_2PO_4)

3.1.2.5 โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCL)

3.1.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.3.1 96-well plate

3.1.3.2 96-well dilution tube

3.1.3.3 ไมโครปิเปต ขนาด 50-200 µl และ 200-1000 µl

3.1.3.4 ไมโครปิเปตทิป ขนาด 200 µl และ 1000 µl

3.1.3.5 ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 cm^2

3.1.3.6 หลอดแก้วขนาด 10 ml

3.1.3.7 จุกยางปิดหลอดแก้ว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.3.8 กระติกน้ำแข็ง

3.1.3.9 ปิเปตแก้วขนาด 2 ml, 5 ml, และ 10 ml

3.1.4 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.4.1 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Julabo® TWB22, Germany)

3.1.4.2 เครื่องวัดอุณหภูมิพร้อมแท่งวัดอุณหภูมิ (Hanna® HI98701, Italy)

3.1.4.3 ตู้ CO_2 Incubator (Sanyo® MCO-17AC/15AC, Japan)

3.1.4.4 นาฬิกาจับเวลา

3.1.4.5 กล้องจุลทรรศน์

3.1.5 ตัวอย่างไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ใช้ในงานวิจัย

ตัวอย่างไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ใช้ในการศึกษาควรเป็นไวรัสที่มีความเป็นตัวแทนของไวรัสที่มีการระบาดในประเทศไทย ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงคัดเลือกไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์ O, A และ Asia-1สเตรนที่เคยมีการระบาดในประเทศไทย ซึ่งแยกโดยศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา และเป็นสเตรนที่กรมปศุสัตว์ได้นำมาผลิตเป็นวัคซีนเพื่อใช้ในการป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อย สเตรนของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้แก่ O/Udornthani/1987, O/Nakhonpathom/1965, A/Saraburi/1987, A/Sakolnakorn/1997, A132/1989 และ Asia-1/Petchaburi/1985 โดย Linchongsubongkoch (2003) ได้รายงานถึงความไม่แตกต่างกันทางซีรั่มวิทยาจากการตรวจด้วยวิธี Liquid Phase Blocking ELISA (LP ELISA) ระหว่างสเตรน O/Udornthani/1987 และ Asia-1/ Petchaburi/1985 ที่ใช้เป็นสเตรนอ้างอิงในการผลิตวัคซีน กับสเตรนที่มีการระบาดในพื้นที่ของประเทศไทย

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

ศึกษาการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยความร้อนที่อุณหภูมิทั้งหมด 6 อุณหภูมิ คือ 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส โดยในแต่ละอุณหภูมิจะใช้ระยะเวลาในการทำลายไวรัสทั้งหมด 6 เวลาดังแสดงในตารางที่ 3 ซึ่งกำหนดจากผลของการศึกษานำร่อง (Preliminary Study) เพื่อให้สามารถตรวจพบไวรัสที่เหลือได้ก่อนไวรัสจะถูกทำลายหมด จากนั้นจึงนำตัวอย่างไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ผ่านการทำลายด้วยความร้อนในระยะเวลาต่างๆกันไปทำการวัดระดับความเข้มข้นของไวรัส (Virus Titration) เพื่อสร้างกราฟแสดงการทำลายไวรัส และ

วิเคราะห์อัตราการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (D-Value) โดยการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทุกสเตรนในแต่ละอุณหภูมินั้นทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง

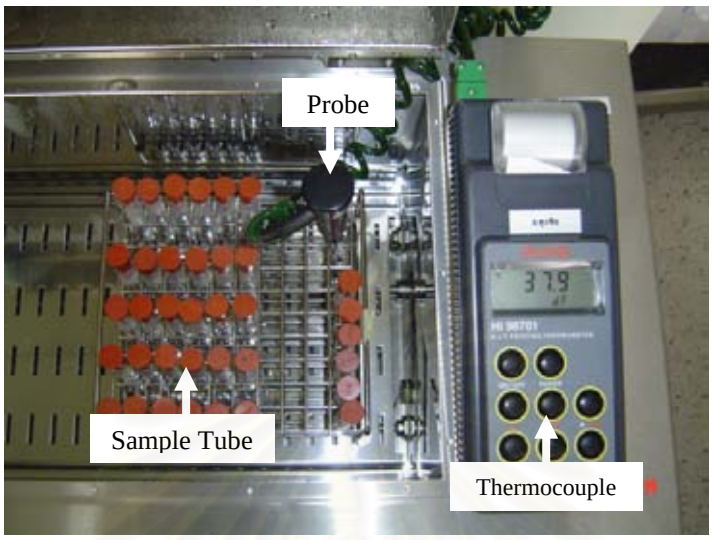
ตารางที่ 3 ระยะเวลาที่ใช้ในการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในแต่ละอุณหภูมิ

50°C (นาที)	60°C (วินาที)	70°C (วินาที)	80°C (วินาที)	90°C (วินาที)	100°C (วินาที)
0	0	0	0	0	0
6	30	15	15	15	10
12	60	30	25	25	15
18	75	40	35	30	20
24	90	50	45	35	25
30	105	60	55	40	30

ขั้นตอนการทำลายไวรัสด้วยความร้อน

1. เตรียมหลอดแก้วปลอดเชื้อขนาด 10 ml ให้มีจำนวนเพียงพอกับจำนวนสเตรนของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ช่วงเวลาที่ต้องการทดลอง และหลอดควบคุม
2. เจือจางตัวอย่างสารละลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยลงในหลอดแก้วที่เตรียมไว้ 10 เท่า ด้วยสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) ที่ความเข้มข้น 0.04 M โดยสัดส่วนที่ใช้คือ สารละลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย 200 µl ต่อ สารละลาย PBS 1,800 µl ส่วนหลอดควบคุมใส่สารละลาย PBS 2,000 µl
3. ปิดจุกยางที่หลอดแก้วทุกหลอดให้สนิทยกเว้นหลอดควบคุม ระบุสเตรน ช่วงเวลา และอุณหภูมิที่ข้างหลอดแก้วให้ชัดเจน
4. ปรับอุณหภูมิของอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath; Julabo® TWB22) ให้อยู่ในระดับที่ต้องการ
5. จุ่มหัววัดอุณหภูมิ (Probe) ของเครื่องวัดอุณหภูมิ (Thermocouple; Hanna® HI98701) ลงในหลอดควบคุมแล้วทำการบันทึกอุณหภูมิขณะนั้นเป็นเวลา 0 วินาที
6. จุ่มหลอดแก้วทั้งหมดที่เตรียมไว้รวมทั้งหลอดควบคุมลงในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิพร้อมกัน แล้วทำการบันทึกอุณหภูมิจากเครื่องวัดอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นในทุกๆ 10 วินาที (รูปที่ 7)
7. เมื่อถึงช่วงเวลาที่กำหนดให้นำหลอดแก้วออกจากอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแล้วนำไปแช่น้ำแข็งให้อุณหภูมิลดลงอย่างรวดเร็วเพื่อเป็นการหยุดการทำลายไวรัสด้วยความร้อน (De Leeuw et al., 1980; Blackwell et al., 1982)

8. นำสารละลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ผ่านการทำลายด้วยความร้อนแล้วไปทำการวัดระดับความเข้มข้นต่อไป



รูปที่ 7 การทำลายไวรัสด้วยความร้อน

ขั้นตอนการวัดระดับความเข้มข้นของไวรัส (ราตรี, 2533)

1. เติมสารละลาย Maintenance Medium (MM) ลงในหลอดพลาสติกที่ปลอดเชื้อหลอดละ 900 µl เพื่อเตรียมในการทำการเจือจางไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยแบบ Serial 10-fold dilutions
2. เติมสารละลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยลงในหลอดที่เตรียมไว้ 100 µl ผสมให้เข้ากันซึ่งจะทำให้ได้ไวรัสที่เจือจางลงไป 10 เท่า (10^{-1})
3. เปลี่ยนไมโครปิเปตทิปใหม่แล้วจึงดูดส่วนผสมของไวรัสในหลอดแรก 100 µl เติมลงในหลอดที่ 2 ผสมให้เข้ากันซึ่งจะทำให้ได้ไวรัสที่เจือจางลงไป 100 เท่า (10^{-2})
4. ทำซ้ำในลักษณะเดียวกับข้อ 3 จนกระทั่งได้ไวรัสที่เจือจางลงไป 1,000,000 เท่า (10^{-6}) ของสารละลายไวรัสเริ่มต้น
5. ย่อยเซลล์เพาะเลี้ยง (BHK-21) ออกจากขวดเลี้ยงเซลล์โดยใช้ Trypsin-Versene (TV) แล้วนำเซลล์ที่ย่อยได้มาเติมลงใน Growth Medium (GM) ที่เตรียมไว้โดยให้มีความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ $2x10^5$ cells/ml
6. หยอดเซลล์ลงใน 96-well plate (Costar®) ชนิดก้นแบนทุกหลุมๆ ละ 100 µl
7. ระบุรายละเอียดของสเตรน ระยะเวลา อุณหภูมิ และลำดับการเจือจางของสารละลายไวรัสตามแถวบนฝาของ 96-well plate ให้ชัดเจน

8. หยอดสารละลายไวรัสที่เจือจางแล้วลงในแต่ละหลุมๆละ 50 µl ตามแถวที่ได้กำหนดไว้ โดยแถวที่เป็นเซลล์ควบคุมนั้นจะทำการหยอด Maintenance Medium ลงไปแทน
9. นำ plate ไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยที่มีก๊าซคาร์บอนไดอ็อกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
10. อ่านและบันทึกผลโดยสังเกตจากการที่ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงเกิดสภาวะ Cytopathic Effect (CPE) (รูปที่ 8, 9 และ 10)
11. คำนวณความเข้มข้นของไวรัสซึ่งมีหน่วยเป็น Log_{10} $TCID_{50}$/ml หรือค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงเกิดการเปลี่ยนแปลงไปร้อยละ 50 (Tissue Culture Infection Dose 50%) ด้วยวิธีการของ Reed and Muench (1938) ซึ่งเป็นการคำนวณจากค่า Proportionate Distance (PD) ระหว่างลำดับการเจือจางที่พบการเกิด Cytopathic effect (CPE) ร้อยละ50 โดยกำหนดให้

    A = ร้อยละสะสมของการเกิด CPE ค่าแรกที่มากกว่าร้อยละ 50

    B = ร้อยละสะสมของการเกิด CPE ค่าแรกที่น้อยกว่าร้อยละ 50

    C = ลำดับการเจือจางของไวรัส

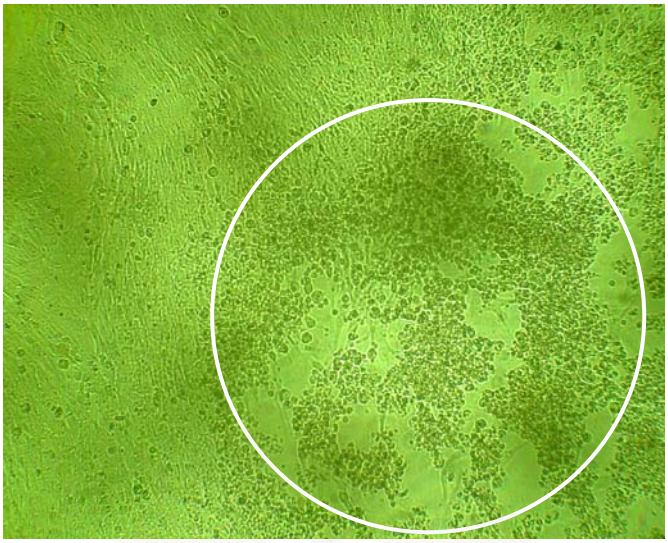
    แทนค่าในสูตร

    $$PD = (A - 50) / (A - B)$$

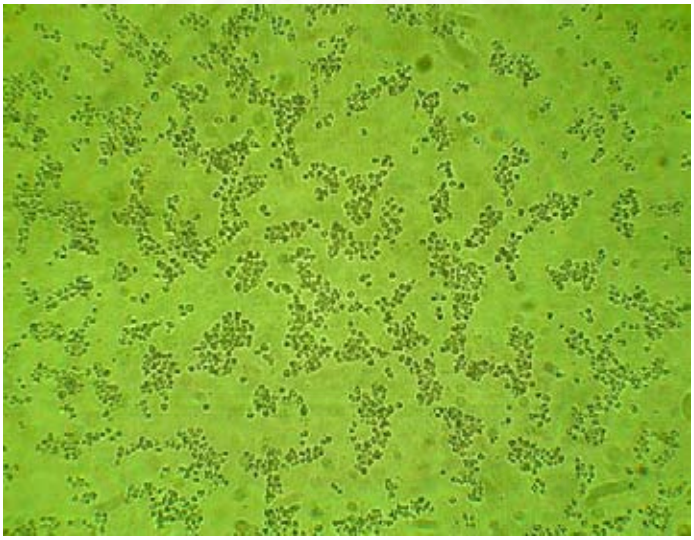
    เมื่อได้ค่า PD แล้ว นำมาคำนวณต่อตามสูตร

    $$Log_{10}\ TCID_{50} = Log\ C - PD$$

รูปที่ 8 เซลล์เพาะเลี้ยง BHK-21 ปกติ



รูปที่ 9 เซลล์เพาะเลี้ยง BHK-21 ขณะเกิดภาวะ Cytopathic Effect บางส่วน



รูปที่ 10 เซลล์เพาะเลี้ยง BHK-21 ขณะเกิดภาวะ Cytopathic Effect ทั้งหมด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

3.3.1 การวิเคราะห์หาอัตราการทำลายไวรัส (D-value)

3.3.1.1 สร้างกราฟแสดงการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในแต่ละอุณหภูมิด้วยโปรแกรม Microsoft Excel โดยกำหนดให้แกน Y แสดงถึงระดับความเข้มข้นของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ส่วนแกน X แสดงถึงระยะเวลาเริ่มตั้งแต่ 0 วินาที

3.3.1.2 เติมเส้นแนวโน้มโดยกำหนดให้โปรแกรมแสดงค่าสมการเส้นตรงด้วย

3.3.1.3 คำนวณ D-value จากค่าลบของส่วนกลับของความชันจากสมการเส้นตรงนั้น โดย D-value จะแสดงถึงระยะเวลาที่ใช้ในการลดความเข้มข้นของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยลง 1 Log หรือ ร้อยละ 90 โดยประมาณ

3.3.2 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ค่าความชัน (Slope; β) ของกราฟแสดงการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยว่ามีความแตกต่างจาก 0 หรือไม่ด้วย Linear Regression จากนั้นเปรียบเทียบ D-value ถึงประสิทธิภาพของการทำลายไวรัสที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน และเปรียบเทียบ D-value ถึงความต้านทานความร้อนระหว่างสเตรนของไวรัสด้วยช่วงระยะความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95

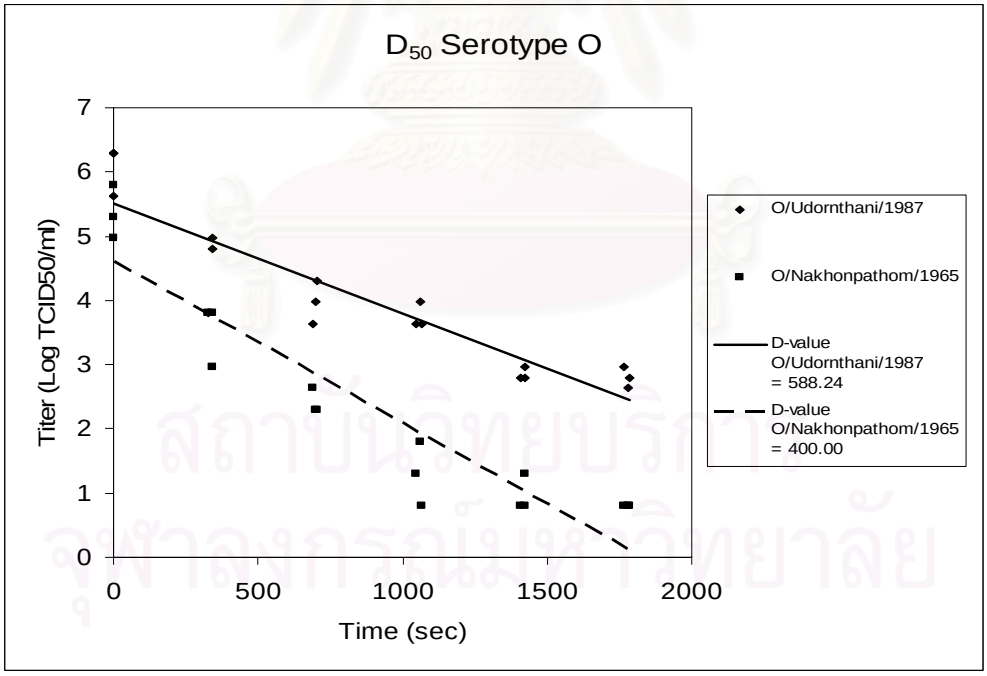
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

