

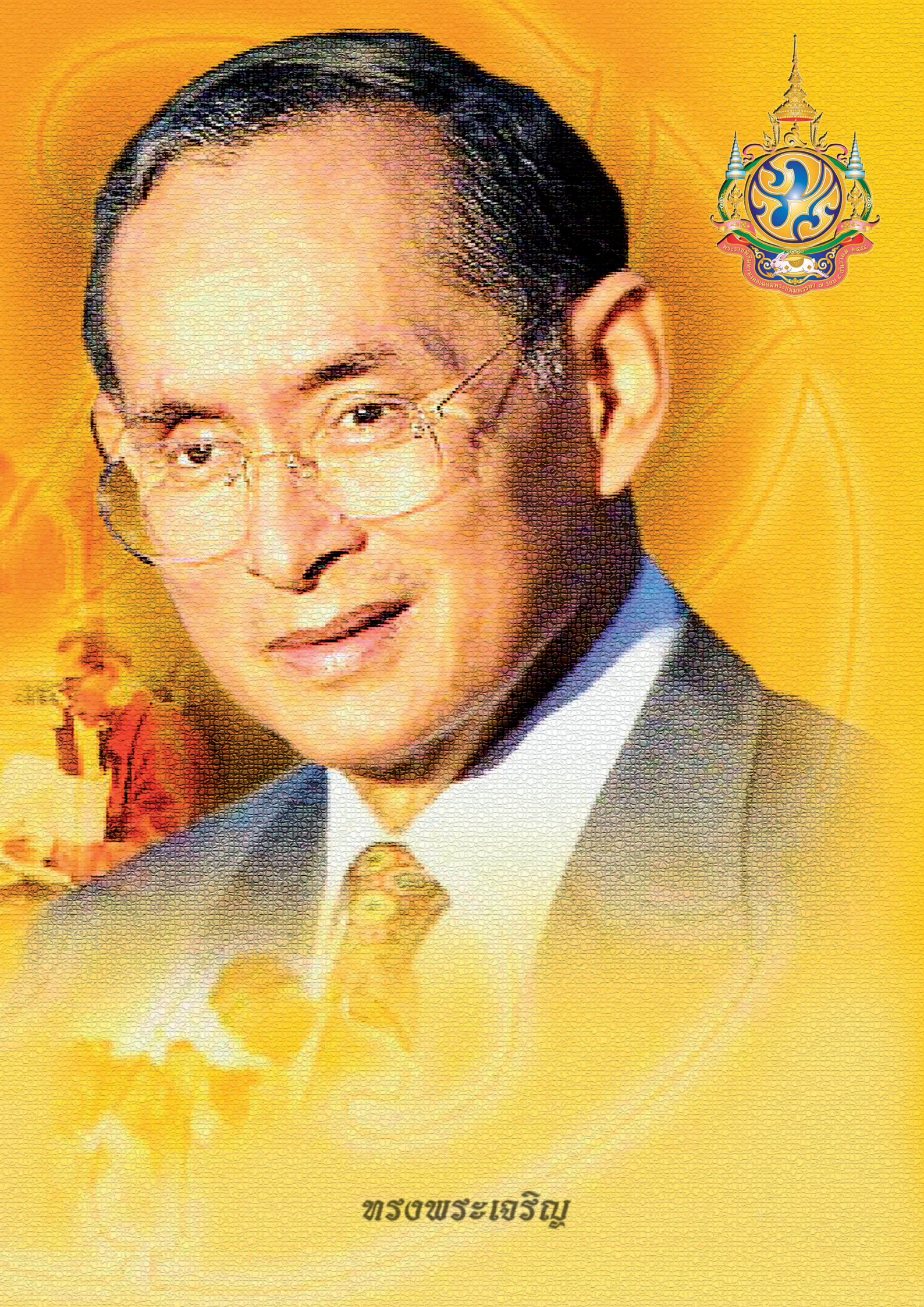


วารสาร เทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่

• เทคนิคการแพทย์ • กายภาพบำบัด • กิจกรรมบำบัด • รังสีเทคนิค

ปีที่ 48 ฉบับที่ 1 มกราคม 2558 ISSN : 0125-5347

BULLETIN OF CHIANG MAI ASSOCIATED MEDICAL SCIENCES



ທຣຽງພຣະເຈົ້າ

Content

- 10 โรคยูเวียอักเสบที่สัมพันธ์กับ Human leukocyte antigen ในประชากรไทย: ทบทวนโดยย่อ
Human leukocyte antigen-associated uveitis in Thai population: Brief review
น้ำผึ้ง อนุกุล นิภาพรณ ลีตระกูล พญ.เกษรา พัฒนพิฑูรย์
Nampeung Anukul Nipapan Leetrakool Kessara Pathanapitoon M.D.
- 18 วัณโรคดื้อยาชนิดรุนแรง (Extensively-drug resistant tuberculosis): สายพันธุ์ใหม่และความท้าทายในอนาคต
Extensively-drug resistant tuberculosis: A new strain and future challenge
รติกร แกมเงิน ชัญญานุช ภู์ทิม บดินทร์ บุตรอินทร์
Ratikorn Gamngoen Chanyanuch Putim Bordin Burt-Indr
- 29 อุบัติการณ์ของภาวะพร่องเอนไซม์ glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) โดยวิธี methemoglobin reduction test ในผู้บริจาคโลหิต จังหวัดเชียงใหม่
Prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency (G-6-PD) using methemoglobin reduction test in blood donors of Chiang Mai Province
พูนทรัพย์ ผลาขจรศักดิ์ เผ่าพันธุ์ ศรีวังพล
Poonsub Palacajornsuk Phaophan Sriwangpon
- 34 การประเมินประสิทธิภาพของเครื่องวิเคราะห์ทางเคมีคลินิกอัตโนมัติ BA400 ของบริษัท Biosystems
Analytical performance evaluation of the Biosystems BA400 Clinical Chemistry Analyzer
ขนิษฐา ทานีฮิล ปภัสสร ธนุสา สุวัฒน์ ศิลิตคุณธรรม
Khanittha Taneyhill Papatsorn Thanosa Suwatsin Kittikunnathum
สุรักษ์ อดมสม นันทน์ภัส อ้นอ้าย ณัฐฐิตา สีมา
Suruk Udomsom Nannapas Inay Natthita Seema
- 49 การระบาดของ Type B Botulism ที่จังหวัดชัยภูมิ ประเทศไทยในปี 2014
An outbreak of type B botulism in Chaiyaphum Province, Thailand 2014
ปิยะดา หวังรุ่งทรัพย์ ชุตินา จิตตประสาทศีล กรณ์ย์ สุทธิวรารคม
Piyada Wangroongsarb Chutima Jittaprasartsin Karun Suthivarakom
ธนิตชัย คำแถลง นัฐพงษ์ ชื่นบาน สมชาย แสงกิจพร
Thanitchai Kamthalang Nattapong Cheunban Somchai Sangkitporn
- 59 อิทธิพลของอายุต่อค่าความคลาดเคลื่อนคงที่ของการรับรู้ตำแหน่งข้อต่อร่างกายส่วนล่าง
The influence of age on the constant error of joint position sense of the lower extremities
อรุณีย์ พรหมศรี
Aruneey Promsri
- 67 การเปรียบเทียบระยะทางที่เดินได้ภายใน 6 นาที ระหว่างผู้ป่วยโรคปอดอุดกั้นเรื้อรังที่มีและไม่มีภาวะโลหิตจาง
A comparison of six-minute walk distance between COPD patients with and without anemia
สรายุทธ มงคล จตุพร วงศ์สาธิตกุล
Sarayoot Mongkol Jatuporn Wongsathikul





BULLETIN OF CHIANG MAI ASSOCIATED MEDICAL SCIENCES

Focus and scope

The Bulletin of Chiang Mai Associated Medical Sciences (Bull Chiang Mai Assoc Med Sci) is the official peer-reviewed journal of the Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University. Manuscripts (original articles, general articles, short technical reports, notes, and letter to editor) in areas of Medical Technology, Physical Therapy, Occupational Therapy, Radiologic Technology, and related fields are welcome. Bull Chiang Mai Assoc Med Sci is published 3 times a year in January, May and September.

The goal of Bull Chiang Mai Assoc Med Sci is to provide a platform for scientists and academicians to promote, share, and discuss various new issues and developments in different areas of Medical Technology, Physical Therapy, Occupational Therapy, and Radiologic Technology.

The final decision on publication of a manuscript rests with the Editorial Board and ultimately with the Editor. All papers, regardless of type, represent the opinion of the authors and not necessarily that of the Editor, the Association of the Publisher.

Objectives

The Bulletin of Chiang Mai Associated Medical Sciences aims to publish integrating research papers in areas of Medical Technology, Physical Therapy, Occupational Therapy, Radiologic Technology, and related under peer-reviewed process by at least two internal or external reviewers.

Types of manuscript

Manuscripts may be submitted in the form of original articles, general articles, short technical reports, notes, or letters to editor where, as an approximate guide to length:

- Review articles would not normally exceed 20 journal pages of printed text, inclusive of tables, figures, and references.
- Original articles would not normally exceed 15 journal pages, similarly all-inclusive.
- Short communications including technical reports, notes, and letter to editor would not normally exceed 5 journal pages.

Peer review process

All manuscripts must be peer-reviewed by at least 2 internal or external reviewers in the areas of Medical Technology, Physical Therapy, Occupational Therapy, Radiologic Technology, and related.

Publication frequency

The Bulletin of Chiang Mai Associated Medical Sciences publishes 3 times a year

Volume 1: January-April

Volume 2: May-August

Volume 3: September-December

Editor

Associate Professor Dr. Preeyanat Vongchan

Associate Editor

Associate Professor Dr. Tanusak Tatu

Editorial Board

Associate Professor Dr. Preeyanat Vongchan

Associate Professor Dr. Tanusak Tatu

Professor Dr. Chatchai Tayapiwatana

Associate Prof. Dr. Suchart Kothan

Assistant Prof. Dr. Supaporn Chinchai

Dr. Araya Yanakai

Professor Dr. Suthat Fucharoen, M.D.

Professor Dr. Kesara Na Bangchang

Associate Prof. Dr. Supan Fucharoen

Associate Prof. Dr. Ganjana Lertmemongkolchai

Chiang Mai University

Chiang Mai University

Chiang Mai University

Chiang Mai University

Chiang Mai University

Chiang Mai University

Mahidol University

Thammasart University

Khon Kaen University

Khon Kaen University

Professor Dr. Navapun Charuruks, M.D.
Tusane Sakuldamrongpanich
Somchai Jeadsermanant
Associate Prof. Dr. Roongtiwa Vachalathiti
Assistant Prof. Dr. Wattana Jalayondeja
Assistant Prof. Dr. Raweevan Leksakulchai
Dr. Supalak Khemthong
Associate Prof. Therdchai Jivacate, M.D.

Assistant Prof. Dr. Prawit Janwantanakul
Assistant Prof. Dr. Rotsalai Kanlayanaphotporn
Assistant Prof. Dr. Kanda Chaipinyo
Assistant Prof. Dr. Rumpa Boonsinsukh
Associate Prof. Dr. Vinit Ungpinitpong
Assistant Prof. Dr. Yodchai Boonprakob
Associate Prof. Dr. Somchai Rattanathongkom
Assistant Prof. Dr. Pornratchanee Weerapong
Pornsawan Posawang

Assistant Prof. Nantaya Udompanich
Professor Eimorn Mairiang, M.D.
Professor Eimorn Mairiang, M.D.
Associate Prof. Dr. Rujaporn Chanachai
Associate Prof. Dr. Jiraporn Tocharoenchai

Business manager

Mrs. Jariya Garthong

Treasurer

Mrs. Angsumalee Srithiruen

Registra Staff

Mr. Thanakorn Karnluksanee
Mr. Manut Manokhum

Webpage Administrative Staff

Mr. Nopporn Phuangsombat
Mr. Anurak Bunpun
Mr. Tapapol Comnoi

Editorial Office

**Faculty of Associated Medical Sciences,
Chiang Mai University**
110 Inthawaroros Road, Suthep, Muang,
Chiang Mai, 50200
Phone 053 945072 Facsimile 053 946042

Bumrungrad International Hospital
Thai Red Cross
Charoenkrungpracharak Hospital
Mahidol University
Mahidol University
Mahidol University
Mahidol University
Prostheses Foundation of H.R.H The Princess
Mother
Chulalongkorn University
Chulalongkorn University
Srinakharinwirot University
Srinakharinwirot University
Khon Kaen University
Khon Kaen University
Khon Kaen University
Huachiew Chalermprakiat University
Sirindhorn National Medical Rehabilitation
Center
Khon Kaen University
Khon Kaen University
Mahidol University
Faculty of Medicine Siriraj Hospital
Mahidol University

Journal website

Homepage [http://: www.ams.cmu.ac.th/journal](http://www.ams.cmu.ac.th/journal)

Journal ISSN:

0125-5347

Journal Impact Factor

Thai Journal Citation Index Center (TCI) 2013 is 0.048

Disclaimer

Personal views expressed by the contributors in their articles are not necessarily those of the Bulletin Chiang Mai Associate Medical Sciences, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University.



วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่

ความมุ่งมั่นและขอบเขตของวารสาร

วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่เป็นวารสารวิชาการดำเนินงานโดยคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เผยแพร่บทความที่เกี่ยวข้องกับเทคนิคการแพทย์ กายภาพบำบัด กิจกรรมบำบัด รังสีเทคนิคและสาขาวิชาอื่นที่เกี่ยวข้อง เพื่อเป็นเวทีนำเสนอและแบ่งปันองค์ความรู้ทางวิชาการสำหรับนักวิจัย นักวิชาการ และนักวิชาชีพ ประกอบด้วย บทความทั่วไป บทความปริทัศน์ นิพนธ์ต้นฉบับ และ จดหมายถึงบรรณาธิการ บทความทุกบทจะได้รับการพิจารณาจากผู้ทรงคุณวุฒิที่เชี่ยวชาญในสาขาวิชานั้นจากภายในหรือภายนอก อย่างน้อย 2 คน วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ตีพิมพ์เผยแพร่ ปีละ 3 ฉบับ ใน เดือนมกราคม พฤษภาคม และกันยายน

วัตถุประสงค์

วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่เป็นวารสารที่จัดทำขึ้นโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเผยแพร่ผลงานวิจัย ความรู้และความก้าวหน้าทางวิชาการที่มีคุณภาพในด้านเทคนิคการแพทย์ กายภาพบำบัด กิจกรรมบำบัด รังสีเทคนิคและสาขาวิชาที่เกี่ยวข้อง ด้วยระบบการตรวจประเมินคุณภาพบทความทางวิชาการจากผู้ทรงคุณวุฒิภายในหรือภายนอกที่มีความเชี่ยวชาญในสาขาวิชานั้น

ชนิดของบทความ

บทความทางวิชาการที่เกี่ยวข้องในสาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ กายภาพบำบัด กิจกรรมบำบัด รังสีเทคนิค และสาขาวิชาที่เกี่ยวข้องในลักษณะต่างๆ ได้แก่ นิพนธ์ต้นฉบับ บทความทั่วไป รายงานเทคนิคและบันทึกสั้น รวมถึงจดหมายถึงบรรณาธิการ โดยจำกัดความยาวดังนี้