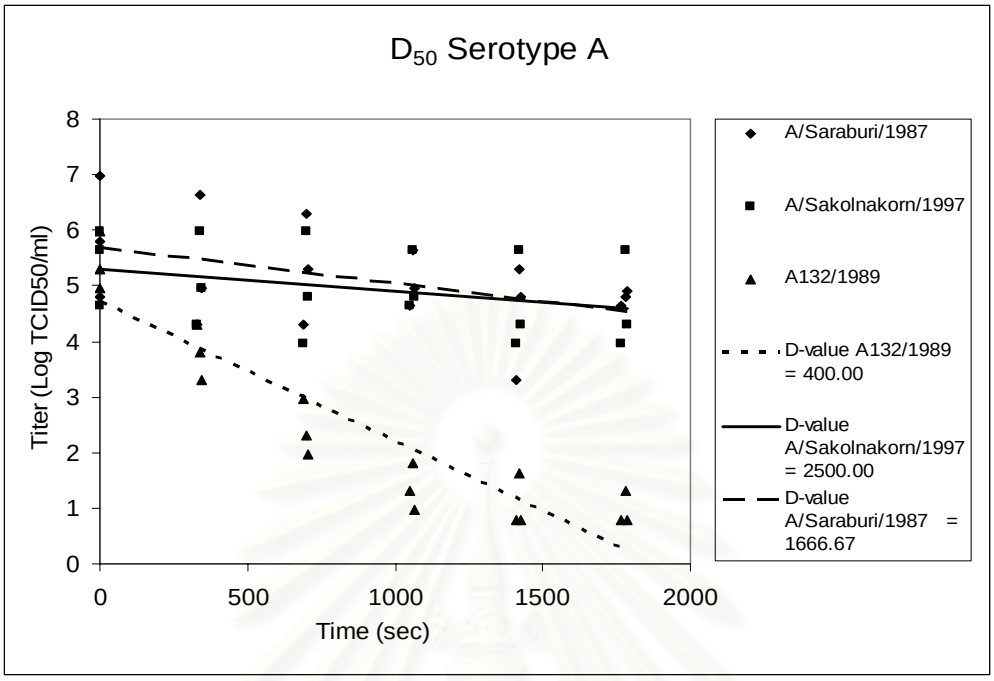
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ผลการวิเคราะห์หาอัตราการทำลายไวรัส (D-value)

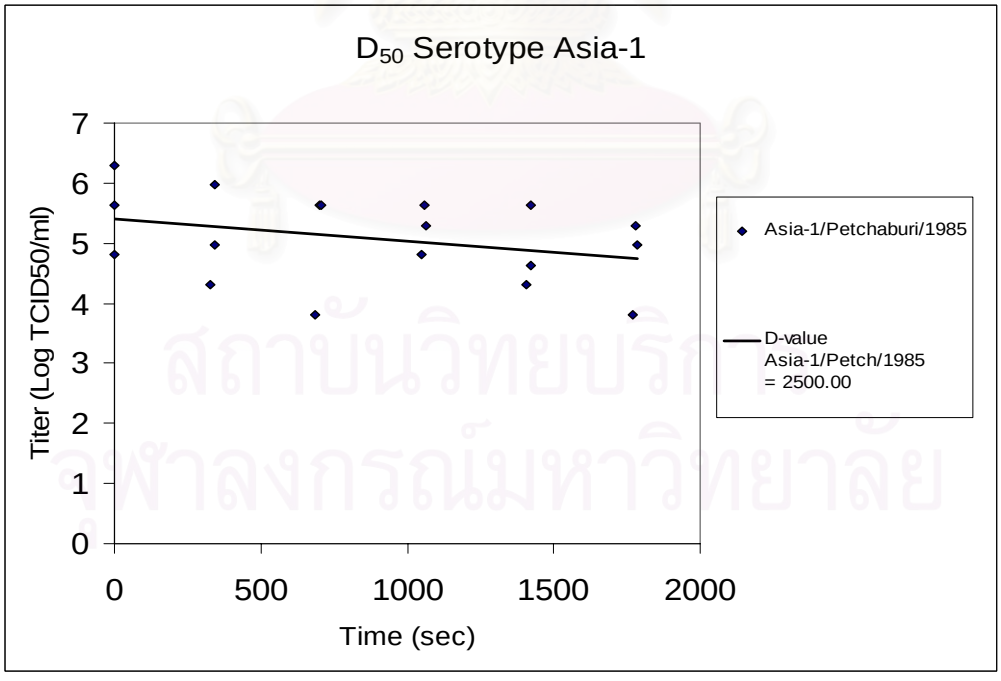
จากการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้ง 6 สเตรน (O/Udornthani/1987, O/Nakhonpathom/1965, A/Saraburi/1987, A/Sakolnakorn/1997, A132/1989 และ Asia-1/Petchaburi/1985) ด้วยความร้อนในอุณหภูมิทั้งหมด 6 อุณหภูมิ คือ 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส แล้วนำตัวอย่างไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ผ่านการทำลายด้วยความร้อนในระยะเวลาต่างๆกันไปวัดระดับความเข้มข้น โดยทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง สามารถนำข้อมูลมาใช้สร้างกราฟแสดงการทำลายไวรัส และวิเคราะห์หาอัตราการทำลายไวรัส (D-Value) โดยแบ่งตามชนิดของซีโรไทป์ได้ดังต่อไปนี้ (รูปที่ 11-28) (สามารถดูกราฟแสดงการทำลายไวรัส และ D-value แบบจำเพาะสเตรนประกอบได้ในภาคผนวก ค)



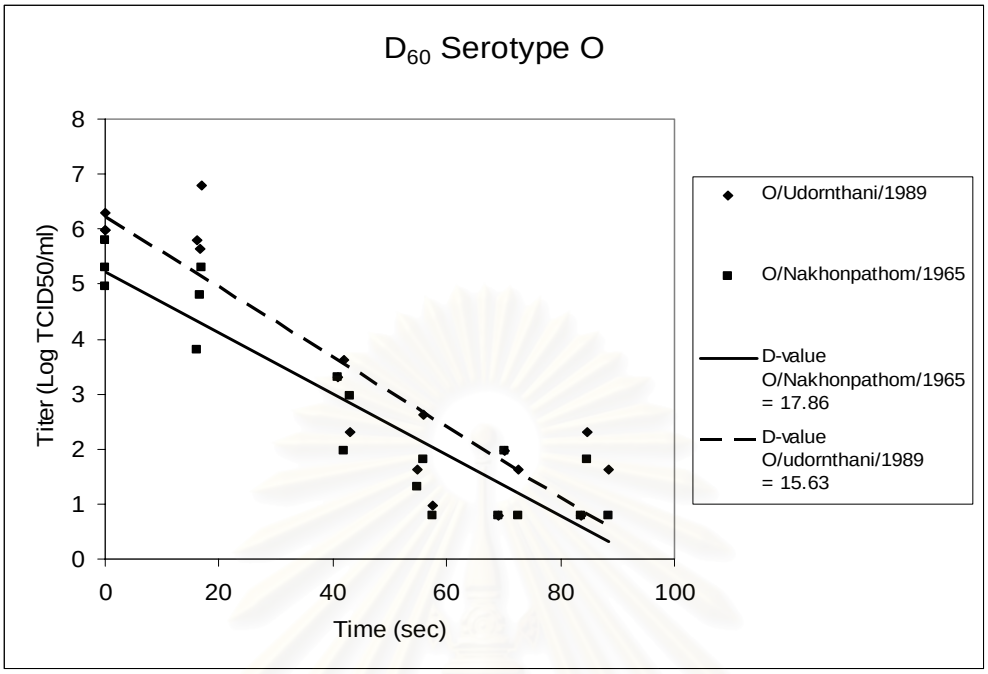
รูปที่ 11 กราฟแสดงการทำลายไวรัสซีโรไทป์ O และ D-value ที่ 50°C



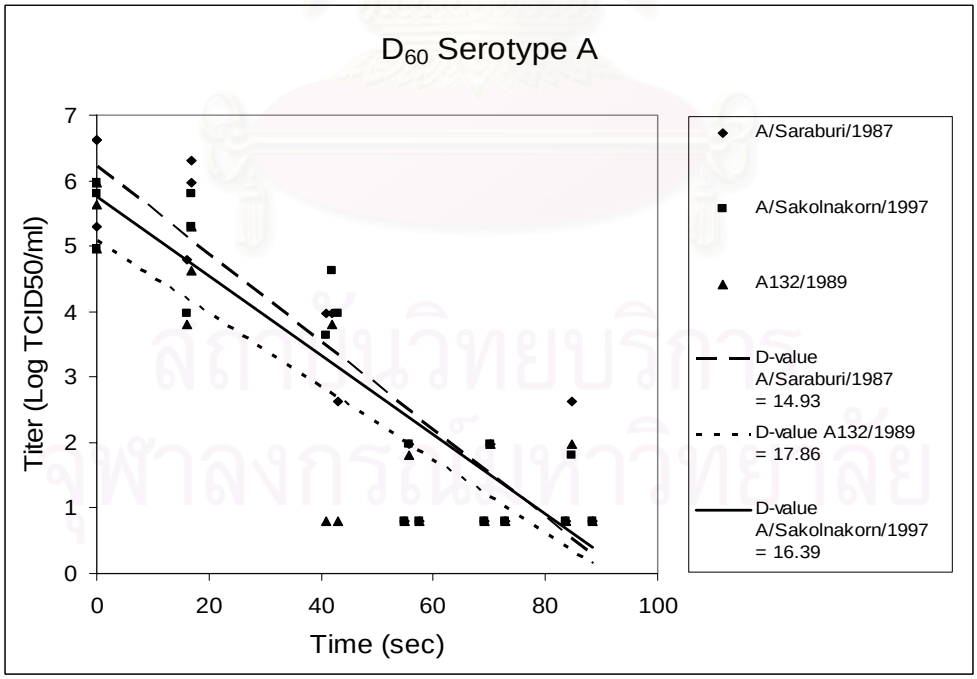
รูปที่ 12 กราฟแสดงการทำลายไวรัสซีโรไทป์ A และ D-value ที่ 50°C



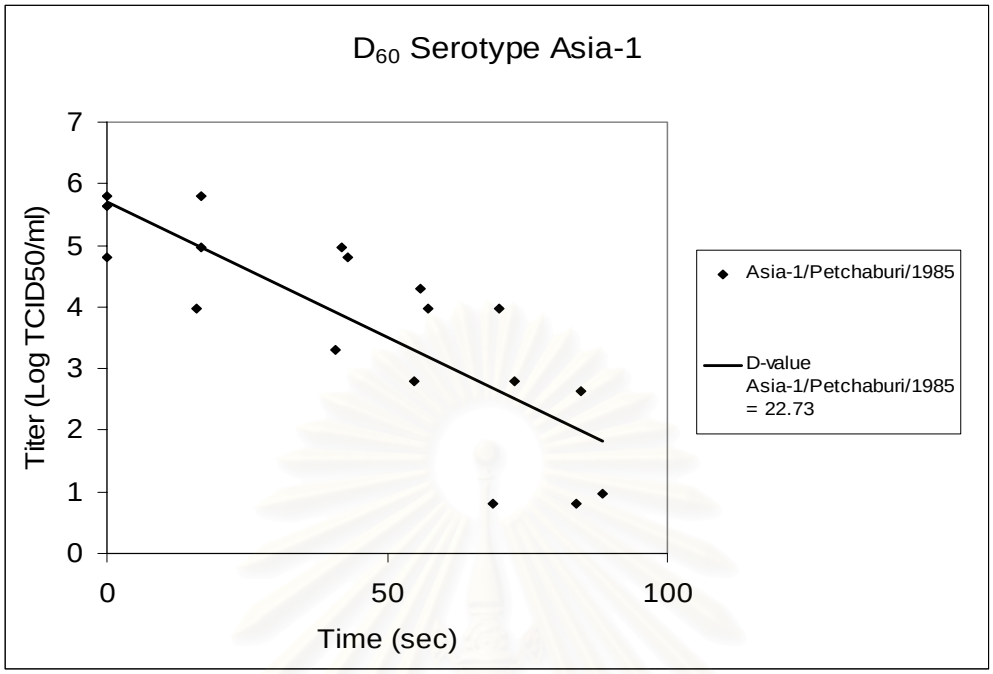
รูปที่ 13 กราฟแสดงการทำลายไวรัสซีโรไทป์ Asia-1 และ D-value ที่ 50°C



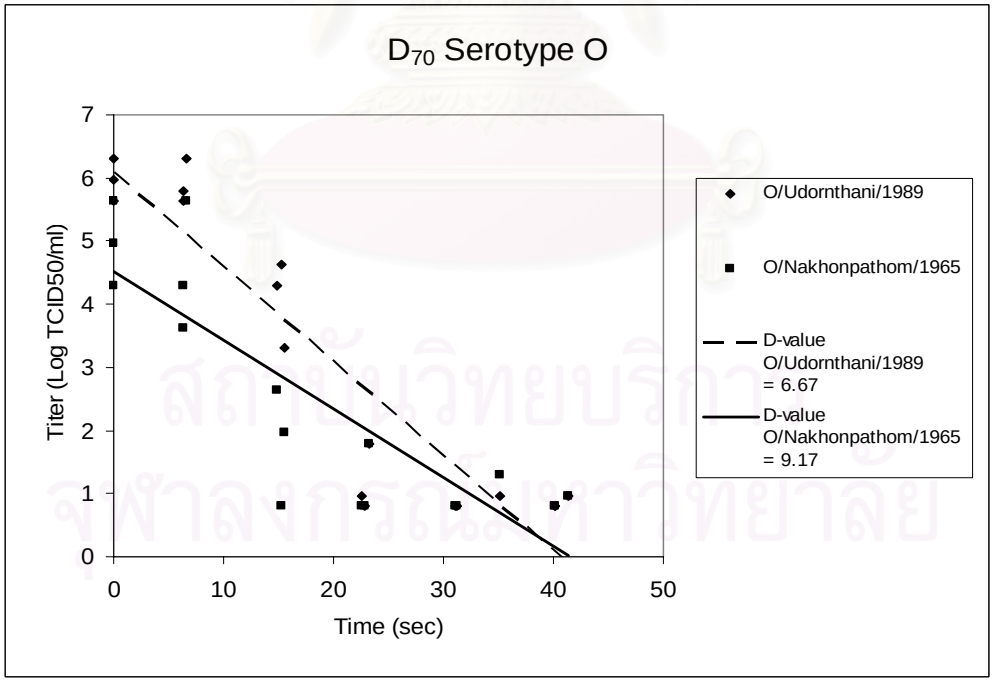
รูปที่ 14 กราฟแสดงการทำลายไวรัสซีโรไทป์ O และ D-value ที่ 60°C



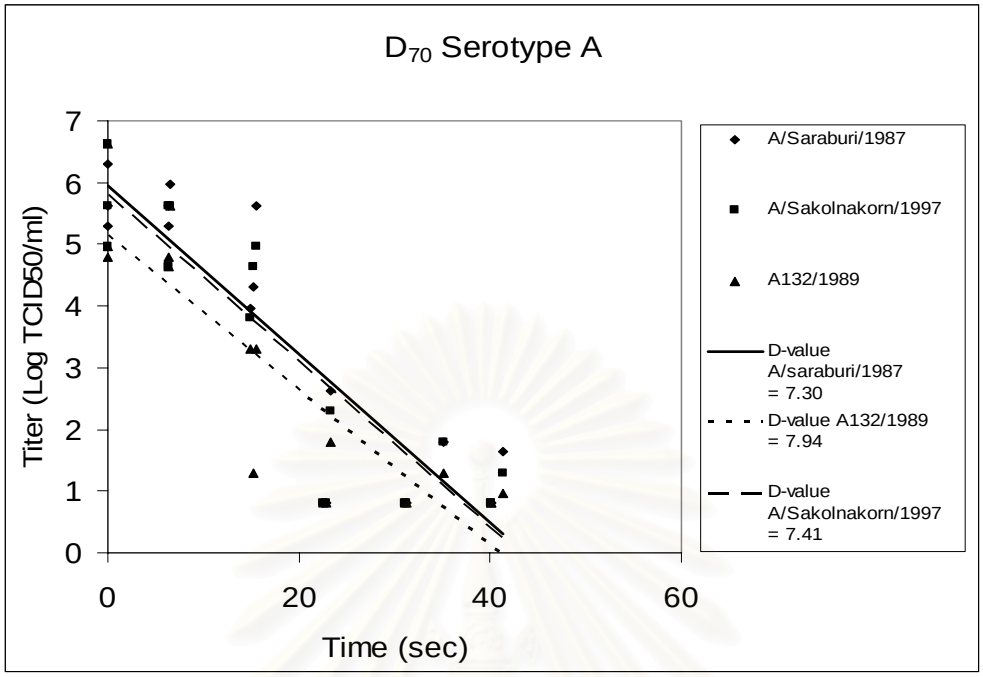
รูปที่ 15 กราฟแสดงการทำลายไวรัสซีโรไทป์ A และ D-value ที่ 60°C



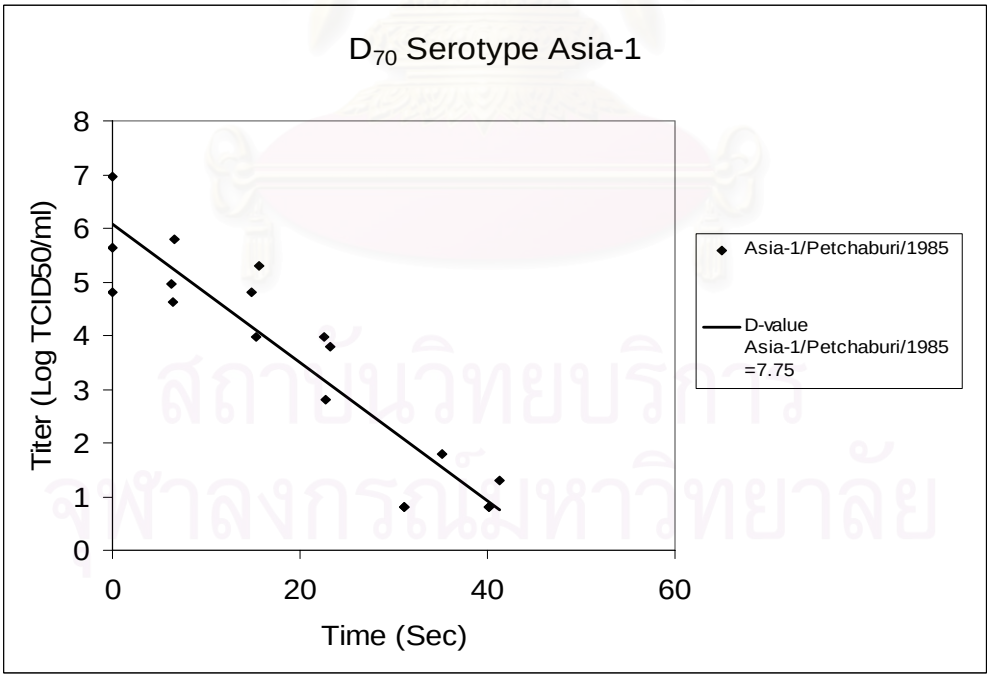
รูปที่ 16 กราฟแสดงการทำลายไวรัสซีโรไทป์ Asia-1 และ D-value ที่ 60°C



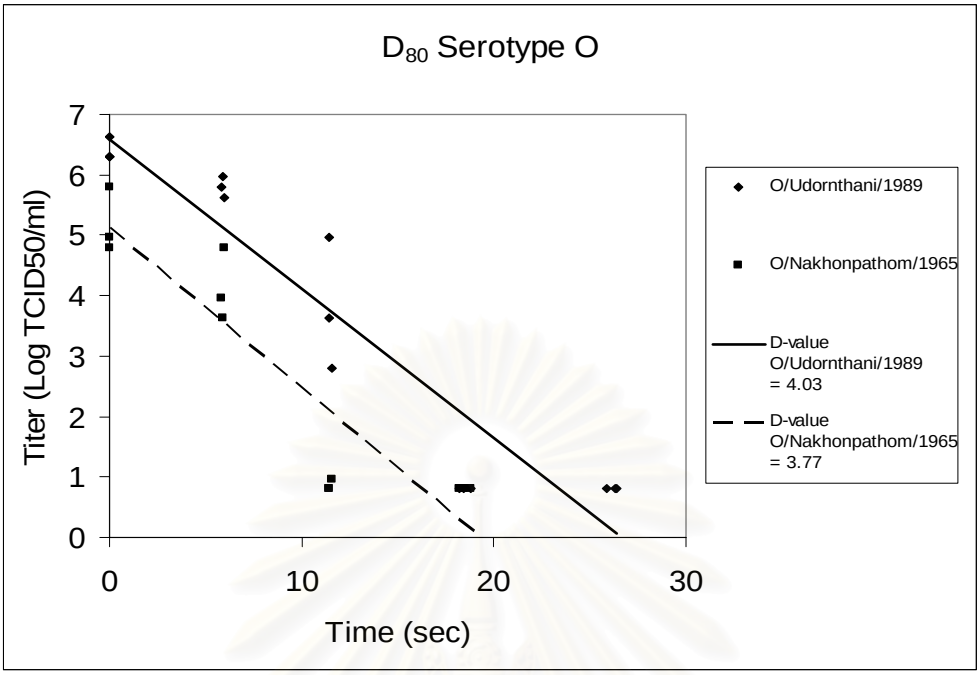
รูปที่ 17 กราฟแสดงการทำลายไวรัสซีโรไทป์ O และ D-value ที่ 70°C



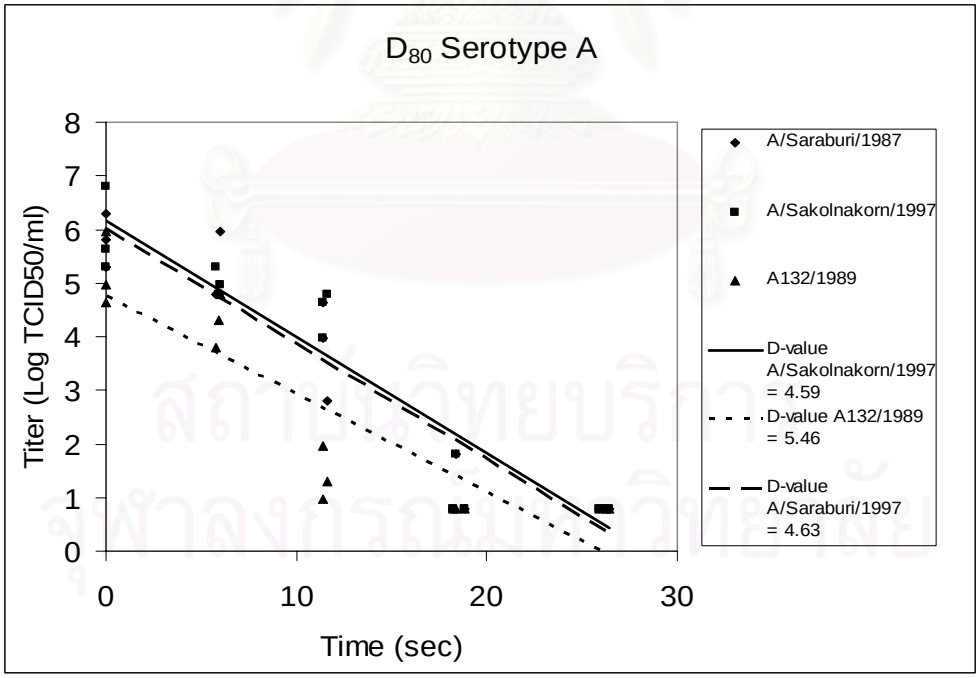
รูปที่ 18 กราฟแสดงการทำลายไวรัสซีโรไทป์ A และ D-value ที่ 70°C



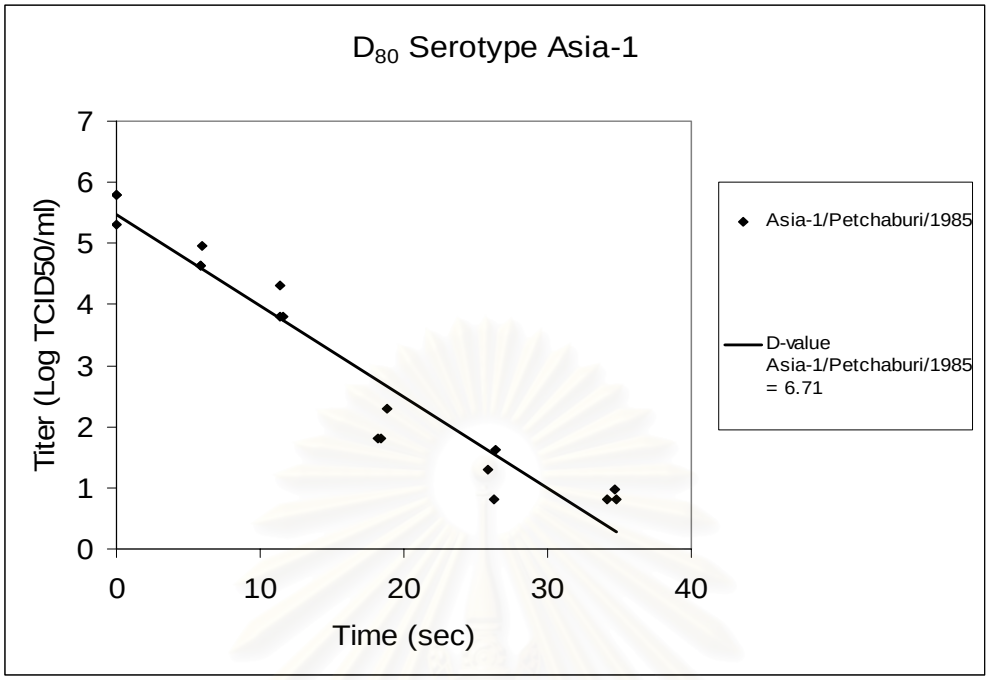
รูปที่ 19 กราฟแสดงการทำลายไวรัสซีโรไทป์ Asia-1 และ D-value ที่ 70°C



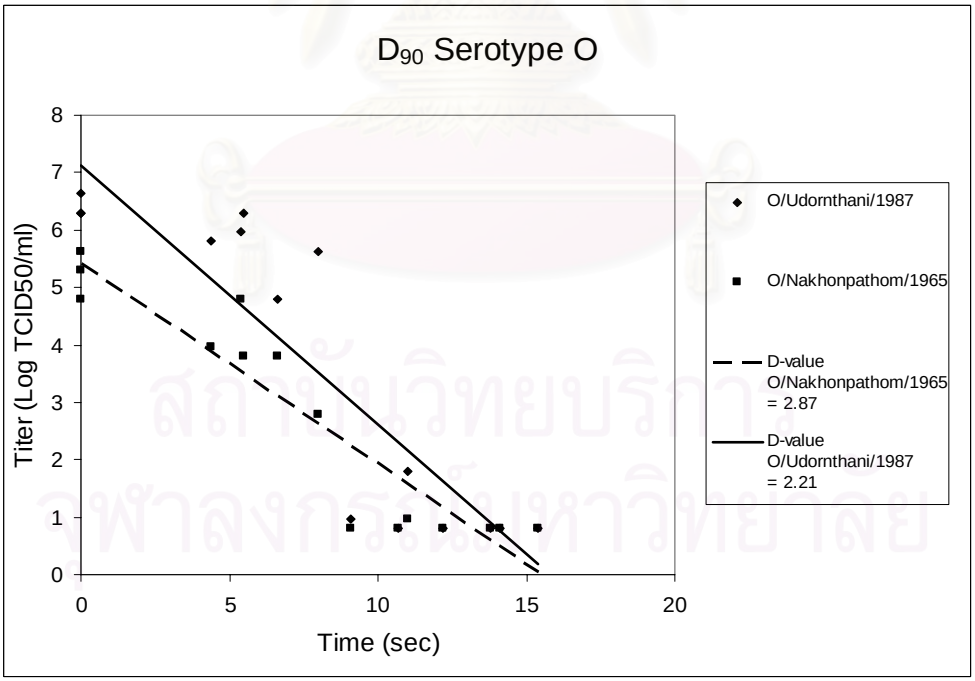
รูปที่ 20 กราฟแสดงการทำลายไวรัสซีโรไทป์ O และ D-value ที่ 80°C



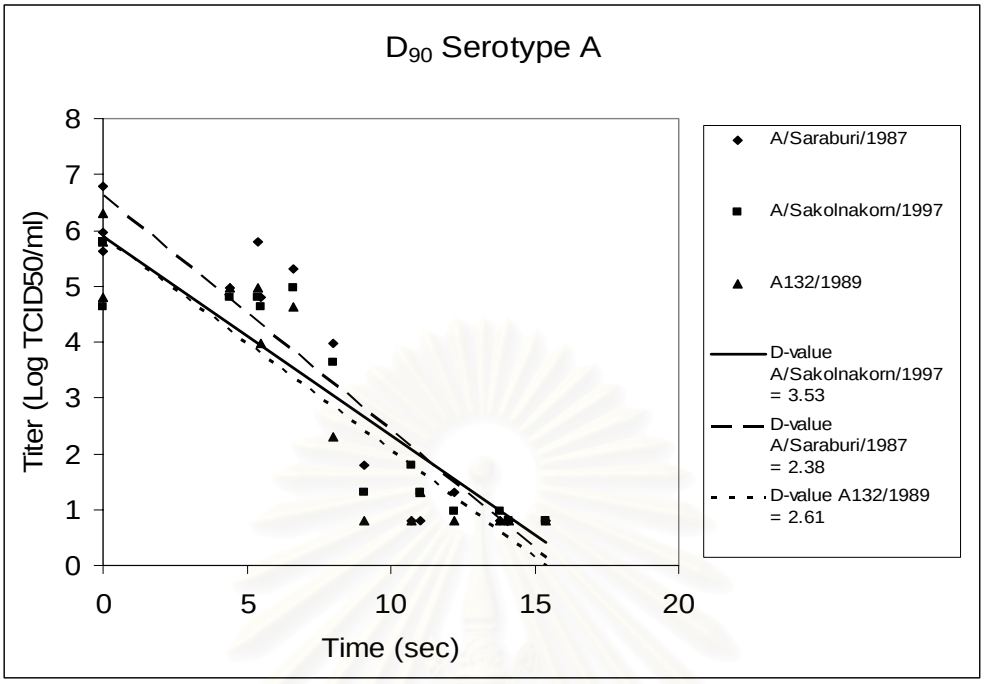
รูปที่ 21 กราฟแสดงการทำลายไวรัสซีโรไทป์ A และ D-value ที่ 80°C



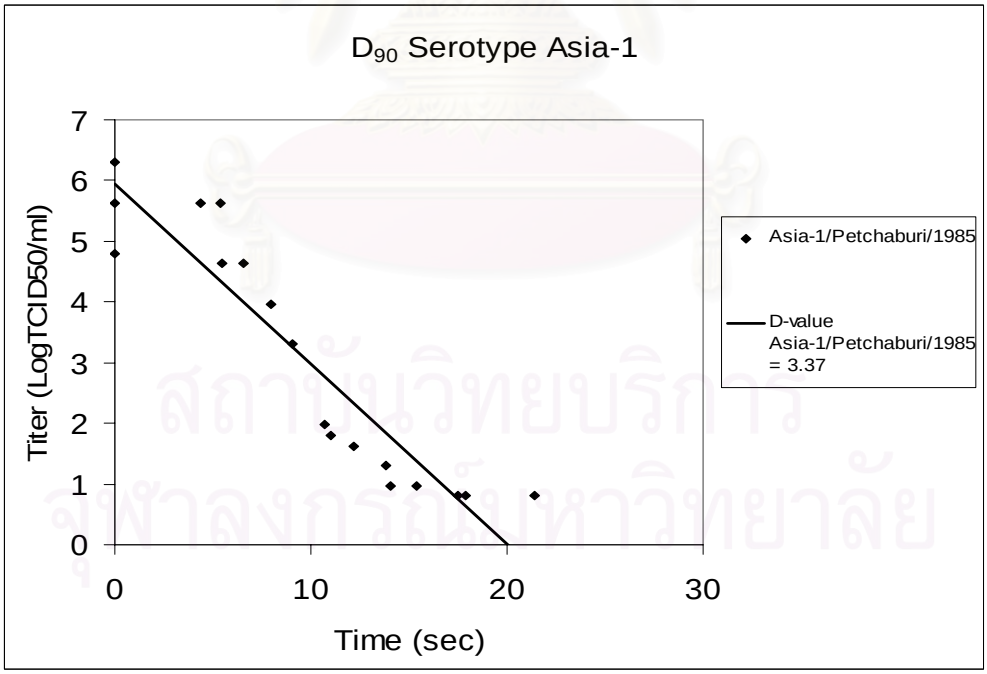
รูปที่ 22 กราฟแสดงการทำลายไวรัสซีโรไทป์ Asia-1 และ D-value ที่ 80°C



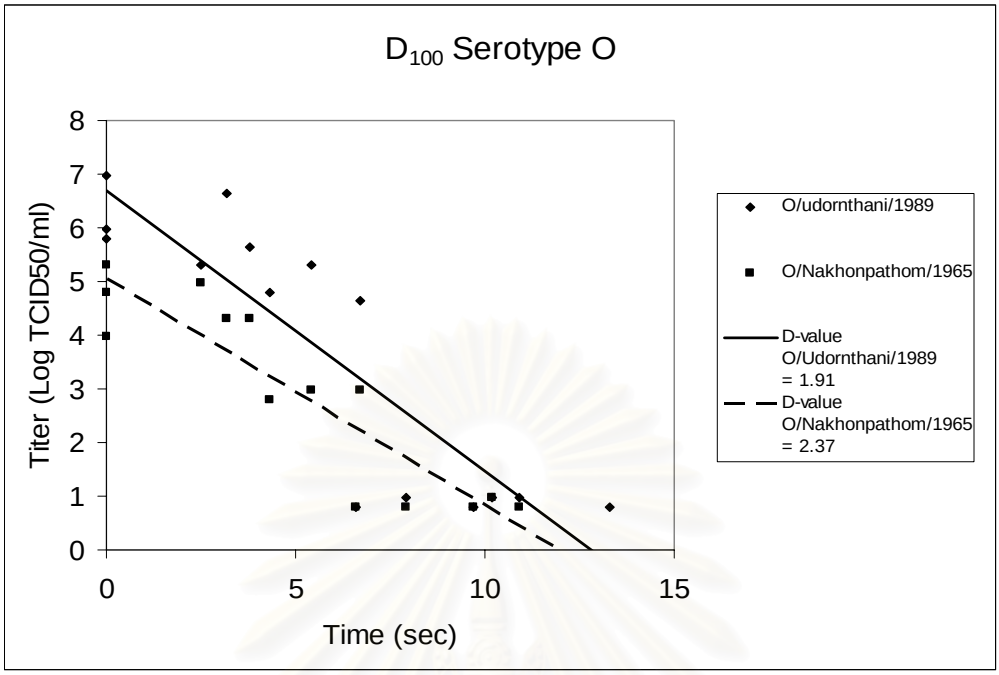
รูปที่ 23 กราฟแสดงการทำลายไวรัสซีโรไทป์ O และ D-value ที่ 90°C