- บทความทั่วไป ความยาวไม่เกิน 20 หน้าพิมพ์ รวมเนื้อความ ตาราง รูปประกอบและเอกสารอ้างอิง
- นิพนธ์ต้นฉบับ ความยาวไม่เกิน 15 หน้าพิมพ์ รวมเนื้อความ ตาราง รูปประกอบและเอกสารอ้างอิง
- รายงานเทคนิค บันทึกสั้นและจดหมายถึงบรรณาธิการ ความยาวไม่เกิน 5 หน้าพิมพ์

การพิจารณาบทความ

บทความที่ขอรับการพิจารณากับวารสารเทคนิคการแพทย์ ต้องได้รับการประเมินและพิจารณาเนื้อหาทางวิชาการจากผู้ทรงคุณวุฒิอย่างน้อย 2 คนที่เห็นพ้อง โดยเป็นผู้ทรงคุณวุฒิภายในหรือภายนอกที่เชี่ยวชาญในสาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ กายภาพบำบัด กิจกรรมบำบัด รังสีเทคนิค และสาขาวิชาที่เกี่ยวข้อง

กำหนดการตีพิมพ์

วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ มีกำหนดการตีพิมพ์ 4 เดือนต่อ 1 ฉบับ ทั้งหมด 3 ฉบับต่อปี ดังนี้

ฉบับที่ 1 มกราคม-เมษายน

ฉบับที่ 2 พฤษภาคม-สิงหาคม

ฉบับที่ 3 กันยายน-ธันวาคม

บรรณาธิการ

รองศาสตราจารย์ ดร. ปรียานาถ วงศ์จันทร์

รองบรรณาธิการ

รองศาสตราจารย์ ดร. ธนศักดิ์ ตาตุ

กองบรรณาธิการ

รศ.ดร.ปรียานาถ วงศ์จันทร์	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
รศ.ดร.ธนศักดิ์ ตาตุ	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ศ.ดร.ชัชชัย ตะยาภินัน	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
รศ.ดร.สุชาติ โกกัณฐ์	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ผศ.ดร.สุภาพร ชินชัย	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
อ.ดร.อารยา ญาณกาย	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ศ.ดร.นพ.สุทัศน์ ฟูเจริญ	มหาวิทยาลัยมหิดล
ศ.ดร.เกศรา ณ บางช้าง	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

รศ.ดร.สุพรรณ พูเจริญ
รศ.ดร.กาญจนา เลิศมิ่งมงคลชัย
ศ.พญ.นพวรรณ จารุรักษ์
คุณทัศนีย์ สกุลดำรงคัพานิช
คุณสมชัย เจ็ดเสริมอนันต์
รศ.ดร.รุ่งทิวา วัฒนละอิตติ
ผศ.ดร.วรรณะ ชลาชนนเดชะ
ผศ.ดร.ระวีวรรณ เล็กสกุลไชย
อ.ดร.ศุภลักษณ์ เข้มทอง
รศ.นพ.เทอดชัย ชิวเกตุ
รศ.ดร.ประวีตร เจนวรรณกุล
ผศ.ดร.รสลัย กัลยาณพจน์พร
ผศ.ดร.กานดา ชัยภิญโญ
ผศ.ดร.รัมภา บุญสินสุข
รศ.ดร.วินิจ อึ้งพินิจพงษ์
ผศ.ดร.ยอดชาย บุญประกอบ
รศ.ดร.สมชาย รัตนทองคำ
ผศ.ดร.พรชัย วีระพงษ์
คุณพรสวรรค์ โพธิ์สว่าง
ผศ.นันทยา อุดมพานิชย์
ศ.พญ.เอมอร ไม้เรียง
รศ.พญ.จิราภรณ์ เหล่าธรรมทัศน์
รศ.ดร.รุจพร ชนะชัย
รศ.ดร.จิราภรณ์ โตเจริญชัย

มหาวิทยาลัยขอนแก่น
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รพ.บำรุงราษฎร์
สภาอากาศไทย
รพ.เจริญกรุงประชารักษ์
มหาวิทยาลัยมหิดล
มหาวิทยาลัยมหิดล
มหาวิทยาลัยมหิดล
มหาวิทยาลัยมหิดล
มูลนิธิรักษาเทียมในสมเด็จพระศรีนครินทร์บรมราชชนนี
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
ศูนย์ฟื้นฟูสมรรถภาพแห่งชาติ
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
มหาวิทยาลัยมหิดล
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
มหาวิทยาลัยมหิดล

ผู้จัดทำ

นางจริยา กาทอง

Journal Impact Factor

อ้างอิงศูนย์ดัชนีการอ้างอิงวารสารไทย (ประจำปี 2556) 0.048

ฝ่ายบัญชีและการเงิน

นางอัมมมาลี ศรีทริเรือน

ฝ่ายศิลปกรรม

รูปพล คำน้อย

ฝ่ายทะเบียน

นายธนกร การลักษณะณี
นายมะนัด มะโนคำ

เว็บไซต์ของวารสาร

Homepage [http:// www.ams.cmu.ac.th/journal](http://www.ams.cmu.ac.th/journal)

สารสนเทศ

นายณพพร พวงสมบัติ
นายอนุรักษ์ บุญปัน
นายรูปพล คำน้อย

รหัสวารสาร

0125-5347

ดำเนินการจัดทำโดย

คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
เลขที่ 110 ถนนอินทวโรธ ตำบลสุเทพ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่
50200
โทรศัพท์ 053 945072 โทรสาร 053 946042

การรับผิดชอบบทความ

ข้อมูล วรรณกรรม และข้อความใดๆ ที่ปรากฏในวารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ เป็นของผู้เขียน หรือเจ้าของต้นฉบับเดิมโดยเฉพาะ
วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ไม่จำเป็นต้องเห็นพ้องด้วย

unusannakar

สวัสดีปีใหม่ 2558 แต่ผู้อ่านทุกท่าน กองบรรณาธิการวารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ขอร่วมอวยพรให้ท่านประสบแต่ความสุขสวัสดิ์ มีสุขภาพที่แข็งแรง และจิตใจที่เข้มแข็งเพื่อสามารถมุ่งมั่นในหน้าที่การงาน ฝ่าฟันอุปสรรคต่างๆ ไปด้วยดี ขอให้ประสบความสำเร็จในสิ่งอันที่ปรารถนา เป็นกำลังสำคัญและมีส่วนร่วมในการพัฒนาชาติไทยของเราตลอดปีใหม่นี้และตลอดไป

ปี 2558 เป็นปีมงคลเฉลิมพระชนมพรรษา 60 พรรษาของสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ ขอเชิญทุกท่านร่วมถวายพระพร และมีส่วนในกิจกรรมต่างๆ ที่ทางราชการและเอกชนจะได้จัดขึ้นเพื่อถวายพระเกียรติ นอกจากนี้ยังเป็นวาระเฉลิมฉลองครบ 50 ปี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ มีกิจกรรมต่างๆ มากมายที่จัดโดยคณะและหน่วยงาน สามารถเข้าดูได้ทางเว็บไซต์หน่วยงานต่างๆ ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ดังที่เคยเรียนให้ทราบเป็นระยะๆ มาโดยตลอดว่าวารสารเทคนิคการแพทย์จะงดการผลิตฉบับเล่ม ตั้งแต่ฉบับมกราคม 2558 นี้เป็นต้นไป ทุกท่านสามารถเข้าถึงฉบับบทความและดาวน์โหลดได้โดยไม่เสียค่าใช้จ่ายใดๆ ที่เว็บไซต์ของวารสาร www.ams.cmu.ac.th/journal ทั้งนี้เพื่อเป็นการพัฒนาระบบวารสารออนไลน์และเตรียมความพร้อมเข้าสู่สากล นอกจากนี้ยังเป็นการช่วยประหยัดพลังงานและทรัพยากรในการผลิตวัสดุตามนโยบายของชาติ จึงขอเรียนเชิญและประชาสัมพันธ์มายังทุกท่านนะคะ