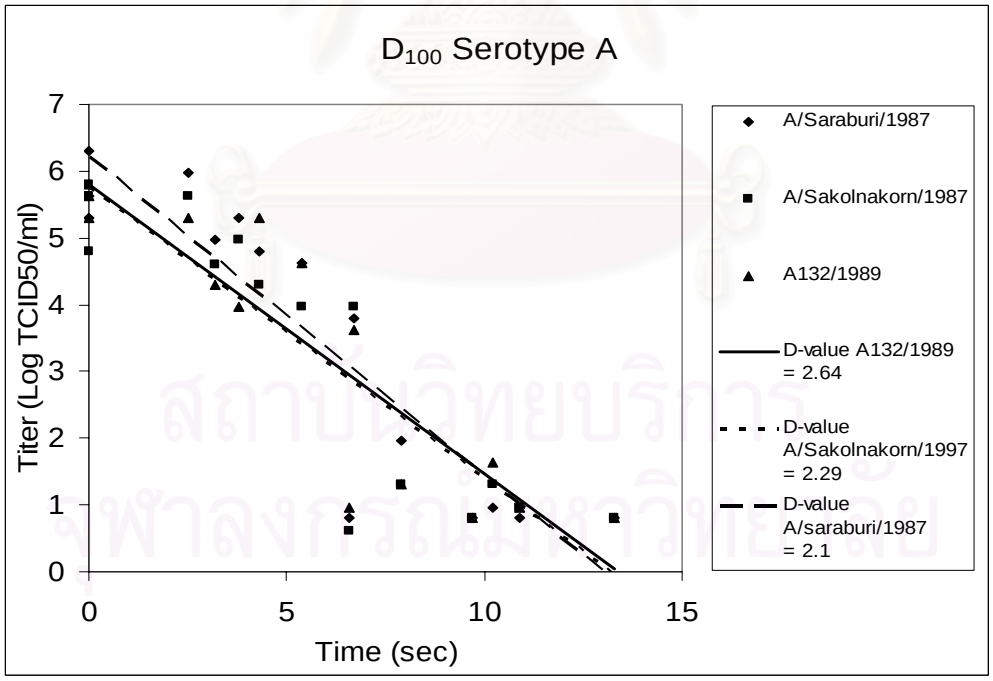
รูปที่ 24 กราฟแสดงการทำลายไวรัสซีโรไทป์ A และ D-value ที่ 90°C



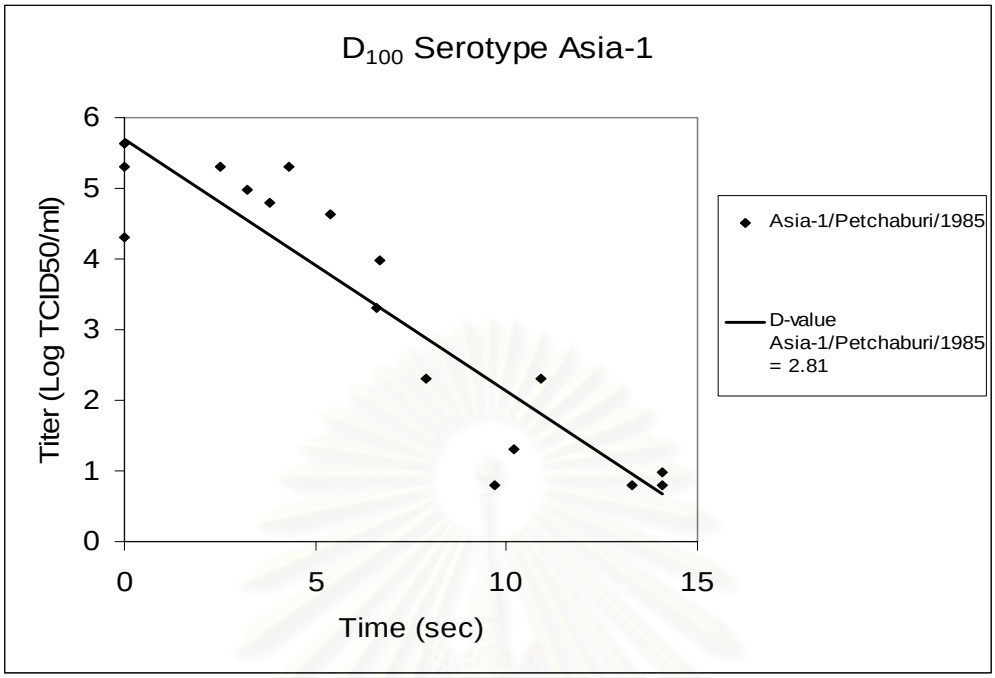
รูปที่ 25 กราฟแสดงการทำลายไวรัสซีโรไทป์ Asia-1 และ D-value ที่ 90°C



รูปที่ 26 กราฟแสดงการทำลายไวรัสซีโรไทป์ O และ D-value ที่ 100°C



รูปที่ 27 กราฟแสดงการทำลายไวรัสซีโรไทป์ A และ D-value ที่ 100°C



รูปที่ 28 กราฟแสดงการทำลายไวรัสซีโรไทป์ Asia-1 และ D-value ที่ 100°C

4.2 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการวิเคราะห์ค่าความชันทางสถิติด้วย Linear Regression ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ของกราฟแสดงการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้ง 6 สเตรน ระหว่างอุณหภูมิในการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้งหมด 6 อุณหภูมิคือ 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส แสดงดังตารางที่ 4 - 9

ตารางที่ 4 การวิเคราะห์ค่าความชัน (β) ของกราฟแสดงการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้ง 6 สเตรนที่อุณหภูมิ 50 °C

Strain	Slope(β)	Std. Error	t	p-value
O/Udornthani/1987	-0.0017	0.000	-9.072	0.000
O/Nakhonpathom/1965	-0.0025	0.000	-10.193	0.000
A/Saraburi/1987	-0.0006	0.000	-2.031	0.059*
A/Sakolnakorn/1997	-0.0004	0.000	-1.446	0.168*
A132/1989	-0.0025	0.000	-9.267	0.000
As-1/Petchaburi/1985	-0.0004	0.000	-1.415	0.176*

หมายเหตุ : Std. Error = ค่า Standard Error, t = ค่า Reliability Coefficient

* ค่า p-value ที่ > 0.05

ตารางที่ 5 การวิเคราะห์ค่าความชัน (β) ของกราฟแสดงการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้ง 6 สเตรนที่อุณหภูมิ 60 °C

Strain	Slope(β)	Std. Error	t	p-value
O/Udornthani/1987	-0.064	0.007	-8.885	0.000
O/Nakhonpathom/1965	-0.056	0.006	-9.753	0.000
A/Saraburi/1987	-0.667	0.008	-8.379	0.000
A/Sakolnakorn/1997	-0.061	0.007	-8.350	0.000
A132/1989	-0.056	0.008	-6.582	0.000
As-1/Petchaburi/1985	-0.044	0.008	-5.699	0.000

หมายเหตุ : Std. Error = ค่า Standard Error, t = ค่า Reliability Coefficient

ตารางที่ 6 การวิเคราะห์ค่าความชัน (β) ของกราฟแสดงการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้ง 6 สเตรนที่อุณหภูมิ 70 °C

Strain	Slope(β)	Std. Error	t	p-value
O/Udornthani/1987	-0.150	0.015	-9.747	0.000
O/Nakhonpathom/1965	-0.109	0.016	-6.605	0.000
A/Saraburi/1987	-0.137	0.018	-7.787	0.000
A/Sakolnakorn/1997	-0.135	0.017	-8.119	0.000
A132/1989	-0.126	0.016	-7.659	0.000
As-1/Petchaburi/1985	-0.129	0.013	-9.646	0.000

หมายเหตุ : Std. Error = ค่า Standard Error, t = ค่า Reliability Coefficient

ตารางที่ 7 การวิเคราะห์ค่าความชัน (β) ของกราฟแสดงการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้ง 6 สเตรนที่อุณหภูมิ 80 °C

Strain	Slope(β)	Std. Error	t	p-value
O/Udornthani/1987	-0.248	0.024	-10.170	0.000
O/Nakhonpathom/1965	-0.265	0.038	-7.049	0.000
A/Saraburi/1987	-0.216	0.022	-10.004	0.000
A/Sakolnakorn/1997	-0.218	0.022	-9.892	0.000
A132/1989	-0.183	0.026	-6.592	0.000
As-1/Petchaburi/1985	-0.149	0.010	-14.639	0.000

หมายเหตุ : Std. Error = ค่า Standard Error, t = ค่า Reliability Coefficient

ตารางที่ 8 การวิเคราะห์ค่าความชัน (β) ของกราฟแสดงการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้ง 6 สเตรนที่อุณหภูมิ 90 °C

Strain	Slope(β)	Std. Error	t	p-value
O/Udornthani/1987	-0.452	0.062	-7.285	0.000
O/Nakhonpathom/1965	-0.349	0.037	-9.457	0.000
A/Saraburi/1987	-0.420	0.047	-8.858	0.000
A/Sakolnakorn/1997	-0.283	0.034	-8.232	0.000
A132/1989	-0.383	0.045	-8.582	0.000
As-1/Petchaburi/1985	-0.297	0.029	-10.297	0.000

หมายเหตุ : Std. Error = ค่า Standard Error, t = ค่า Reliability Coefficient

ตารางที่ 9 การวิเคราะห์ค่าความชัน (β) ของกราฟแสดงการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้ง 6 สเตรนที่อุณหภูมิ 100 °C

Strain	Slope(β)	Std. Error	t	p-value
O/Udornthani/1987	-0.523	0.078	-6.713	0.000
O/Nakhonpathom/1965	-0.422	0.057	-7.343	0.000
A/Saraburi/1987	-0.476	0.061	-7.792	0.000
A/Sakolnakorn/1997	-0.436	0.661	-7.163	0.000
A132/1989	-0.379	0.048	-7.847	0.000
As-1/Petchaburi/1985	-0.356	0.039	-9.102	0.000

หมายเหตุ : Std. Error = ค่า Standard Error, t = ค่า Reliability Coefficient

ผลการเปรียบเทียบช่วงระยะความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 ของ D-value ระหว่างช่วงอุณหภูมิในการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้งหมด 6 อุณหภูมิคือ 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส แสดงดังตารางที่ 10

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 ช่วงระยะความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 ของ D-value ระหว่างอุณหภูมิที่ใช้ในการทำลายไวรัสทั้ง 6 อุณหภูมิ

Temp.(°C)	n	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
50	6	1325.1233	1007.1466	411.1659	268.1878	2382.0589
60	6	17.5667	2.7900	1.1390	14.6388	20.4945
70	6	7.7067	0.8397	0.3428	6.8254	8.5879
80	6	4.8650	1.0757	0.4391	3.7362	5.9938
90	6	2.8283	0.5326	0.2174	2.2694	3.3873
100	6	2.3533	0.3334	0.1361	2.0035	2.7032

หมายเหตุ : n = จำนวนตัวอย่าง, Std. Deviation = ค่า Standard Deviation, Std. Error = ค่า Standard Error

ผลการเปรียบเทียบช่วงระยะความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 ของ D-value)ระหว่างสเตรนของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้งหมด 6 สเตรน (O/Udornthani/1987, O/Nakhonpathom/1965, A/Saraburi/1987, A/Sakolnakorn/1997, A132/1989 และ Asia-1/Petchaburi/1985) แสดงดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ช่วงระยะความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 ของ D-value ระหว่างสเตรนของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้ง 6 สเตรน

Strain	n	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
O/Udornthani/1987	6	103.1150	237.7156	97.0470	-146.3523	352.5823
O/Nakhonpathom/1965	6	72.6733	160.4635	65.5089	-95.7228	241.0694
A/Saraburi/1987	6	265.6400	635.3466	259.3791	-401.1153	932.3953
A/Sakolnakorn/1997	6	422.3683	1017.8401	415.5315	-645.7893	1490.5260
A132/1989	6	72.7517	160.4174	65.4901	-95.5961	241.0995
As-1/Petchaburi/1985	6	423.8950	1017.1056	415.2316	-643.4919	1491.2819

หมายเหตุ : n = จำนวนตัวอย่าง, Std. Deviation = ค่า Standard Deviation, Std. Error = ค่า Standard Error

จากการเปรียบเทียบช่วงระยะความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 ระหว่าง D-value ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้ง 6 สเตรนใน 6 ช่วงอุณหภูมิ ดังแสดงในตารางที่ 10 และ 11 สามารถสรุปและเปรียบเทียบถึงประสิทธิภาพของความร้อนในการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในช่วงอุณหภูมิต่างๆ และเปรียบเทียบถึงความต้าน ทานความร้อนระหว่างสเตรนที่แตกต่างกันของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย ดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 D-value (วินาที) ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้ง 6 สเตรนใน 6 ช่วงอุณหภูมิ

Temp.(°C) / Strain	50	60	70	80	90	100
O/Udornthani/1987	588.24[a]	15.63[b]	6.67[c]	4.03[d]	2.21[e]	1.91[e]
O/Nakhonpathom/1965	400.00[a]	17.86 [b]	9.17[c]	3.77[d]	2.87[e]	2.37[e]
A/Saraburi/1987	1666.67[a]	14.93[b]	7.30[c]	4.63[d]	2.38[e]	2.10[e]
A/Sakolnakorn/1997	2500.00[a]	16.39[b]	7.41[c]	4.59[d]	3.53[e]	2.29[e]
A132/1989	400.00[a]	17.86[b]	7.94[c]	5.46[d]	2.61[e]	2.64[e]
As-1/Petchaburi/1985	2500.00[a]	22.73[b]	7.75[c]	6.71[d]	3.37[e]	2.81[e]

[a,b,c,d,e] อักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของอัตราการทำลายไวรัส (D-value) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

อภิปรายผล สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผล

การวิเคราะห์หาอัตราการทำลายไวรัส (D-value) คำนวณได้จากค่าลบส่วนกลับของความชันของสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟแสดงการทำลายไวรัส โดยระดับความเข้มข้นเริ่มต้นของไวรัสในแต่ละการทดลองไม่จำเป็นต้องเท่ากัน และระดับความเข้มข้นสุดท้ายของไวรัสในแต่ละการทดลองไม่จำเป็นต้องลดลงจนถึงระดับที่เป็น 0 นอกจากนั้นวิธีการที่แตกต่างกันในการวัดระดับความเข้มข้นของไวรัสไม่ว่าจะเป็นการวัดจากการเกิด Cytopathic Effect กับเซลล์เพาะเลี้ยงซึ่งมีหน่วยเป็น $TCID_{50}$/ml หรือการวัดจากการเกิด Plaque Forming Unit บนอาหารเลี้ยงเซลล์ใต้วุ้นซึ่งมีหน่วยเป็น PFU/ml ก็ไม่ได้เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลกระทบถึง D-value เนื่องจาก D-value วิเคราะห์ได้จากค่าการเปลี่ยนแปลงของระดับความเข้มข้นของไวรัสจากจุดเริ่มต้นถึงจุดสุดท้ายเทียบกันกับระยะเวลาที่ใช้ในการทำลายไวรัส จึงไม่ใช่การวิเคราะห์จากค่าระดับความเข้มข้นของไวรัสโดยตรง อย่างไรก็ดีเพื่อเป็นการพิสูจน์ถึงประสิทธิภาพของความร้อนในการทำลายไวรัสอย่างแท้จริง จำเป็น ต้องมีการวิเคราะห์ค่าความชันของกราฟทางสถิติว่าแตกต่างจาก 0 หรือไม่

จากการวิเคราะห์ค่าความชันของกราฟแสดงการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้ง 6 สเตรน (O/Udornthani/1987, O/Nakhonpathom/1965, A/Saraburi/1987, A/Sakolnakorn /1997, A132/1989 และ Asia-1/Petchaburi/1985) ระหว่างอุณหภูมิในการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้งหมด 6 อุณหภูมิ คือ 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส พบว่ากราฟแสดงการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยส่วนใหญ่มีค่าความชันของกราฟแตกต่างจาก 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4 - 9) แสดงว่าการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆนั้นสามารถทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้อย่างแท้จริง ยกเว้นค่าความชันของกราฟแสดงการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสของสเตรน A/Saraburi/1987, A/Sakolnakorn/1997 และ Asia-1/Petchaburi/1985 เท่านั้นที่พบว่าไม่มีความแตกต่างจาก 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้ง 3 สเตรนดังกล่าวที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสจำเป็นต้องใช้ระยะเวลานาน จึงทำให้ค่าความชันของกราฟต่ำมากจนกระทั่งเมื่อทำการทดสอบทางสถิติแล้วพบว่าค่าความชันของกราฟไม่แตกต่างจาก 0

จากการเปรียบเทียบช่วงระยะความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 ของ D-value ระหว่างอุณหภูมิในการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้งหมด 6 อุณหภูมิคือ 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียสพบว่า เกือบทุกอุณหภูมิมีความแตกต่างกันของ D-value อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ยกเว้นเพียงอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส และ 100 องศาเซลเซียสเท่านั้นที่พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของ D-value อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 10) แสดงว่าอุณหภูมิที่แตกต่างกันนั้นมีประสิทธิภาพในการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่แตกต่างกันด้วย โดยอุณหภูมิสูงขึ้นจะมีประสิทธิภาพในการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยสูงขึ้น และจากการสังเกตพบว่า D-value ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทุกสเตรนมีค่าต่ำกว่า D-value ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสในสัดส่วนที่มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงอุณหภูมิอื่น (ตารางที่ 12) แสดงว่าอุณหภูมิที่เริ่มทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้อย่างมีประสิทธิภาพนั้นน่าจะอยู่ในช่วงระหว่างอุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับที่มีการรายงานว่าไวรัสวงศ์ *Picornarviridae* จะไม่สามารถทนต่อความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส (Hollinger and Ticehurst, 1996) สำหรับที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส และ 100 องศาเซลเซียสที่พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของ D-value อย่างมีนัยสำคัญทางสถิตินั้นอาจเนื่องมาจากการที่ความร้อนในช่วงอุณหภูมิสูงมากๆจะทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในระยะเวลาที่รวดเร็วจนกระทั่งไม่สามารถบอกถึงความแตกต่างของระยะเวลาที่ใช้ในการทำลายไวรัสได้

จากการเปรียบเทียบช่วงระยะความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 ของ D-value ระหว่างสเตรนของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้งหมด 6 สเตรน คือ O/Udornthani/1987, O/Nakhonpathom/1965, A/Saraburi/1987, A/Sakolnakorn/1997, A132/1989 และ Asia-1/Petchaburi/1985 พบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างค่า D-value ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้ง 6 สเตรน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 11) แสดงว่า ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทั้ง 6 สเตรนนั้นมีความต้านทานต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียสที่ไม่แตกต่างกัน ดังนั้น ในกรณีที่ต้องการศึกษาต่อถึงช่วงอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรที่ต้องการจะส่งออก จึงสามารถเลือกไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยสเตรนใดก็ได้จาก 6 สเตรนนี้มาใช้เป็นตัวแทนในการศึกษาต่อไป

จากที่ได้กล่าวในบทที่ 2 แล้วว่า สื่อที่ใช้ในการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเป็นปัจจัยสำคัญในการประเมิน D-value ดังนั้น ในการศึกษาการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยความร้อนจึงต้องเปรียบเทียบ D-value ระหว่างการศึกษาที่ใช้สื่อชนิดเดียวกัน ซึ่งสื่อที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือสารละลาย PBS โดยทฤษฎีแล้ว ความร้อนทำให้เกิดการทำลายของ Viral

Capsid และโครงสร้างทุติยภูมิ (Secondary Structure) ของโมเลกุล RNA ของไวรัส ส่งผลให้ขบวนการเข้าสู่เซลล์และการเพิ่มจำนวนของไวรัสสูญเสียไป (Chou and Yang, 2004) โดยในช่วงอุณหภูมิที่สูงกว่าย่อมทำให้เกิดกลไกของการทำลายไวรัสดังกล่าวที่เร็วกว่าด้วย ดังนั้น D-value ของช่วงอุณหภูมิสูงจึงมีค่าน้อยกว่า D-value ของช่วงอุณหภูมิต่ำ จากการเปรียบเทียบระหว่าง D-value ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 12) ซึ่งเป็นช่วงอุณหภูมิที่ใกล้เคียงที่สุด กับ D-value ที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียสที่ได้จากการศึกษาของ Nettleton และคณะ (1982) (ตารางที่ 2) ซึ่งศึกษาการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในทุกซีโรไทป์โดยใช้สารละลาย PBS เป็นสื่อเช่นเดียวกัน พบว่า D-value ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสของซีโรไทป์ A และ Asia-1 ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้มีค่ามากกว่า D-value ที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียสของซีโรไทป์เดียวกันที่ได้จากการศึกษาของ Nettleton ส่วน D-value ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสของซีโรไทป์ O ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้มีค่าน้อยกว่า D-value ที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียสของซีโรไทป์เดียวกัน ที่ได้จากการศึกษาของ Nettleton เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้มาทำการประมาณค่า D-value ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์ O, A และ Asia-1 ที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส โดยคำนวณจากสมการเส้นตรง พบว่า มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.4, 2.1 และ 2.6 นาที ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าค่าที่ได้จากการศึกษาของ Nettleton สาเหตุดังกล่าวอาจเนื่องมาจาก การศึกษานี้ไม่ได้ศึกษาถึงการทำลายไวรัสที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียสโดยตรง แต่เป็นการประมาณค่า D-value จากสมการเส้นตรงระหว่าง D-value ของอุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้ D-value ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสมีค่าที่ต่ำมาก จึงทำให้เมื่อทำการประมาณค่าทางคณิตศาสตร์ของ D-value ที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียสจึงพบว่ามีค่าที่ต่ำไปด้วย ซึ่งในความเป็นจริงแล้วมีความเป็นไปได้ว่าที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียสยังไม่ใช่อุณหภูมิที่มีประสิทธิภาพในการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยจึงทำให้ D-value ยังมีค่าสูงอยู่ แต่หากเป็นช่วงอุณหภูมิที่ค่อนไปทาง 60 องศาเซลเซียสซึ่งเริ่มทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยได้อย่างมีประสิทธิภาพ D-value จะมีค่าลดลงอย่างรวดเร็ว จากประโยชน์ของการศึกษาในครั้งนี้ซึ่งทำการศึกษาครอบคลุมในหลายช่วงอุณหภูมิ จึงทำให้เห็นถึงภาพรวมของประสิทธิภาพของความร้อนในการทำลายเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย และทำให้เห็นถึงศักยภาพที่ชัดเจนในการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในช่วงอุณหภูมิที่สูงขึ้น

Nuanualsuwan and Cliver (2002) รายงานถึงการทำลายไวรัสโรคตับอักเสบเอ (Hepatitis A Virus) และไวรัสโปลิโอ (Poliovirus) โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส และใช้สารละลาย PBS เป็นสื่อเช่นเดียวกัน ไวรัสโรคตับอักเสบเอและไวรัสโปลิโอจัดอยู่ในวงศ์ *Picornarviridae* เช่นเดียวกันกับไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยแต่แตกต่างกันที่สกุล ไวรัสโรคตับ

อักเสบเอจัดอยู่ในสกุล Hepatovirus ไวรัสโปลิโอจัดอยู่ในสกุล Enterovirus ส่วนไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยจัดอยู่ในสกุล Apthovirus จากการศึกษาพบว่า D-value ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสของไวรัสตับอักเสบเอ และไวรัสโปลิโอเท่ากับ 18.6 และ 5.6 วินาที ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบกับ D-value ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นช่วงอุณหภูมิที่ใกล้เคียงที่สุดที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ (ตารางที่ 12) พบว่า D-value ของไวรัสโรคตับอักเสบเอมีค่าสูงกว่า ส่วน D-value ของไวรัสโปลิโอมีค่าต่ำกว่าเล็กน้อยแต่โดยรวมแล้วจัดว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ใกล้เคียงกัน และเมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้มาทำการประมาณค่า D-value ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยทุกสเตรนที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสโดยคำนวณจากสมการเส้นตรง พบว่า มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 7.6 วินาที ซึ่งใกล้เคียงกับ D-value ของไวรัสโปลิโอ จากการสังเกตพบว่าไวรัสโรคตับอักเสบเอมีความต้านทานความร้อนมากกว่าไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยและไวรัสโปลิโอ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Hollinger and Ticehurst (1996) ซึ่งระบุว่าไวรัสโรคตับอักเสบเอมีความต้านทานความร้อนมากกว่าไวรัสชนิดอื่นที่อยู่ในวงศ์เดียวกัน

Turner และคณะ (2002) ได้รายงานถึงการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยซีโรไทป์ O ที่ละลายในน้ำล้างอุจจาระสุกร เปรียบเทียบกับไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่ละลายในสารละลาย Glasgow Eagles Medium จากการทดลองพบว่า ที่อุณหภูมิ 67 องศาเซลเซียสเท่ากัน ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่อยู่ในน้ำล้างอุจจาระสุกรถูกทำลายในเวลา 3 นาที ส่วนไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่อยู่ในสารละลาย Glasgow Eagles Medium ถูกทำลายในเวลา 5 นาที จากรายงานนี้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของสื่อที่เป็นตัวกลางในการนำความร้อนสู่อนุภาคของไวรัส เนื่องจากใน Glasgow Eagles Medium ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์มีองค์ประกอบที่เป็นโปรตีนจำนวนมาก ซึ่งโปรตีนเหล่านี้จะเป็นตัวปกป้องอนุภาคของไวรัสจากความร้อน (Dekker, 1998) จึงทำให้ใช้ระยะเวลาในทำลายไวรัสที่นานกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับในน้ำล้างอุจจาระสุกร ดังนั้น D-value ที่ได้จากการศึกษาการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยโดยใช้สารละลาย PBS เป็นสื่อในครั้งนี้ย่อมมีค่าต่ำกว่า D-value ที่ได้จากการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในเนื้อสุกรโดยตรง เนื่องจากในเนื้อสุกรประกอบไปด้วยโปรตีนจำนวนมาก ซึ่งโปรตีนเหล่านี้จะเป็นตัวปกป้องอนุภาคของไวรัสจากความร้อนได้เป็นอย่างดี ทำให้ระยะเวลาที่ใช้ในการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยเพิ่มสูงขึ้น

จากรายงานที่ผ่านมาเกี่ยวกับการพบไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในเนื้อสุกร (Panina et al., 1989; Mebus et al.,1993; Chou and Yang, 2004) Panina และคณะ (1989) แสดงให้เห็นถึงระดับความเข้มข้นของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่สะสมในเนื้อสุกรที่สูงที่สุด โดยพบว่า

หลังจากชำแหละซากสุกรที่ได้ทำการทดลองให้ติดไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยแล้ว กล้ามเนื้อและไขมันของสุกรมีระดับความเข้มข้นของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยสะสมสูงถึง 5.0 Log_{10} PFU/mg ดังนั้นจึงอาจอนุมานได้ว่า ในสถานการณ์ที่เลวร้ายที่สุดที่จะพบไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยคงอยู่ในเนื้อสุกรนั้น ไม่น่าจะมีระดับความเข้มข้นของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยสูงเกิน 5 Log_{10} จากที่ได้กล่าวแล้วในข้างต้นว่า D-value คือ ระยะเวลาที่ใช้ในการลดระดับความเข้มข้นของไวรัสลง 1 Log_{10} หรือร้อยละ 90 ซึ่งจะมีความจำเพาะกับช่วงอุณหภูมิ และสเตรนของไวรัสที่ทำการศึกษา (Juneja et al., 1997) ดังนั้น การทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยที่มีระดับความเข้มข้นของไวรัสประมาณ 5 Log_{10} นั้น ต้องใช้ระยะเวลานานเป็น 5 เท่าของค่า D-value ที่จำเพาะของอุณหภูมิและสเตรนของไวรัสนั้นๆนั่นเอง จากวิธีการคำนวณดังกล่าว เมื่อทำการประเมิน D-value ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นอุณหภูมิมาตรฐานในการปรุงสุกเนื้อสุกรที่กำหนดโดย OIE และกระทรวงเกษตร ป่าไม้ และ ประมงของประเทศญี่ปุ่น ร่วมกับระดับความเข้มข้นของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยสูงสุดที่พบในเนื้อสุกรคือ 5 Log_{10} พบว่า ระยะเวลาที่ใช้ในการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยอยู่ที่ประมาณ 1 นาทีเท่านั้น ซึ่งเห็นได้ว่าเป็นระยะเวลาที่ต่ำกว่ามาตรฐานดังกล่าวที่กำหนดไว้ถึง 30 นาทีเป็นอย่างมาก แต่อย่างไรก็ดี เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาถึงการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยสเตรนที่มีการระบาดในประเทศไทยด้วยความร้อนในสารละลาย PBS เท่านั้น ข้อมูลที่ได้จึงยังไม่เพียงพอที่จะสรุปถึงระยะเวลาที่ใช้ในการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในเนื้อสุกรอย่างแท้จริง

5.2 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

การประเมิน D-value ที่ได้จากการศึกษาในสารละลาย PBS ครั้งนี้พบว่า D-value มีค่าที่ต่ำมากตั้งแต่การใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสขึ้นไป และเมื่อประเมินถึง D-value ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ร่วมกับระดับความเข้มข้นของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยสูงสุดที่พบในเนื้อสุกร กับอุณหภูมิและระยะเวลามาตรฐานในการปรุงสุกเนื้อสุกรที่กำหนดโดย OIE และกระทรวงเกษตร ป่าไม้ และ ประมง ของประเทศญี่ปุ่น (70 องศาเซลเซียส 30 นาที) (OIE, 2004b; JETRO,1996 อ้างโดย สุวิมล และคณะ, 2540) พบว่า D-value ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสมีค่าต่ำกว่าระยะเวลามาตรฐานในการปรุงสุกเนื้อสุกรอย่างมาก แสดงถึงแนวโน้มว่า D-value ของเนื้อสุกรที่อุณหภูมิเดียวกันนี้ น่าจะมีค่าต่ำกว่าระยะเวลามาตรฐานในการปรุงสุกเนื้อสุกรที่กำหนดโดย OIE และกระทรวงเกษตร ป่าไม้ และ ประมง ของประเทศญี่ปุ่นด้วย ซึ่งจากแนวโน้มดังกล่าวจะช่วยลดอุณหภูมิ และระยะเวลาในการปรุงสุกเนื้อสุกรเพื่อให้มีการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยอย่างสมบูรณ์ได้

ข้อเสนอแนะสำหรับงานต่อไปในอนาคต

การศึกษาการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยความร้อนในครั้งนี้จัดเป็นการศึกษานำร่องเพื่อให้ได้มาซึ่งข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่เป็นพื้นฐานในการเลือกอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยสเตรนที่มีการระบาดในประเทศไทยเท่านั้น ดังนั้น จึงควรมีการศึกษาต่อเนื่องถึงการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยความร้อนในผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรแปรรูปที่ต้องการจะส่งออกไปยังประเทศเป้าหมายอย่างแท้จริง จากที่ได้กล่าวไว้ในข้างต้นแล้วว่า การปรุงสุกเนื้อสุกรตามข้อกำหนดของประเทศญี่ปุ่นนั้นสามารถทำได้หลายวิธี ทั้งการใช้ความร้อนเปียกเช่น การต้ม ตุ๋น หรือนึ่ง และการใช้ความร้อนแห้งเช่น การทอด ย่าง หรืออบ ซึ่งปัจจุบันประเทศไทยสามารถส่งออกเนื้อสุกรที่ใช้ความร้อนเปียกในการปรุงสุกไปยังประเทศญี่ปุ่นเท่านั้น เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้ต้องการนำข้อมูลอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยไปใช้ในการเพิ่มรูปแบบของผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรแปรรูปปรุงสุกที่จะส่งออกไปยังประเทศญี่ปุ่นให้มีความหลากหลายมากขึ้น ดังนั้น ข้อเสนอแนะสำหรับงานต่อไปในอนาคตคือ ควรมุ่งศึกษาผลของการใช้ความร้อนแห้งในการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อยในเนื้อสุกรเพื่อนำมาพัฒนาผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรแปรรูปชนิดใหม่ๆ ทั้งนี้ควรมีการสำรวจถึงความต้องการของตลาดและรสนิยมของผู้บริโภคในประเทศเป้าหมายควบคู่กันไปด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

บุญเพ็ง สันติวัฒนธรรม. 2547. การตลาดสุกร กฎระเบียบระหว่างประเทศ และความร่วมมือในการปราบโรค[สไลด์]. สมาคมผู้ผลิต และแปรรูปสุกรเพื่อการส่งออก. สัมมนาวิชาการ “ยุทธศาสตร์เขตปลอดโรค FMD เพื่อส่งออกสุกรไทยไปตลาดโลก”. โรงแรมสยามซิตี้. กรุงเทพฯ. 27 กรกฎาคม.

ราตรี วงษ์วัชรดำรง.2533. การวัดระดับความเข้มข้นของไวรัส. ปฏิบัติการไวรัสวิทยาทางสัตวแพทย์. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. หน้า 107-123.

สุวิมล กีรติพิบูล รุจ วัลยะเสวี และมณีวรรณ รักวาทิน. 2540. รายงานฉบับสมบูรณ์. การศึกษากฎ ระเบียบ ข้อบังคับเกี่ยวกับการควบคุมกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์จากเนื้อสุกรชนิดบรรจุกระป๋อง ถุงผนึก และแช่แข็ง ของประเทศญี่ปุ่น สิงค์โปร์ สาธารณรัฐเกาหลีใต้ สหรัฐอเมริกา และแคนาดา. สำนักบริการวิชาการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Abila, R.C. 2004. Progress of FMD Control in Southeast Asia [Slides]. Lecture given at IAEA/RCA Regional Training Course on Serological Techniques for FMD Diagnosis and Control. Regional Reference Laboratory for FMD in South East Asia. Nakhonratchasima, Thailand. October 11-22.

Bartley, L.M., Donnelly, C.A. and Anderson, R.M. 2002. Review of foot-and-mouth disease virus survival in animal excretions and on fomites. Vet. Rec. 151: 667-669.

Blackwell, J.H., Rickansrud, D., McKercher, P.D. and McViar, J.W. 1982. Effect of thermal processing on the survival of foot-and-mouth disease virus in ground meat. J. Food. Sci. 47(2): 388-392.

Blackwell, J.H., Nolan, E.J. and Rickansrud, D.A. 1988. Total caloric input of a thermal process as an index of lethality for foot-and-mouth disease virus. J. Food Sci. 53: 185-190.

Chou, C.C. and Yang, S.E. 2004. Inactivation and degradation of *O Taiwan 97* foot-and-mouth disease virus in pork sausage processing. Food Microbiol. 21(6): 737-742.

Cottral, G.E., Cox, B.F. and Baldwin, D.E.1960. The survival of Foot-and-Mouth Disease Virus in cured and uncured meat. Am. J. Vet. Res. 21: 288-297.

Crowther,J.R. 2004. Diagnostic Principles of Foot-and-Mouth Disease [Slides]. Lecture given at IAEA/RCA Regional Training Course on Serological Techniques for FMD Diagnosis and Control. Regional Reference Laboratory for FMD in South East Asia. Nakhonratchasima, Thailand. October 11-22.

Dekker, A. 1998. Inactivation of foot-and-mouth disease virus by heat, formaldehyde, ethylene oxide and γ radiation. Vet. Rec. 143: 168-169.

De Leeuw, P.W., Tiessink, J.W.A. and Van Bekkum, J.G. 1980. Aspects of heat inactivation of foot-and-mouth disease virus in milk from intramammarily infected susceptible cows. J. Hyg., Camb. 84: 159-172.