ฉบับนี้มีบทความต่างๆ ที่น่าสนใจหลายเรื่อง ทั้งบทความทั่วไปและนิพนธ์ต้นฉบับ ด้านวิทยาศาสตร์การบริการ โลหิต เคมีคลินิก และจุลชีววิทยาคลินิก

เรียนเชิญทุกท่านส่งบทความเพื่อตีพิมพ์ในวารสารโดยการส่งบทความทางออนไลน์ผ่านทาง www.ams.cmu.ac.th/journal ที่หน้าเว็บมีคำอธิบายขั้นตอนและวิธีการนำเสนออย่างชัดเจน สามารถเข้าไปศึกษาได้ด้วยตนเอง พบกันใหม่ฉบับหน้านะคะ

รองศาสตราจารย์ ดร. ปรียานาถ วงศ์จันทร์
บรรณาธิการวารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่

โรคยูเวียอักเสบที่สัมพันธ์กับ Human leukocyte antigen ในประชากรไทย: ทบทวนโดยย่อ

Human leukocyte antigen-associated uveitis in Thai population: Brief review

■ น้าผึ้ง อนุกุล^{1*} นิภาพรณ ลีตระกูล² พญ.เกษรา พัฒนพิฑูรย์³
Nampeung Anukul^{1*} Nipapan Leetrakool² Kessara Pathanapitoon M.D.³

¹แขนงวิชาวิทยาศาสตร์การบริการโลหิต ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

¹Division of Transfusion Sciences, Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University

²ห้องปฏิบัติการ HLA งานธนาคารเลือด โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

²HLA Laboratory, Blood Bank Section, Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital, Faculty of Medicine, Chiang Mai University

³ภาควิชาจักษุวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

³Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University

*Corresponding author (Email: nampeung.a@cmu.ac.th)

Received December 2014

Accepted as revised January 2015

Abstract

Human Leukocyte Antigen (HLA) has been associated with several immune-mediated diseases, malignancies and infectious diseases. Due to the HLA complexity and polymorphisms, several types of HLA have been used as the molecular markers in diagnosis. Among different ethnic groups, HLA is genetically diverse resulting in the differences of disease susceptibility. The study of HLA in Thai population will help an understanding of diseases pathogenesis and the genetic linkage leading to the development of genetic markers that are specific to Thai population. Vogt-Koyanagi-Harada (VKH) syndrome, HLA-B27-associated acute anterior uveitis (AAU) and Behçet's disease (BD) were found to be the major causes of non-infectious and autoimmune-related uveitis in Thai patients. Several etiologic studies in Western, European and other Asian populations reported the strong association between HLA-DR4 and VKH, HLA-B27 and AAU as well as HLA-B51 and BD. However, few in HLA-B27 and none in HLA-B51 and HLA-DR4 related uveitis study have been reported in Thailand. This briefly review discusses the association of HLA and non-infectious uveitis among populations and future research aspects for Thai populations. *Bull Chiang Mai Assoc Med Sci* 2015; 48(1): 10-17. Doi: 10.14456/jams.2015.6

Keywords: Human leukocyte antigen, HLA, uveitis, disease association

บทคัดย่อ

Human leukocyte antigen (HLA) เป็นแอนติเจนในคนที่พบว่ามีความสัมพันธ์กับโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน โรคเมเร็ง และโรคติดเชื้อหลายโรค เนื่องจากระบบ HLA เป็นระบบที่มีความซับซ้อนและมีความหลากหลายมาก HLA หลายชนิดจึงมีประโยชน์ในการใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการวินิจฉัยโรค ในประชากรที่มีเชื้อชาติแตกต่างกัน HLA มีความหลากหลายมากในระดับพันธุกรรม จึงเป็นผลให้ความไวต่อการเกิดโรคในแต่ละบุคคลแตกต่างกันไป ด้วยการศึกษานิตของ HLA ในประชากรไทยจะช่วยให้เกิดความเข้าใจในพยาธิกำเนิดของโรคและความเชื่อมโยงทางพันธุกรรม เพื่อค้นหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่จำเพาะกับประชากรไทยต่อไปในอนาคต สำหรับโรคยูเวียอักเสบที่มีสาเหตุจากการไม่ติดเชื้อและโรคภูมิคุ้มกันตนเองในผู้ป่วยชาวไทยมีสาเหตุหลักมาจากโรค Vogt-Koyanagi-Harada (VKH) syndrome, HLA-B27-associated acute anterior uveitis (AAU) และ Behçet's disease (BD) จากการศึกษาเพื่อหาสาเหตุของโรคในประชากรของประเทศแถบตะวันตก ยุโรป และเอเชียอื่นๆ พบว่า HLA-DR4, HLA-B27 และ HLA-B51 มีความสัมพันธ์กับ VKH syndrome, AAU และ BD ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ในประเทศไทยยังมีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของ HLA และโรคทั้งสามนี้น้อยมาก ในบทความนี้กล่าวถึงความสัมพันธ์ระหว่าง HLA และโรคยูเวียอักเสบที่ไม่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อที่ศึกษาในประชากรเชื้อชาติต่างๆ และหามุมมองสำหรับงานวิจัยในอนาคตสำหรับประชากรไทย

วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2558; 48(1): 10-17. Doi: 10.14456/jams.2015.6

คำรหัส : Human leukocyte antigen, HLA, โรคยูเวียอักเสบ ความสัมพันธ์กับโรค

Introduction

Over the past forty years, several human leukocyte antigens (HLA) have been identified as HLA-associated diseases involving in disease susceptibility and being the diagnostic markers. These associations found in immune-mediated diseases, malignancies and infectious diseases. The most well-known and classic HLA antigen is HLA-B27 associated with ankylosing spondylitis.¹ The advance technologies in genetics and molecular biology together with the successful of the human genome project lead to the understanding of HLA polymorphisms and found several HLA alleles associated with a number of human diseases. For example, HLA-DQA1*0501/DQB1*0201 encoded HLA-DQ2 antigen and HLA-DQA1*03/DQB1*0302 encoded HLA-DQ8 antigen are strongly associated with coeliac disease,² HLA-DRB1 alleles associated 30-50% with rheumatoid arthritis,³ HLA-DPA1 and HLA-DPB1 alleles associated with chronic hepatitis B virus infection,⁴ HLA-DRB1*1602-DQA1*0102-DQB1*0502 associated with Graves' disease⁵ and HLA DQB1*0602 associated with narcolepsy, a lifelong sleep disorder.⁶⁻⁸ The studies of HLA disease association vary widely among different ethnic group; however, it is still unclear regarding to the actual mechanisms of HLA in the disease development and still requires the

larger case-control studies in diverse populations.⁹ The person who carries particular HLA antigen or allele associated to one disease may not suffer with the disease; nevertheless, the patients who suffer with their disease usually have such specific HLA antigen or allele. Therefore, identification of specific HLA alleles and antigens associated diseases is beneficial for understanding the disease immunopathogenesis supporting the proposed theory of HLA markers for disease diagnosis.

Since there are several emblematic HLA-associated diseases reported with a particular HLA haplotype and/or alleles, we will focus on HLA associated with only one disease, uveitis, a major cause of visual impairment and blindness accounting for 45 million people worldwide in which one third are Asian. In Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital, Chiang Mai, Thailand, almost 500 patients each year suffer from uveitis. 60% of patients were non-infection and/or autoimmune-related diseases and about 19% of patients were undetermined etiology.¹⁰ This review aims to discuss the association between HLA-related genetic linkage and these three causes of uveitis, non-infection, autoimmune diseases and unidentified cause.

Pathogenesis and causes of uveitis

Uveitis is the major cause of blindness. The inflammation can occur at uvea, including iris, ciliary body, choroid, vitreous, optic nerve and/or retina. It can be divided into 4 classes based on anatomical classification including anterior, intermediate, posterior and panuveitis. Anterior uveitis (Figure 1) occurs in anterior chamber resulting in iritis, iridocyclitis or anterior cyclitis. Intermediate uveitis occurs in vitreous and/or par plana leading to pars planitis, posterior cyclitis or hyalitis. Posterior uveitis occurs in retina or choroid, whilst, panuveitis occurs in all site.



Figure 1. Anterior photography of acute-anterior uveitis presented with ciliary injection, anterior chamber cells, hypopyon and posterior synechia

To identify the cause of uveitis, medical history, ophthalmic and physical examination together with laboratory tests are needed for the accurate treatment. Misdiagnosis might lead to the harmful treatment resulting in worse disease development. The causes of uveitis can be infection, autoimmune-related diseases, eyes trauma, malignancy and unidentified factors. The major causes of non-infectious uveitis in Thailand was reported in Pathanapitoon *et al.* (2008) including HLA-B27-associated acute anterior uveitis (AAU)(7%), Behçet's disease (5.8%) and Vogt-Koyanagi-Harada (VKH) syndrome (16%) which differ from the West and other Asian populations.¹⁰ Non-infectious uveitis is a matter of interesting with HLA association including HLA-DR4 can be associated with Vogt-Koyanagi-Harada (VKH) syndrome (Figure 2), HLA-B27-associated with

acute anterior uveitis (AAU) and HLA-B51-associated with Behçet's disease.

The genetic risk has been concerned since the period of nineteen centuries when the massive migration of Chinese into Thailand was noticed.¹¹ Inter-marriage of different ethnic groups between Asian-Asian and Asian-Western or European has been widespread which affects the transfer of genetic information among populations. New genetic marker for certain disease susceptibility is a matter of concern and can vary among ethnic groups due to the population movement.

Association between HLA and non-infectious uveitis and its study in Thailand

HLA-B27, HLA-B51 and HLA-DR4 can be found in Thai population with the frequency of 4.4%, 2.5% and 4.6% (DRB1*0405), respectively.¹¹ However, the gene frequency of first two HLA in Northern Thais is higher (6% and 4.9%, respectively),¹² whilst, those of HLA-DRB1*0405 is lower with the frequency of 3.3%.¹¹

HLA-B27-associated acute anterior uveitis (AAU)

The first study of HLA-B27-associated AAU in Northern Thailand was described in 2006.¹³ About 43% of patients with AAU presented HLA-B27-positive similar to the findings in the West. This HLA allele showed a strong association with AAU and tended to have more disease recurrences. The prevalence of HLA-B27-associated AAU differ among the ethnic groups such as 97.5% in Chinese,¹⁴ 77.7% in French study,¹⁵ 50% in British study,¹⁶ 40% in Turkish¹⁷ and 15.9% in Switzerland.¹⁸ Differences in the severity of uveitis and the prevalence of HLA-B27-associated AAU might be influenced by the genetic factors.

Fifteen percent of HLA-B27-associated AAU Thai patients had ankylosing spondylitis (AS).¹³ Previous studies in Korean and Turkish demonstrated that HLA-B27-associated AAU had more developed hypopyon, fibrin in anterior chamber and more association with spondyloarthropathy than HLA-B27-negative AAU.^{17,19} Almost half of AAU Thai patients were HLA-B27-negative and the cause remains unknown.¹³

HLA-B27 subtypes or other HLA alleles might be related to these patients and should be further investigated.

Approximately 62 subtypes of HLA-B27 with different protein translation were identified, but not all subtypes are disease-related.²⁰ The most widely distributed disease-associated subtypes worldwide is HLA-B*2705, whilst, HLA-B*2702 and HLA-B*2704 are common in Mediterranean Caucasian populations and Asian populations, respectively.²⁰ HLA-B*2704 showed strong association with AS in Chinese,^{21,22} Japanese,²³ Taiwan²⁴ and Thai.²⁵



Figure 2. Anterior segment photography demonstrated acute anterior uveitis with hypopyon in Behçet's uveitis

HLA-B5 is a strong genetic involvement with BD which specifically links to the predominant sub-allele HLA-B51.²⁸ Since BD is commonly found in Asians including Chinese, Korean and Japanese,²⁹⁻³¹ HLA-B5/B51 might be also the risk factor for BD or BU in Thais. Until now, there was no report regarding to the prevalence of HLA-B5/B51 in Thai patients with BU.

Although Amerindian peoples have high prevalence of HLA-B51, no cases of BD have been reported.²⁶ Therefore, the presence of HLA-B51 in the western population does not correlate to BD susceptibility and might be specific only to Asian populations.

HLA-B51-associated Behçet's disease

Behçet's disease (BD) is a systemic vasculitis resulting in oral ulcers, genital ulcers, skin, ocular lesions and gastrointestinal and neurological systems involvement. It occurs predominantly in Asian, Middle Eastern and Mediterranean populations with 10 times higher in prevalence than in European and Amerindian populations.²⁶ Uveitis is the most common ocular complication of BD. The most common type of involvement in patients with Behçet's uveitis (BU) is posterior or panuveitis (Figure 2 and 3). In Thai patients, BD is one of the major causes of retinal vasculitis²⁷ (Figure 3). The cause of BD is unknown but genetic factor might play a role in the pathogenesis.²⁶

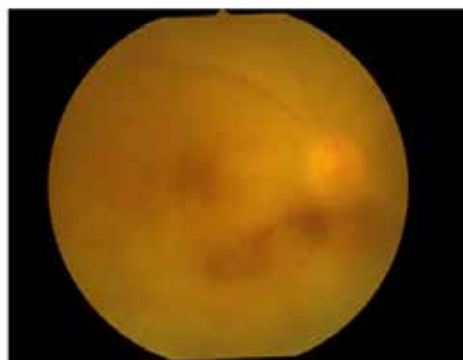


Figure 3. Fundus photography of right eye shows retinal vasculitis in Behçet's uveitis

HLA-DR4-associated Vogt-Koyanagi-Harada (VKH) syndrome

Vogt-Koyanagi-Harada (VKH) disease is a multi-systemic autoimmune disorder with granulomatous panuveitis, serious retinal detachment (Figure 4), skin, auditory and central nervous system involvement. VKH syndrome commonly occurs in various ethnic groups worldwide including Asian, Middle Eastern, Hispanic and Native American population but rarely in Caucasian. In Thailand, women patients were found dominantly with 48% of retinal detachment.³²⁻³⁴ Previous genetic studies revealed that several HLA have been linked with VKH syndrome including HLA-DR4, HLA-DR53 and HLA-DQ4 with strongest associated risk for HLA-DRB1*0405 and DRB1*0410 haplotype.^{35,36}

The strong association between HLA alleles and VKH syndrome is different among races. However, there was no report about HLA-linked VKH syndrome in Thailand. For Asian populations, only the studies in Japanese, Chinese and Vietnamese have been published. HLA-DR4, HLA-DR53 and HLA-DQ4 are strongly associated with VKH syndrome in Japanese,³⁷

whilst, HLA-DR4, HLA-DR53 and HLA-DQ7 are found in Chinese patients.³⁸ Likewise, HLA-DR4 presents 75% frequency with DRB1*0405 allele expression in Vietnamese patients.³⁹ All these reports suggest that HLA-DR locus could be the primary susceptibility genes for VKH pathogenesis.