Forbes, L.S. and Cottral, G.E. 1969. Heat inactivation of Foot-and-Mouth Disease Virus in blood products. Res. Vet. Sci. 10: 98-100.

Garcia-Vidal, W., Balckwell, J.H., Correa, C.A., Huertas, S. and Urrestarazu, V. 1988. Virucidal effectiveness of flexible pouch processing of meat products prepared from foot-and-mouth disease-affected cattle. J. Food Sci. 53: 1650-1652.

Haas, B., Ahl, R., Böhm, R. and Strauch, D. 1995. Inactivation of viruses in liquid manure. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epitz. 14: 435-445.

Hollinger, F.B. and Ticehurst, J.R. 1996. Hepatitis A Virus. In: Fields Virology. 3rd ed. B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley, et al. (ed.) Philadelphia: Lippincott – Raven Publishers. 735-782.

JETRO. 1996. Procedures for importing foods and related products into Japan under the food sanitation law. Tokyo.

Juneja, V.K., Snyder, O.P.Jr. and Marmer, B.S. 1997. Thermal destruction of *Escherichia coli*: determination of D- and Z-values. Int. J. Food Microbiol. 35: 231-237.

Knight, C.A. 1975. Action of Chemical and Physical Agents on Virus. In: Chemistry of Viruses. 2nd ed. New York: Springer. 180-238.

Linchongsubongkoch, W. 2003. Recent characteristic of FMD virus in Thailand. Proceeding of The 11th International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians and OIE Seminar on Biotechnology. Bangkok, Thailand. November 9-13: S9-S15.

Masana, M.O., Fondevila, N.A., Gallinger, M.M., Lasta, J.A., Rodriguez, H.R. and Gonzalez, B. 1995. Effect of low-temperature long-time thermal processing of beef-cuts on the survival of foot-and-mouth disease virus. J. Food Prot. 58(2): 165-169.

Mccoll, K.A., Westbury, H.A., Kitching, R.P. and Lewis, V.M. 1995. The persistence of foot-and-mouth disease virus on wool. Aus. Vet. J. 72(8): 286-292.

Mebus, C.A., House, C., Ruiz Gonzalvo, F., Pineda, J.M., Tapiador, J., Pire, J.J., Bergada, J., Yedloutschnig, R.J., Sahu, S., Becerra, V. and Sanchez-Vizciano, J.M. 1993. Survival of foot-and-mouth disease, African swine fever, and hog cholera viruses in Spanish serrano cured hams and Iberian cured hams, shoulders and loins. Food Microbiol. 10: 133-143.

Mebus, C.A., Arias, M., Pineda, J.M., Tapiador, J., House, C. and Sanchez-Vizciano, J.M. 1997. Survival of several porcine viruses in different Spanish dry-cured meat products. Food Chem. 59(4): 555-559.

Nettleton, P.F., Davies, M.J. and Rweyemamu, M.M. 1982. Guanidine and heat sensitivity of foot-and-mouth disease virus (FMDV) strains. J. Hyg., Camb. 89: 129-138.

Nuanualsuwan, S. and Cliver, D.O. 2002. Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses. J. Virol. Meth. 104: 217-225.

Obara, K., Dyck, J. and Stout, S. 2003. Pork Policies in Japan. Economic Research Service, USDA. [Online]. Available from: http://www.ers.usda.gov [2005, April 21]

OIE. 2004a. OIE Listed Diseases. Terrestrial Animal Health Code, 12th Edition. Office International des Epizooties. Section 2.1.

OIE. 2004b. Foot and Mouth Disease Virus Inactivation Procedures. Terrestrial Animal Health Code, 12th Edition. Office International des Epizooties. Appendix 3.6.2.

Parker, J. 1971. Presence and inactivation of foot-and-mouth disease virus in animal faeces. Vet. Rec. 88: 659-662.

Panina, G.F., Civardi, A., Massirio, I., Scatozza, F., Baldini, P. and Palmia, F. 1989. Survival of foot-and-mouth disease in sausage meat products (Italian salami). Int. J. Food Microbiol. 8: 141-148.

Reed, L.J. and Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. AM. J. Hyg. 27: 493-497.

Saunders, W.B. 1986. Anatomy, Composition and Quality. In: Meat Hygiene. 8th ed. London: British Library Cataloguing in publication Data. 57-60.

Sutmoller, P. 2001. Importation of beef from countries infected with foot and mouth disease: a review of risk mitigation measures. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epitz. 20(3): 715-722.

Taylor, D.J. 1995. Foot and Mouth Disease. In: Pig Diseases. 6th ed. Suffolk: St.Edmunsburry Press. 89-92.

Turner, C., Williams, S.M. and Cumby, T.R. 2000. The inactivation of foot and mouth disease, Aujesky's disease and classical swine fever viruses in pig slurry. J. Appl. Microbiol. 89: 760-767.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารที่ใช้ในงานวิจัย

<u>การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ (Minimum Essential Medium; MEM) ปริมาตร 10 ลิตร</u>

1. ทำการเตรียมสารซึ่งประกอบไปด้วย
   - Eagle's Minimum Essential Medium (Nissui No.1) 94.0 กรัม
   - Tryptose Phosphate Broth (Bacto™) 29.5 กรัม
   - L-Glutamine 2.92 กรัม
   - น้ำกลั่น (Autoclaved) 10.0 ลิตร
2. ปั่นจนกระทั่งละลายเข้ากัน
3. นำไปกรองโดยใช้ไส้กรองขนาด 0.45 ไมครอน
4. นำสารละลายที่ผ่านการกรองแล้วไปตรวจด้วย Fluid Thioglycolate 2 ชุด
5. เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

<u>การเตรียม Fluid Thioglycolate ปริมาตร 0.5 ลิตร</u>

1. ปั่นละลาย Fluid Thioglycolate ปริมาณ 14.9 กรัม ด้วยน้ำกลั่น (Autoclaved) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส ประมาณ 30 นาที จนกระทั่งละลายหมด
2. แจกใส่หลอดแก้วหลอดละ 10 มิลลิลิตร แล้วทำการปิดด้วยจุกยาง
3. นำไปนึ่ง (Autoclaved) รอจนกระทั่งเย็น
4. เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง (Room Temperature)

<u>การเตรียม Fungizone ปริมาตร 0.1 ลิตร</u>

1. ปั่นละลาย Fungizone 50 มิลลิกรัม กับน้ำกลั่น (Autoclaved) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จนกระทั่งละลายหมด
2. กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน
3. แจกใส่หลอดแก้วหลอดละ 1 มิลลิลิตร
4. เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียม Antibiotic ปริมาตร 1 ลิตร

1. เตรียมสารซึ่งประกอบไปด้วย

- Kanamycin	10	กรัม
- Penicillin	1.173	กรัม
- Streptomycin	10	กรัม
- น้ำกลั่น (Autoclaved)	1000	มิลลิลิตร

2. ปั่นจนกระทั่งละลายเข้ากัน
3. กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน
4. แจกใส่หลอดแก้วหลอดละ 3 มิลลิลิตร
5. เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การเตรียม 7% Sodium Bicarbonate Solution ($NaHCO_3$) ปริมาตร 1 ลิตร

1. ปั่นละลาย $NaHCO_3$ 70 กรัม กับน้ำกลั่น (Autoclaved) ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จนกระทั่งละลายหมด
2. กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน
3. แจกใส่หลอดแก้วหลอดละ 4 มิลลิลิตร
4. เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง (Room Temperature)

การเตรียมสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS)

1. เตรียมสารซึ่งประกอบไปด้วย

- NaCl	8	กรัม
- KCl	0.20	กรัม
- Na_2HPO_4	1.15	กรัม
- KH_2PO_4	0.20	กรัม
- น้ำกลั่น (Autoclaved)	1000	มิลลิลิตร

2. ปั่นจนกระทั่งละลายเข้ากัน
3. นำไปนึ่ง (Autoclaved) รอจนกระทั่งเย็น
4. เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง (Room Temperature)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียมสารละลาย Trypsin เข้มข้น (ร้อยละ 1)

1. ทำการชั่ง Trypsin ให้ได้ปริมาณ 1 กรัม
2. เติมสารละลาย PBS (Autoclaved) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
3. ทำการปั่นทิ้งไว้ 1 คืนจนกระทั่งสารละลายเข้ากัน
4. ทำการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน
5. ทำการกรองซ้ำด้วยกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน
6. ทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารละลาย Versene เข้มข้น (ร้อยละ 1)

1. ชั่ง EDTA ให้ได้ปริมาณ 1 กรัม
2. เติมสารละลาย PBS (Autoclaved) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
3. นำไปนึ่ง (Autoclaved) รอจนกระทั่งเย็น
4. เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารละลาย Trypsin-Versene

1. เติมสารละลาย Trypsin เข้มข้น (ร้อยละ 1) ปริมาตร 12.5 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลาย Versene เข้มข้น (ร้อยละ 1) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร
3. เติมสารละลาย PBS (Autoclaved) จนกระทั่งได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
4. เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารละลาย Maintenance Medium (MM)

1. เติมสารละลาย MEM 95 มิลลิลิตร
2. เติม Fetal Bovine Serum 2 มิลลิลิตร
3. เติม Antibiotic 1.25 มิลลิลิตร
4. เติม Fungizone 0.50 มิลลิลิตร
5. เติม Sodium Bicarbonate Solution 1.25 มิลลิลิตร
6. เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียมสารละลาย Growth Medium (GM)

1.	เติมสารละลาย MEM	87.25	มิลลิลิตร
2.	เติม Fetal Bovine Serum	10	มิลลิลิตร
3.	เติม Antibiotic	1.25	มิลลิลิตร
4.	เติม Fungizone	0.50	มิลลิลิตร
5.	เติม Sodium Bicarbonate Solution	1	มิลลิลิตร
6.	เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส		

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์

การเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อเนื่อง (Subculture)

1. อุ่น Media (MEM), Fetal Bovine Serum และ Trypsin-Versene ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
2. เทอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออกจากขวดเพาะเลี้ยงเซลล์
3. ล้างเซลล์ด้วย PBS อย่างน้อย 3 ครั้ง
4. เติม Trypsin-Versene ประมาณ 0.5 มิลลิลิตร เพื่อทำการย่อยเซลล์ออกจากพื้นผิว
5. เคาะ หรือใช้ปิเปตดูดขึ้น-ลง สลับกันหลายๆครั้งเพื่อให้เซลล์แยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยวๆ
6. เตรียม Growth Medium (ตามวิธีในภาคผนวก ก) และทำการผสมเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 2– 5 x 10^5 เซลล์ / มิลลิลิตร
7. ระบุวันที่ และจำนวนของ Passage ของเซลล์ให้เรียบร้อย
8. นำเซลล์ไป Incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

การเก็บเซลล์เพาะเลี้ยง (Preservation of cell culture)

1. อุ่น Media (MEM), Fetal Bovine Serum, Trypsin-Versene และ Dimethylsulfoxide (DMSO) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
2. เทอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออกจากขวดเพาะเลี้ยงเซลล์
3. ล้างเซลล์ด้วย PBS อย่างน้อย 3 ครั้ง
4. เติม Trypsin-Versene ประมาณ 0.5 มิลลิลิตร เพื่อทำการย่อยเซลล์ออกจากพื้นผิว
5. เคาะ หรือใช้ปิเปตดูดขึ้น-ลง สลับกันหลายๆครั้งเพื่อให้เซลล์แยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยวๆ
6. เตรียม Growth Medium โดยเพิ่มความเข้มข้นของ Fetal Bovine Serum เป็นร้อยละ 20 และมี Dimethylsulfoxide (DMSO) ร้อยละ 15
7. ทำการแบ่งเซลล์ลงในหลอด Cryotube หลอดละ 1.5 มิลลิลิตร
8. ทำการระบุวันที่ และจำนวนของ Passage ของเซลล์ให้เรียบร้อย
9. ทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

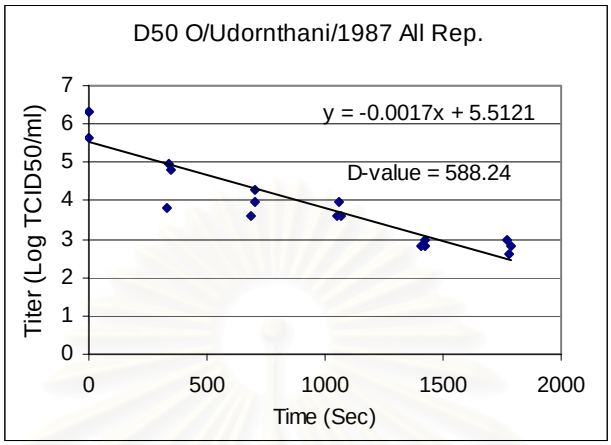
การนำเซลล์มาเพาะเลี้ยงใหม่ (Recovery of preserved cell)

1. นำเซลล์ที่แช่แข็งมาทำการละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
2. ปั่นเซลล์ที่ความเร็ว 2,000 รอบ / นาที เพื่อแยก Dimethylsulfoxide (DMSO) ออกจากเซลล์เพาะเลี้ยง
3. เทส่วนใสซึ่งเป็นส่วนที่มี Dimethylsulfoxide (DMSO) ออก เหลือส่วนตะกอนที่เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงไว้
4. เตรียม Growth Medium โดยเพิ่มความเข้มข้นของ Fetal Bovine Serum เป็น 20% และทำการผสมเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 2– 5 x 10^5 เซลล์ / มิลลิลิตร
5. ระบุวันที่ และจำนวนของ Passage ของเซลล์ให้เรียบร้อย
6. นำเซลล์ไป Incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 1 คืน
7. เปลี่ยน Growth Medium ในวันรุ่งขึ้นโดยลดความเข้มข้นของ Fetal Bovine Serum ให้เหลือร้อยละ 10

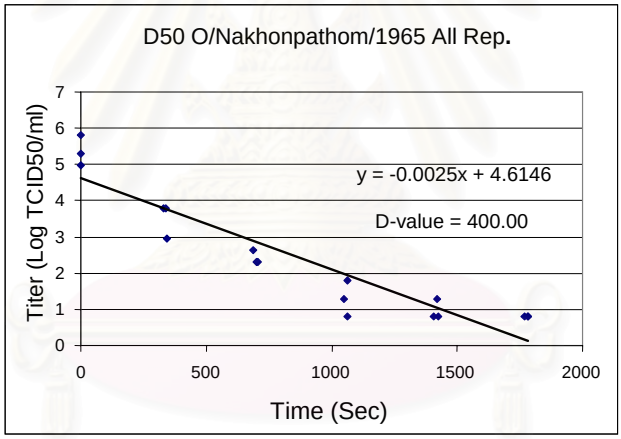
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

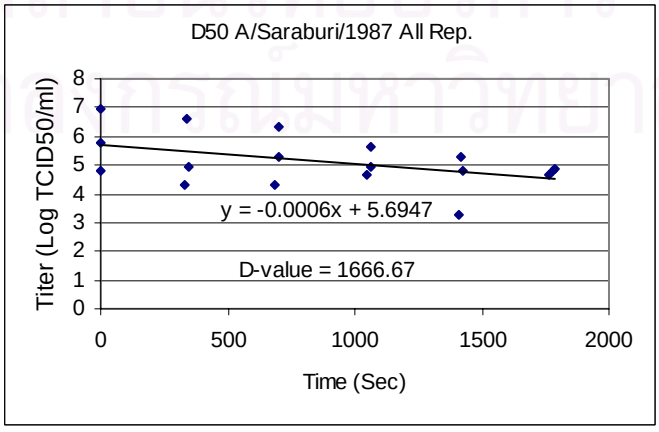
กราฟแสดงการทำลายไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย และ D-value จำเพาะสเตรน



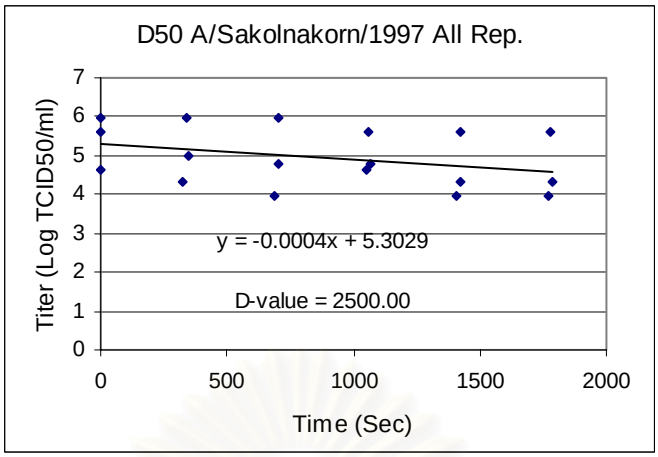
กราฟแสดงการทำลายไวรัสสเตรน O/Udornthani/1987 และ D-value ที่ 50°C



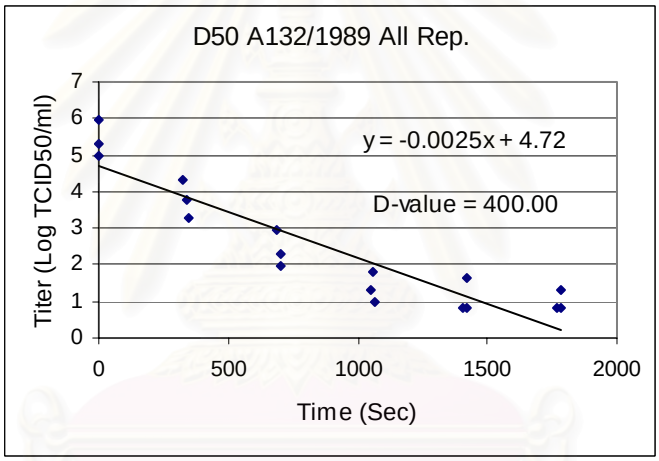
กราฟแสดงการทำลายไวรัสสเตรน O/Nakhonpathom/1965 และ D-value ที่ 50°C