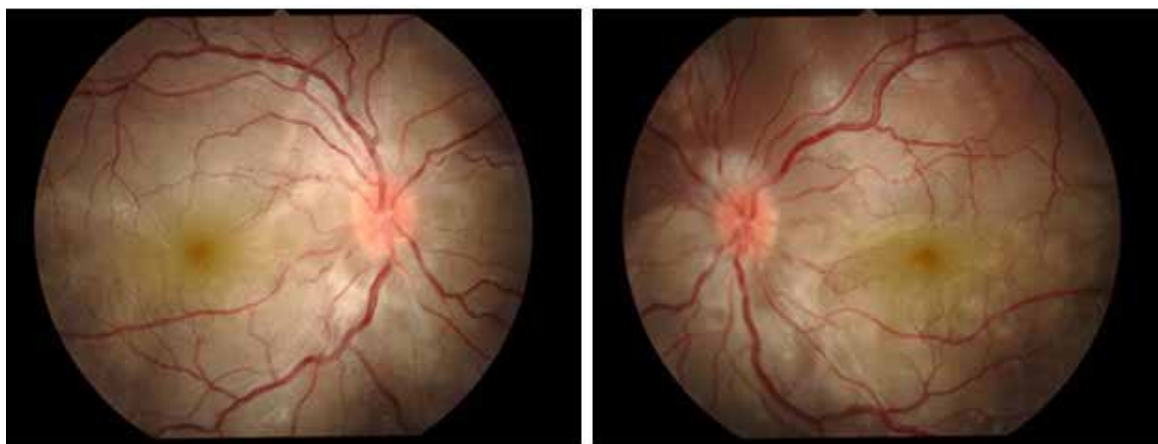


Figure 4 Fundus photography shows bilateral serous retinal detachment in Vogt-Koyanagi-Harada disease

Other susceptibility genes with uveitis symptoms

Several other genes including other HLA class I, class II and genes outside HLA locus might be also associated with uveitis. Other HLA class I genes are HLA-A2 and HLA-B58. HLA-A2 was found in Japanese psoriatic arthritis patients with uveitis but its strong correlation remains uncertain.⁴⁰ In inflammatory bowel disease (IBD)-associated uveitis, HLA-B58 was reported to be the susceptibility gene.⁴¹ The roles of these two HLA genes in disease pathogenesis are still to be clarified.

Other HLA class II genes might also affect uveitis. HLA-DRB1*08 was reported to be associated with acute anterior uveitis (AAU) in Japanese, Norwegian and Mexican Mestizo patients with AS.⁴²⁻⁴⁴ But the specific role of HLA-DRB1*08 in AAU remain unclear. In Caucasian studies, HLA-DRB1*0801/DQA1*0401/DQB1*0402 was associated with AAU.⁴⁵ Another allele, HLA-DRB1*0802 was revealed in Mestizo pars planitis patients.⁴⁶ Besides HLA-B58, HLA-DRB1*0103 might be also related to IBD-associated uveitis. However, this HLA subtype has not been found to be associated with other uveitis entity.⁴¹

For other genes located within HLA locus, MHC class I polypeptide-related sequence A (MICA) located near HLA-B locus was strongly associated with BD. A study of triplet repeat (GCT/AGC) in the transmembrane region of MICA gene demonstrated that MICA*A6 allele showed the strong association in Korean patients,⁴⁷ while, MICA009 was reported in Japanese patients³⁰ (Mizuki et al., 1999). Another gene cluster implicated AAU is low-molecular weight polypeptide 2 (LMP2 or PSMB9) with LMP7, TAP1 and TAP2 reported in SNP studies which not all provided the positive results. Therefore, the mechanism of these genes remains to be clarified.⁴⁸

From genome-wide association studies (GWAS) and SNP studies, several uveitis-susceptible genes were reported outside the HLA locus. Multiple RNA transcripts, multiple protein genes and autoantibodies have been revealed the potential of uveitis susceptibility and might be the novel target for pharmaceutical drugs. The examples of significant genes linked to AAU and non-infectious uveitis include Killer Immunoglobulin Receptor (KIR) genes, genes of

cytokines such as IL-1 cluster, IL-10, TNF, TNFR1 and IL23R, ANTXR2, CARD9, ERAP1, TRADD, STAT3, two intergenic regions on chromosome 2p15 and 21q22 and a region on chromosome 9p.^{48,49} However, very few genetic studies in this field have been performed in Thailand.

Conclusion

This review briefly explains the previous studies related to the association of HLA, other genes and the actual causes of uveitis among populations. Non-infectious, autoimmune related uveitis and undetermined patients are of interesting to investigate whether genetic factors are linked or not. Although

several etiologic reports presented the strong association between HLA-DR4 and Vogt-Koyanagi-Harada (VKH) syndrome, HLA-B27 and acute anterior uveitis (AAU) as well as HLA-B51 and Behçet's disease (BD) in Western, European and Asian populations, few have been reported in Thailand. Therefore, the study of more HLA alleles and other genes related to uveitis together with gene frequency in uveitis Thai patients is very interesting for further investigation. This will benefit the physicians for disease prognosis and diagnosis in the earlier stage of disease to provide the effective treatments and can be used as a genetic marker for uveitis susceptibility in Thai population.

References

1. Brown MA, Pile KD, Kennedy G, Campbell D, Andrew L, March R, et al. A genome-wide screen for susceptibility loci in ankylosing spondylitis. *Arthritis and Rheum* 1998; 41: 588-95.
2. Sollid LM, Lie BA. Celiac disease genetics: current concept and practical applications. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: 843-51.
3. Imboden JB. The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Annu Rev Pathol* 2009; 4: 417-34.
4. Nishida N, Sawai H, Kasiwase K, et al. New susceptibility and resistance HLA-DP alleles to HBV-related diseases identified by a Trans-ethnic association study in Asia. *PLoS One* 2014; 9(2): e86449. doi: 10.1371/journal.pone.0086449.
5. Wongsurawat T, Nakkuntod J, Charoenwongse P, Snabboon T, Sridama V, Hirankarn N. The association between HLA class II haplotype with Graves' disease in Thai population. *Tissue Antigens* 2006; 67: 79-83.
6. Matsuki K, Grumet FC, Lin X, Guilleminault C, Dement WC, Mignot E. DQ rather than DR gene marks susceptibility to narcolepsy. *Lancet* 1992; 339: 1052.
7. Mignot E, Lin X, Arrigoni J, Macaubas C, Olive F, Hallmayer J, Undershill P, Guilleminault C, Dement WC, Grumet FC. DQB1*0602 and DQA1*0102 (DQ1) are better markers than DR2 for narcolepsy in caucasian and black americans. *Sleep* 1994; 17: S60-S67.
8. Pelin Z, Guilleminault C, Rish N, Grumet FC, Mignot E. HLA-DQB1*0602 homozygosity increases relative risk for narcolepsy but not disease severity in two ethnic groups. *Tissue Antigens* 1998; 51: 96-100.
9. Howell WM. HLA and disease: guilt by association. *Int J Immunogenet* 2014; 41: 1-12.
10. Pathanapitoon K, Kunavisarut P, Ausayakhun S, Sirirungsi W, Rothova A. Uveitis in a tertiary ophthalmology centre in Thailand. *Br J Ophthalmol* 2008; 92: 474-8.
11. Chandanayingyong D, Bejrachandra S, Kunachiwa W, et al. HLA in Thai population. *Mahidol J* 2000; 7: 53-60.
12. Fongsatikul L, Nantachit N, Kamtorn N, Leetrakool N. HLA gene frequencies of northern Thais. *J Med Assoc Thai* 1997; 80 (Suppl 1): S38-42.
13. Pathanapitoon K, Suksomboon S, Kunavisarut P, Ausayakhun S, Wattananikorn S, Leetrakool N, Rothova A. HLA-B27-associated acute anterior uveitis in the university referral centre in North Thailand: clinical presentation and visual prognosis. *Br J Ophthalmol* 2006; 90: 1448-50.