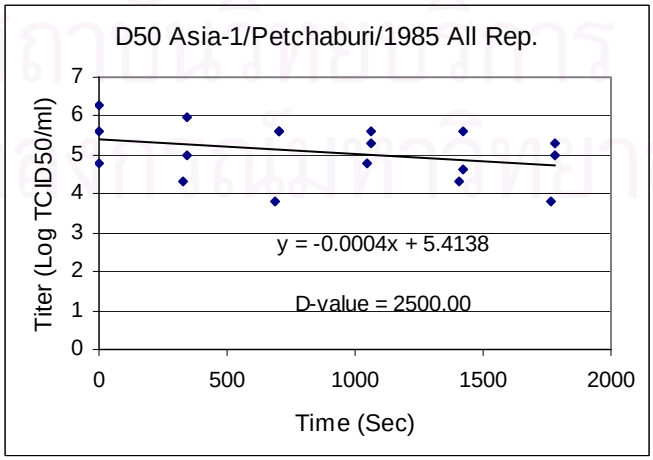
กราฟแสดงการทำลายไวรัสสเตรน A/Saraburi/1987 และ D-value ที่ 50°C



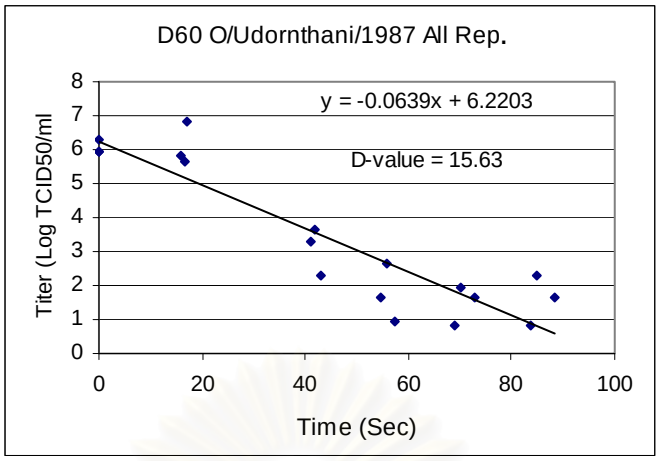
กราฟแสดงการทำลายไวรัสสเตรน A/Sakolnakorn/1997 และ D-value ที่ 50°C



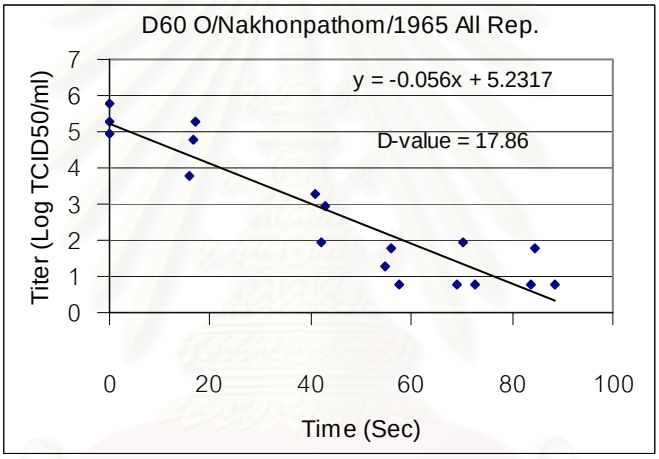
กราฟแสดงการทำลายไวรัสสเตรน A132/1989 และ D-value ที่ 50°C



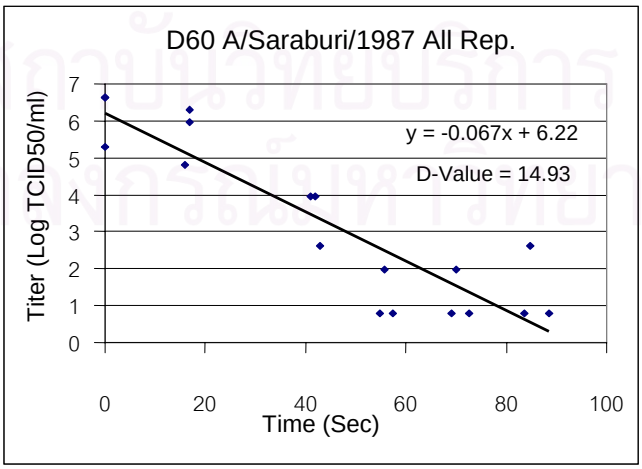
กราฟแสดงการทำลายไวรัสสเตรน Asia-1/Petchaburi/1985 และ D-value ที่ 50°C



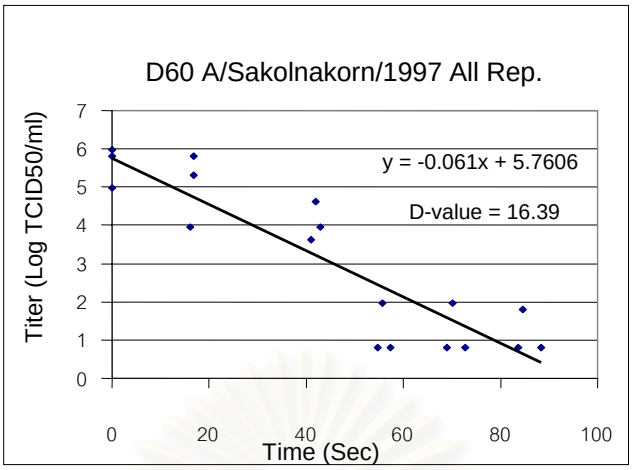
กราฟแสดงการทำลายไวรัสสเตรน O/Udornthani/1987 และ D-value ที่ 60°C



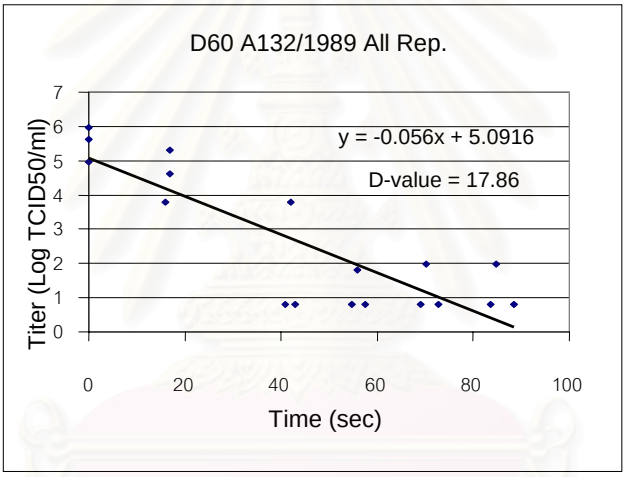
กราฟแสดงการทำลายไวรัสสเตรน O/Nakhonpathom/1965 และ D-value ที่ 60°C



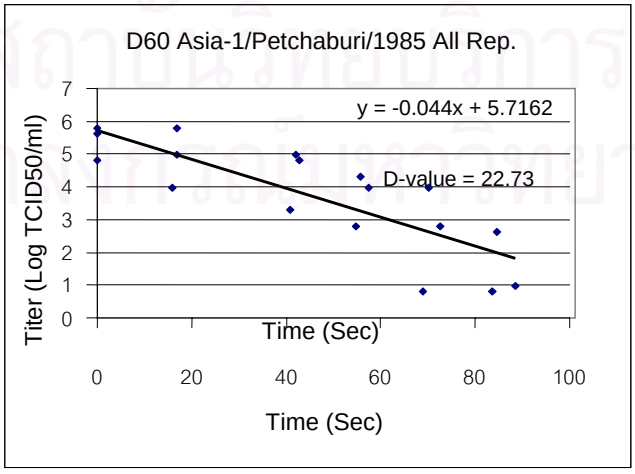
กราฟแสดงการทำลายไวรัสสเตรน A/Saraburi/1987 และ D-value ที่ 60°C



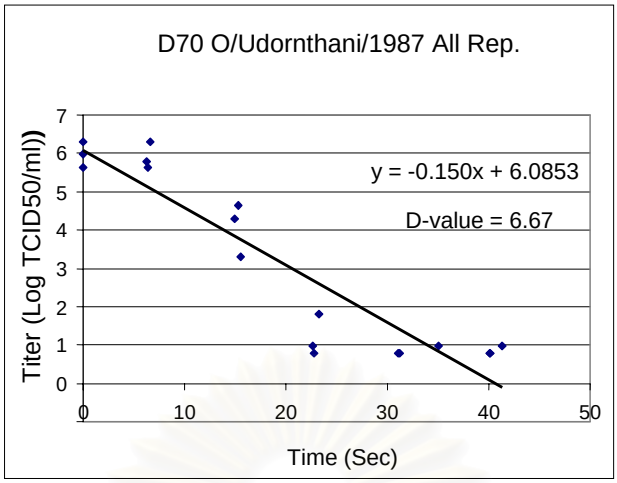
กราฟแสดงการทำลายไวรัสสเตรน A/Sakolnakorn/1997 และ D-value ที่ 60°C



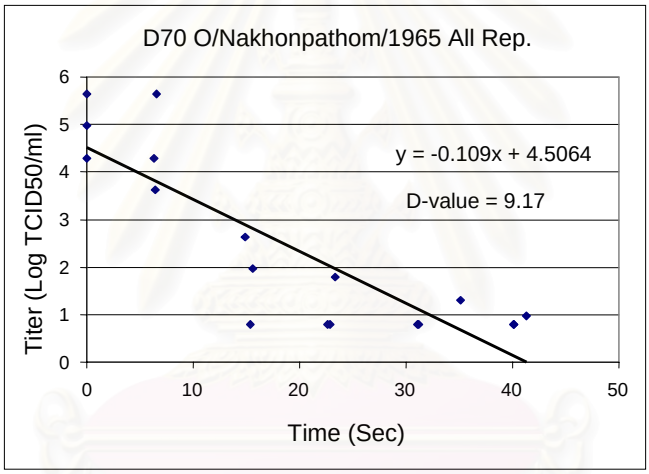
กราฟแสดงการทำลายไวรัสสเตรน A132/1989 และ D-value ที่ 60°C



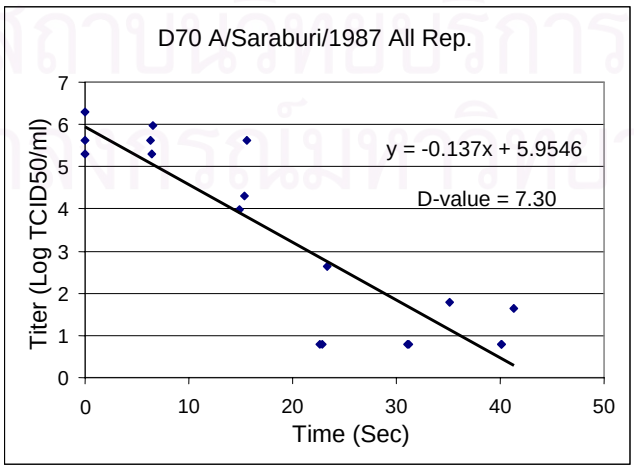
กราฟแสดงการทำลายไวรัสสเตรน Asia-1/Petchaburi/1985 และ D-value ที่ 60°C



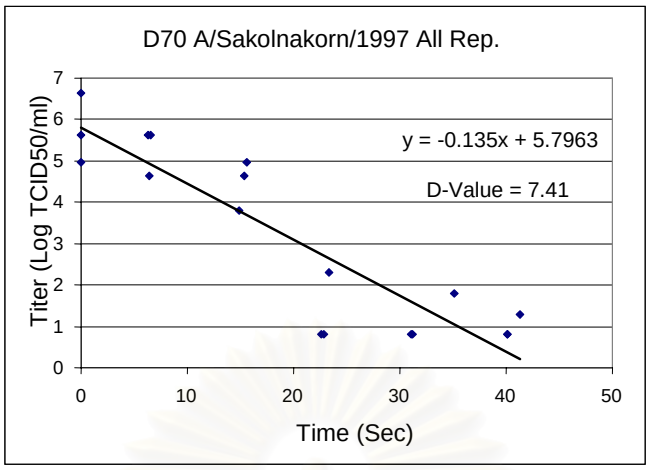
กราฟแสดงการทำลายไวรัสสเตรน O/Udornthani/1987 และ D-value ที่ 70°C



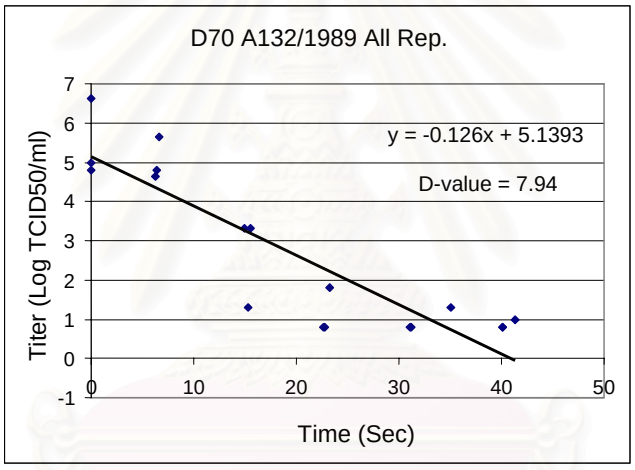
กราฟแสดงการทำลายไวรัสสเตรน O/Nakhonpathom/1965 และ D-value ที่ 70°C



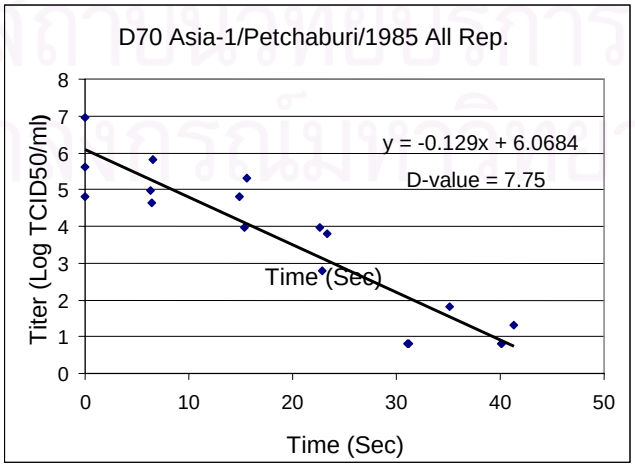
กราฟแสดงการทำลายไวรัสสเตรน A/Saraburi/1987 และ D-value ที่ 70°C



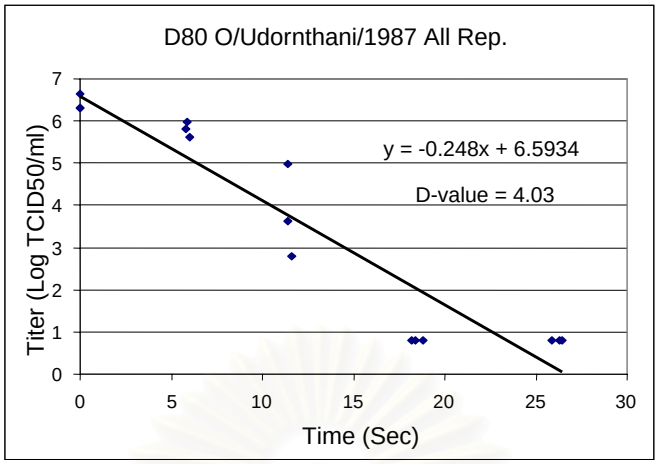
กราฟแสดงการทำลายไวรัสเตรน A/Sakolnakorn/1997 และ D-value ที่ 70°C



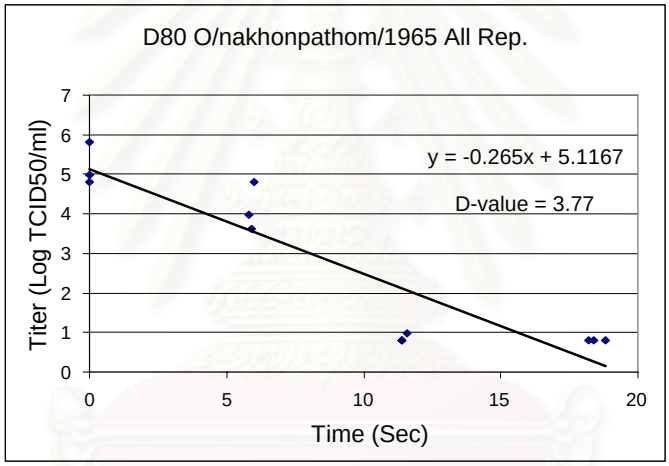
กราฟแสดงการทำลายไวรัสเตรน A132/1989 และ D-value ที่ 70°C



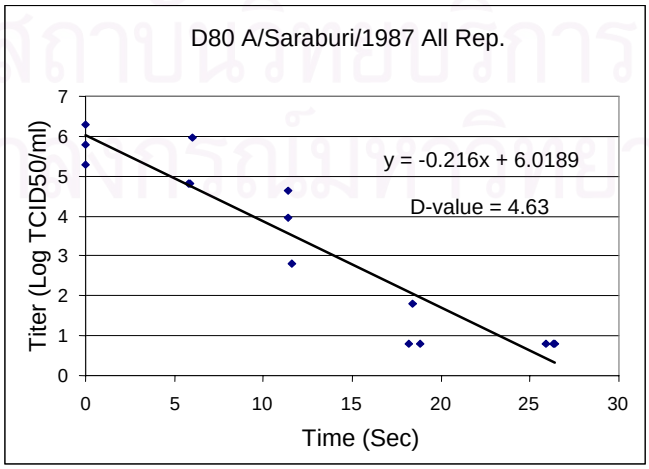
กราฟแสดงการทำลายไวรัสเตรน Asia-1/Petchaburi/1985 และ D-value ที่ 70°C