14. Zheng MQ, Wang YQ, Lu XY, Wang YL, Mao LP, Gu YF, Chen PF. Clinical analysis of 240 patients with HLA-B27 associated acute anterior uveitis. *Eye Sci* 2012; 27: 169-72.
15. Monnet D, Breban M, Hudry C, Dougados M, Brézin AP. Ophthalmic findings and frequency of extraocular manifestations in patients with HLA-B27 uveitis: a study of 175 cases. *Ophthalmology* 2004; 111: 802-9.
16. Brewerton DA, Caffrey M, Nicholls A, Walters D, James DC. Acute anterior uveitis and HLA-A27. *Lancet* 1973; 302: 994-6.
17. Tuncer S, Adam YS, Urgancioglu M, Tugal-Tutkun I. Clinical features and outcomes of HLA-B27-positive and HLA-B27-negative acute anterior uveitis in a Turkish patient population. *Ocul Immunol Inflamm* 2005; 13: 367-73.
18. Tran VT, Auer C, Guex-Crosier Y, Pittet N, Herbort CP. Epidemiology of uveitis in Switzerland. *Ocul Immunol Inflamm* 1994; 2: 169-76.
19. Park SC, Ham D. Clinical features and prognosis of HLA-B27 positive and negative anterior uveitis in a Korean population. *J Korean Med Sci* 2009; 24: 722-728.
20. Khan MA. Remarkable polymorphism of HLA-B27: an ongoing saga. *Curr Rheumatol Rep* 2010; 12: 337-41.
21. Mou Y, Wu Z, Gu J, et al. HLA-B27 polymorphism in patients with juvenile and adult onset ankylosing spondylitis in Southern China. *Tissue Antigens* 2010; 75: 56-60.
22. Liu Y, Jiang L, Cai Q, et al. Predominant association of HLA-B*2704 with ankylosing spondylitis in Chinese Han patients. *Tissue Antigens* 2010; 75: 61-64.
23. Yamaguchi A, Ogawa A, Tsuchiya N, Shiota M, Mitsui H, Tokunaga K, Tadokoro K, Juji T, Ito K. HLA-B27 subtypes in Japanese with seronegative spondyloarthropathies and healthy controls. *J Rheumatol* 1996; 23: 1189-93.
24. Hou TY, Chen HC, Chen CH, Chang DM, Liu FC, Lai JH. Usefulness of human leucocyte antigen-B27 subtypes in predicting ankylosing spondylitis: Taiwan experience. *Intern Med J* 2007; 37: 749-52.
25. López-Larrea C, Sujirachato K, Mehra NK, et al. HLA-B27 subtypes in Asian patients with ankylosing spondylitis. Evidence for new associations. *Tissue Antigens* 1995; 45: 169-76.
26. Mendes D, Correia M, Barbedo M, Vaio T, Mota M, Gonçalves O, Valente J. Behçet's disease – a contemporary review. *Journal of Autoimmunity* 2009; 32: 178-88.
27. Apinyawasisuk S, Rothova A, Kunavisarut P, Pathanapitoon K. Clinical features and etiology of retinal vasculitis in Northern Thailand. *Indian J Ophthalmol* 2013; 61: 739-42.
28. Ohno S, Aoki K, Sugiura S, et al. Letter: HLA-A5 and Behçet's disease. *Lancet* 1973; 2: 1383-4.
29. Chung YM, Tsai ST, Liao F, et al. A genetic study of Behçet's disease in Taiwan Chinese. *Tissue Antigens* 1987; 30: 68-72.
30. Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y, Yabuki K, Ando H, Goto K, Nakamura S, Bahram S, Ohno S, Inoko H. Association analysis between the MIC-A and HLA-B alleles in Japanese patients with Behçet's disease. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1961-6.
31. Chang HK, Kim JU, Cheon KS, et al. HLA-B51 and its allelic types in association with Behçet's disease and recurrent aphthous stomatitis in Korea. *Clin Exp Rheumatol* 2001; 19 (Suppl.24): S31-5.
32. Phanthumchinda K, Kanchanapongkul J, Locharnnkul C. Vogt-Koyanagi-Harada syndrome. *J Med Assoc Thai* 1989; 72: 144-9.

33. Tesavibul N, Sansanayuth W. Vogt-Koyanagi-Harada disease in Thai patients. *J Med Assoc Thai* 2005; 88: S26-30.
34. Yodmuang T, Rothova A, Kunavisarut P, Pathanapitoon K. Vogt-Koyanagi-Harada disease in Thailand. *Ocul Immunol Inflamm* 2012; 20: 419-22.
35. Shindo Y, Inoko H, Yamamoto T, Ohno S. HLA-DRB1 typing of Vogt-Koyanagi-Harada's disease by PCR-RFLP and the strong association with DRB1*0405 and DRB1*0410. *Br J Ophthalmol* 1994; 78: 223-226.
36. Damico FM, Kiss S, Young LH. Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Semin Ophthalmol* 2005; 20: 183-90.
37. Horie Y, Takemoto Y, Miyazaki A, Namba K, Kase S, Yoshida K, et al. Tyrosinase gene family and Vogt-Koyanagi-Harada disease in Japanese patients. *Mol Vis* 2006; 12: 1601-5.
38. Hou S, Yang P, Du L, Zhou H, Lin X, Liu X, et al. Small ubiquitin-like modifier 4 (SUMO4) polymorphisms and Vogt-Koyanagi-Harada (VKH) syndrome in the Chinese Han population. *Mol Vis* 2008; 14: 2597-603.
39. Riddington L, Hall AJ, Tait B, Nicholson I, Varney M. Vogt-Koyanagi-Harada syndrome in patients of Vietnamese ancestry. *Aust N Z J Ophthalmol* 1996; 24: 147-9.
40. Keino H, Sakai J, Usui M. Association between HLA-A2 in Japanese psoriasis arthritis and susceptibility to uveitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2003; 241: 777-8.
41. Orchard TR, Chua CN, Ahmad T, Cheng H, Welsh KI, Jewell DP. Uveitis and erythema nodosum in inflammatory bowel disease: Clinical features and the role of HLA genes. *Gastroenterology* 2002; 123: 714-8.
42. Monowarul Islam SM, Numaga J, Fujino Y, et al. HLA-DR8 and acute anterior uveitis in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 547-50.
43. Ploski R, Flato B, Vinje O, Maksymowych W, Forre O, Thorsby E. Association to HLA-DRB1*08, HLA-DPB1*0301 and homozygosity for an HLA-linked proteasome gene in juvenile ankylosing spondylitis. *Hum Immunol* 1995; 44: 88-96.
44. Maksymowych WP, Gorodezky C, Olivo A, et al. HLA-DRB1*08 influences the development of disease in Mexican mestizo with spondyloarthropathy. *J Rheumatol* 1997; 24: 904-7.
45. Mackensen F, Reveille JD, Smith JR, et al. The MHC class II haplotype HLA-DRB1*0801/DQA1*0401/DQB1*0402 is associated with acute anterior uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46: E-Abstract 3480.
46. Alaez C, Arellanes L, Vazquez A, et al. Classic pars planitis: Strong correlation of class II genes with gender and some clinical features in Mexican mestizos. *Hum Immunol* 2003; 64: 965-72.
47. Park SH, Park KS, Seo YII, Min DJ, Kim WU, Kim TG, Cho CS, Mok JW, Park KS, Kim HY. Association of MICA polymorphism with HLA-B51 and disease severity in Korean patients with Behçet's disease. *J Korean Med Sci* 2002; 17(3): 366-70.
48. Martin TM, Rosenbaum JT. An update on the genetics of HLA-B27 associated acute anterior uveitis. *Ocul Immunol Inflamm* 2011; 19: 108-114.
49. Martin TM, Zhang G, Luo J, et al. A locus on chromosome 9p predisposes to a specific disease manifestation, acute anterior uveitis, in ankylosing spondylitis, a genetically complex, multisystem, inflammatory disease. *Arthritis Rheum* 2005; 1: 269-74.

วัณโรคดื้อยาชนิดรุนแรง (Extensively-drug resistant tuberculosis): สายพันธุ์ใหม่และความท้าทายในอนาคต

Extensively-drug resistant tuberculosis: A new strain and future challenge

รติกร แกมเงิน¹ ชัญญานุช ภูทิมา¹ บดินทร์ บุตรอินทร์^{1*}
Ratikorn Gamngoen¹ Chanyanuch Putim¹ Bordin Burt-Indr^{1*}

¹แขนงจุลชีววิทยาคลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

¹Division of Clinical Microbiology, Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200, Thailand.

*Corresponding author : (royter99@hotmail.com bordin.b@cmu.ac.th)

Received February 2015

Accepted as revised January 2015

Abstract

Extensively-Drug Resistant Tuberculosis (XDR-TB) is emerging as an even more ominous treat. XDR-TB is defined as TB that is resistant to any fluoroquinolone, and at least one of three injectable second-line drugs (capreomycin, kanamycin and amikacin), in addition to isoniazid and rifampicin. This makes XDR-TB treatment extremely complicated, if not impossible, in general treatment. In a 2006 XDR-TB outbreak in KwaZulu-Natal, South Africa, 52 of 53 people who contracted the disease died within months, It is estimated that 70% of XDR-TB patients die within a month of diagnosis. The most recent drug-resistance surveillance data issued by the WHO estimates that an average of roughly 5 percent of Multi-drug resistant tuberculosis (MDR-TB) cases are XDR-TB. Estimating the incidence of XDR-TB is extremely difficult because most laboratories are ill-equipped to detect and diagnose. To avoid the emergence of more resistant strains that may lead to almost untreatable disease, we must focus our efforts on the right management of drug resistance tuberculosis.

Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2015; 48(1): 18-28. Doi: 10.14456/jams.2015.5

Keywords: Mycobacterium tuberculosis, multi-drug resistant tuberculosis, extensively-drug resistant tuberculosis, drug-susceptibility testing, anti-tuberculosis drug

Extensively-drug resistant tuberculosis หรือ XDR-TB เกิดขึ้น และเป็นภัยคุกคามอย่างร้ายแรงทางการแพทย์ XDR-TB เป็นการติดเชื้อวัณโรคที่ดื้อต่อยากลุ่ม fluoroquinolone และอย่างน้อยหนึ่งในสามของยาฉีดกลุ่ม second-line drug (capreomycin, kanamycin และ amikacin) รวมทั้งดื้อต่อยา isoniazid และ rifampicin ทำให้การรักษา XDR-TB มีความซับซ้อนมากซึ่งแทบจะเป็นไปไม่ได้เลยสำหรับการรักษาทั่วไป ในปี ค.ศ. 2006 มีการระบาดของหนักของเชื้อ XDR-TB ในเมือง KwaZulu-Natal ประเทศแอฟริกาใต้ พบผู้ป่วยติดเชื้อ 53 คน โดยพบว่าเสียชีวิต 52 คน ในระยะเวลาภายในหนึ่งเดือน มีการประมาณการณ่ว่าร้อยละ 70 ของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ XDR-TB จะเสียชีวิตภายในระยะเวลาหนึ่งเดือน และจากการประมาณการขององค์การอนามัยโลก พบว่ามีผู้ป่วยร้อยละ 5 ในกลุ่ม multi-drug resistant tuberculosis หรือ MDR-TB เป็นผู้ป่วย XDR-TB การประมาณการณของผู้ติดเชื้อ XDR-TB เป็นเรื่องที่ยากมากเพราะห้องปฏิบัติการส่วนมากขาดเครื่องมือในการตรวจหา และวิธีในการวินิจฉัย เพื่อเป็นการหลีกเลี่ยงอุปสรรคการระบาดของ XDR-TB เราควรให้ความสำคัญในการจัดการเกี่ยวกับเชื้อวัณโรคดื้อยา

วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2558; 48(1): 18-28. Doi: 10.14456/jams.2015.5

Keywords: Mycobacterium tuberculosis, multi drug resistant tuberculosis, extensively drug resistant tuberculosis, drug-susceptibility testing, anti-tuberculosis drug

บทนำ

วัณโรค หรือ tuberculosis เป็นโรคติดเชื้อที่เป็นปัญหาสำคัญของโลก มีสาเหตุมาจากเชื้อ Mycobacterium tuberculosis โดยพบว่าประชากรหนึ่งในสามของโลกติดเชื้อ *M. tuberculosis* และส่วนใหญ่พบอยู่ในประเทศที่กำลังพัฒนา^{1,2} จากรายงานขององค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) ในปี 2014 พบผู้ป่วยติดเชื้อรายใหม่ 9.0 ล้านคนทั่วโลกหรือ 126 คนต่อประชากร 100,000 คน สองอันดับแรก พบที่อินเดีย (2.2 ล้านคน) และจีน (1 ล้านคน) ตามลำดับ ในไทยพบผู้ป่วยรายใหม่ประมาณ 80,000 คนต่อปี³ ปัญหาที่พบหลังจากติดเชื้อคือเชื้อดื้อยาที่ใช้ในการรักษาวัณโรค ส่งผลให้มีอัตราการเจ็บป่วย และอัตราการเสียชีวิตของผู้ติดเชื้อ *M. tuberculosis* ดื้อยามากขึ้น การวินิจฉัยเกี่ยวกับเชื้อดื้อยา ใช้นาน ซึ่งการวินิจฉัยที่ถูกต้อง และรวดเร็วมีความสำคัญต่อการรักษา ดังนั้นจึงนำไปสู่การพัฒนาวิธีการวินิจฉัยใหม่ที่ใช้เวลาน้อยลง และครอบคลุมกับยาที่ใช้วินิจฉัยเชื้อดื้อยา มีการพัฒนายาชนิดใหม่เพื่อเป็นทางเลือกใหม่ที่ใช้รักษาผู้ติดเชื้อ *M. tuberculosis* ดื้อยา

อุบัติการณ์การติดเชื้อวัณโรคดื้อยา

ปัญหาสำคัญของการติดเชื้อ *M. tuberculosis* คือ

การดื้อยาที่ใช้รักษาวัณโรค แบ่งได้เป็นสองกลุ่ม คือการติดเชื้อ *M. tuberculosis* ดื้อยาชนิดเดียว (mono-drug resistant tuberculosis) และการติดเชื้อ *M. tuberculosis* ดื้อยาหลายชนิด ได้แก่ multi-drug resistant tuberculosis หรือ MDR-TB และ extensively-drug resistant tuberculosis หรือ XDR-TB⁴ โดย MDR-TB เป็นการติดเชื้อดื้อยาในกลุ่มยารักษาวัณโรคอันดับแรก (first-line antituberculosis) อย่างน้อยสองชนิด ได้แก่ isoniazid (INH) และ rifampicin (RMP) สำหรับ XDR-TB คือการติดเชื้อ MDR-TB ที่ดื้อยาในกลุ่มยารักษาวัณโรคอันดับสอง (second-line antituberculosis) ด้วยได้แก่ ยากลุ่ม fluoroquinolone และยาในกลุ่มยาฉีดอย่างน้อยหนึ่งชนิด ได้แก่ amikacin, capreomycin และ kanamycin⁵ ในประเทศไทยพบว่าร้อยละ 2 เป็นผู้ป่วยรายใหม่ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น MDR-TB ร้อยละ 17 เป็นผู้ป่วยที่มีประวัติการรักษาวัณโรค และพัฒนาไปเป็น MDR-TB สำหรับอัตราการเสียชีวิตของผู้ติดเชื้อ MDR-TB ประกอบด้วยผู้ป่วย MDR-TB รายใหม่ร้อยละ 19.3 และผู้ป่วยที่มีประวัติการรักษาวัณโรค และพัฒนาไปเป็น MDR-TB ร้อยละ 22 นอกจากนั้นพบผู้ป่วยที่เป็น XDR-TB ใน 92 ประเทศทั่วโลก (ดังแสดงในรูปที่ 1) โดยร้อยละ 9 เป็นผู้ป่วย MDR-TB และพัฒนาไปเป็น XDR-TB แต่ยังไม่มียาที่ชัดเจนเกี่ยวกับ XDR-TB ในประเทศไทย³