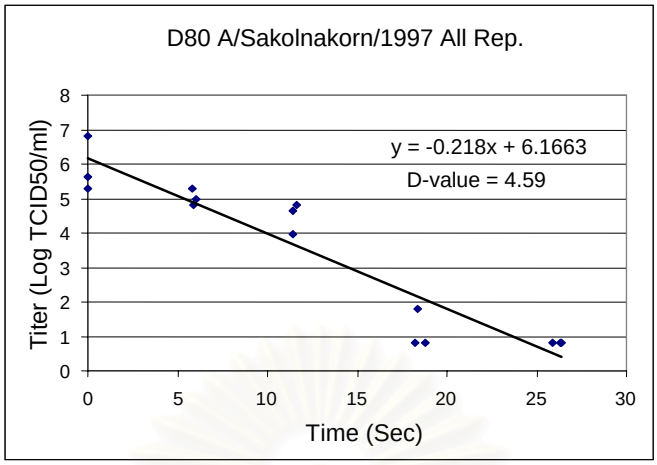
กราฟแสดงการทำลายไวรัสสเตรน O/Udornthani/1987 และ D-value ที่ 80°C



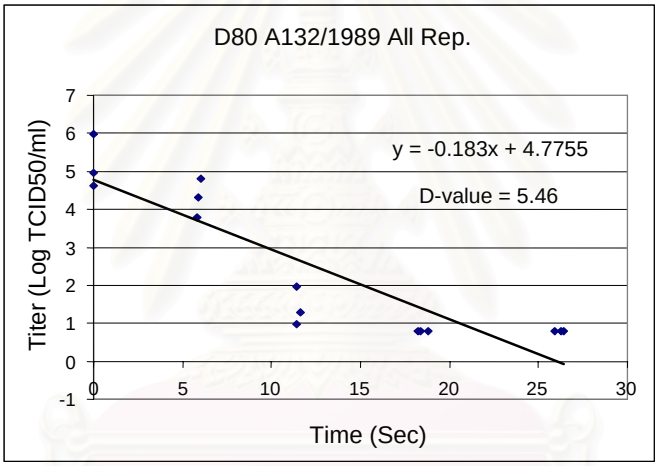
กราฟแสดงการทำลายไวรัสสเตรน O/Nakhonpathom/1965 และ D-value ที่ 80°C



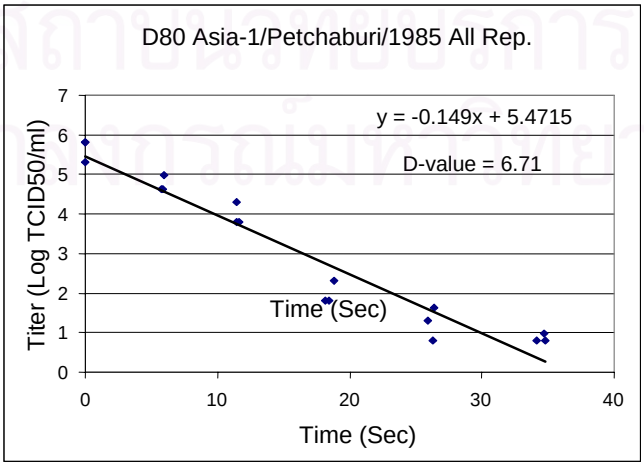
กราฟแสดงการทำลายไวรัสสเตรน A/Saraburi/1987 และ D-value ที่ 80°C



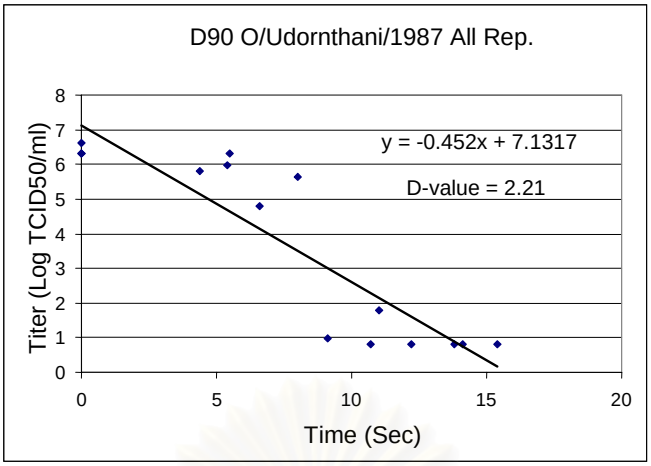
กราฟแสดงการทำลายไวรัสสเตรน A/Sakolnakorn/1997 และ D-value ที่ 80°C



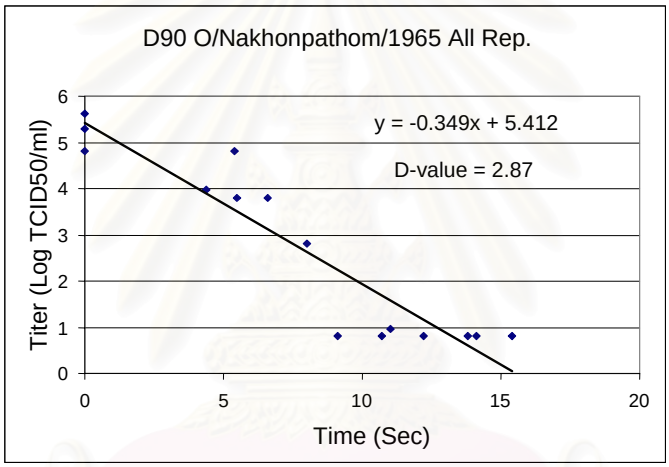
กราฟแสดงการทำลายไวรัสสเตรน A132/1989 และ D-value ที่ 80°C



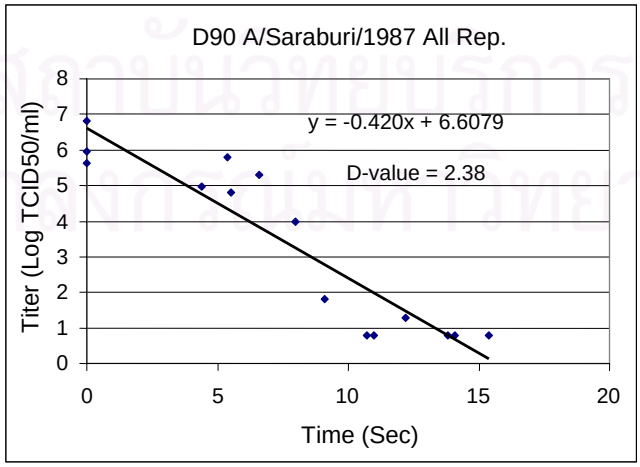
กราฟแสดงการทำลายไวรัสสเตรน Asia-1/Petchaburi/1985 และ D-value ที่ 80°C



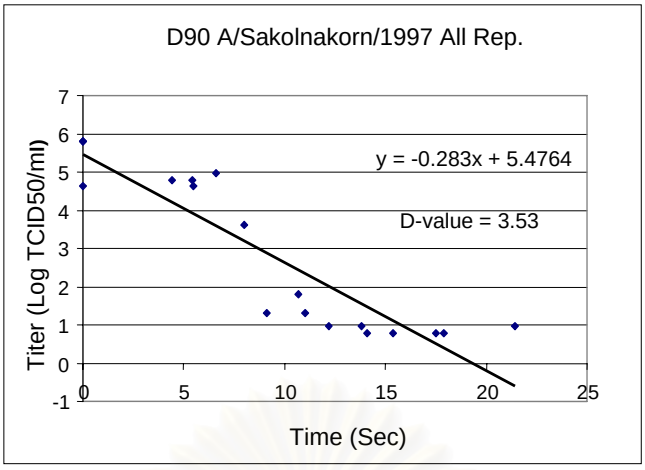
กราฟแสดงการทำลายไวรัสสเตรน O/Udornthani/1987 และ D-value ที่ 90°C



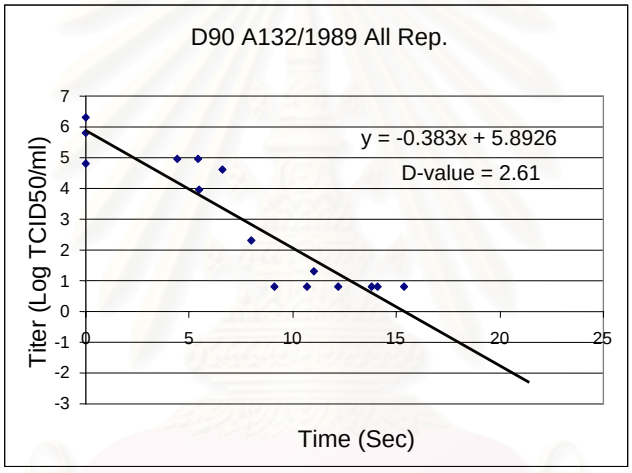
กราฟแสดงการทำลายไวรัสสเตรน O/Nakhonpathom/1965 และ D-value ที่ 90°C



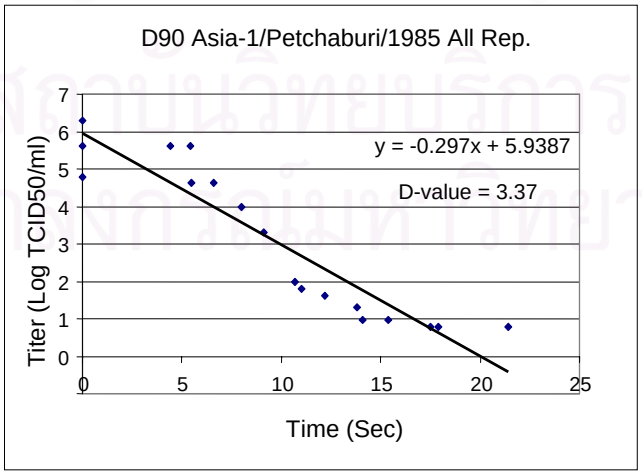
กราฟแสดงการทำลายไวรัสสเตรน A/Saraburi/1987 และ D-value ที่ 90°C



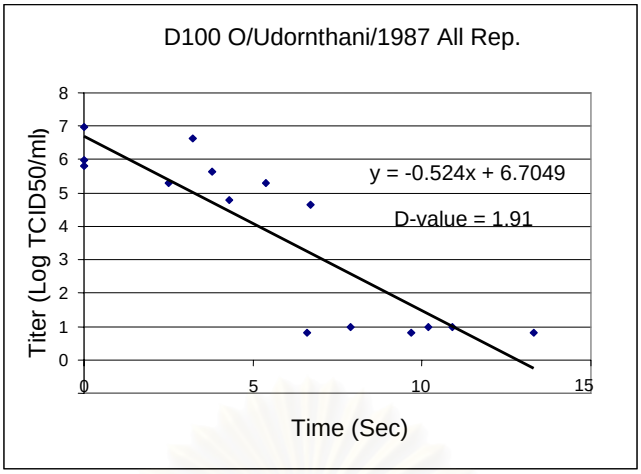
กราฟแสดงการทำลายไวรัสเตรน A/Sakolnakorn/1997 และ D-value ที่ 90°C



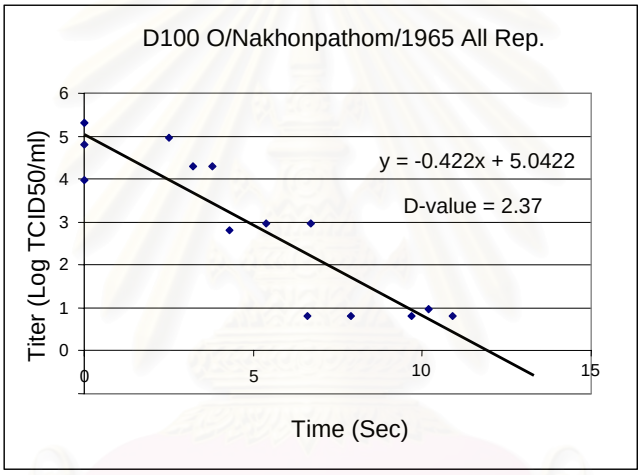
กราฟแสดงการทำลายไวรัสเตรน A132/1989 และ D-value ที่ 90°C



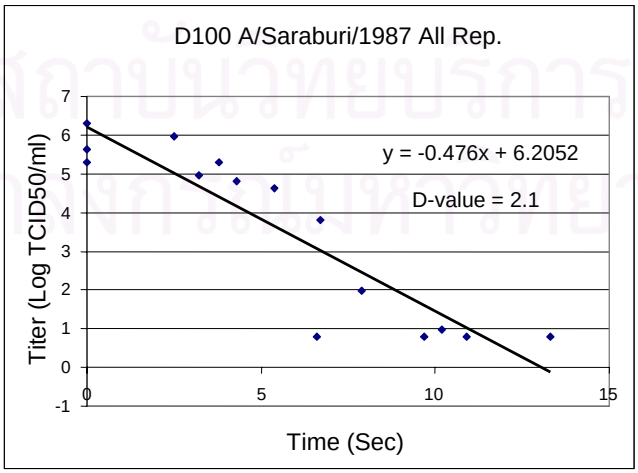
กราฟแสดงการทำลายไวรัสเตรน Asia-1/Petchaburi/1985 และ D-value ที่ 90°C



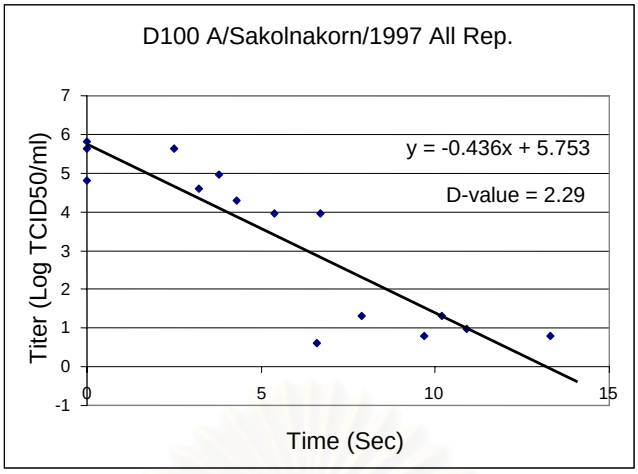
กราฟแสดงการทำลายไวรัสสเตรน O/Udornthani/1987 และ D-value ที่ 100°C



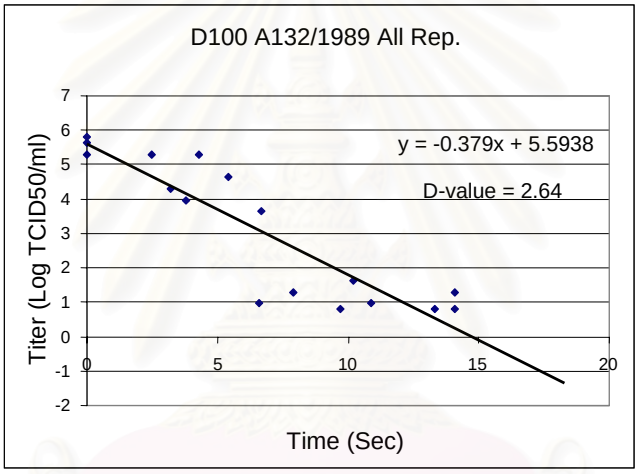
กราฟแสดงการทำลายไวรัสสเตรน O/Nakhonpathom/1965 และ D-value ที่ 100°C



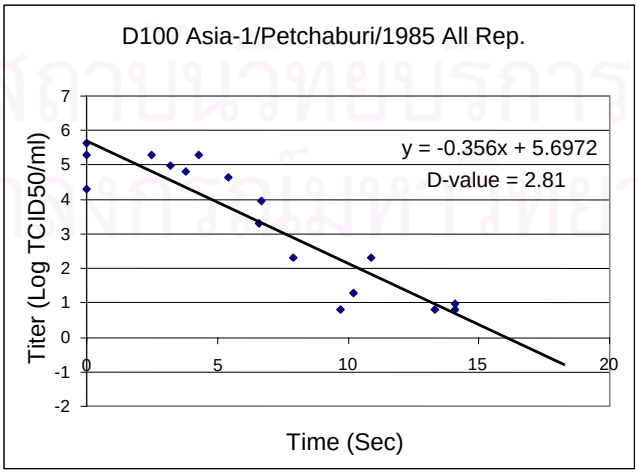
กราฟแสดงการทำลายไวรัสสเตรน A/Saraburi/1987 และ D-value ที่ 100°C



กราฟแสดงการทำลายไวรัสสเตรน A/Sakolnakorn/1997 และ D-value ที่ 100°C



กราฟแสดงการทำลายไวรัสสเตรน A132/1989 และ D-value ที่ 100°C



กราฟแสดงการทำลายไวรัสสเตรน Asia-1/Petchaburi/1985 และ D-value ที่ 100°C

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายสัตวแพทย์สุพัฒนศักดิ์ ศุภารัตน์ เกิดวันที่ 26 ธันวาคม พ.ศ. 2523 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมปลายจากโรงเรียนหอวัง ต่อมาได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาตรีที่คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จนกระทั่งสำเร็จการศึกษาปริญญาตรีสัตวแพทยศาสตร์บัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับ 2) เมื่อปีการศึกษา 2546 และทำการศึกษาต่อในระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสัตวแพทยสาธารณสุข ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2547

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย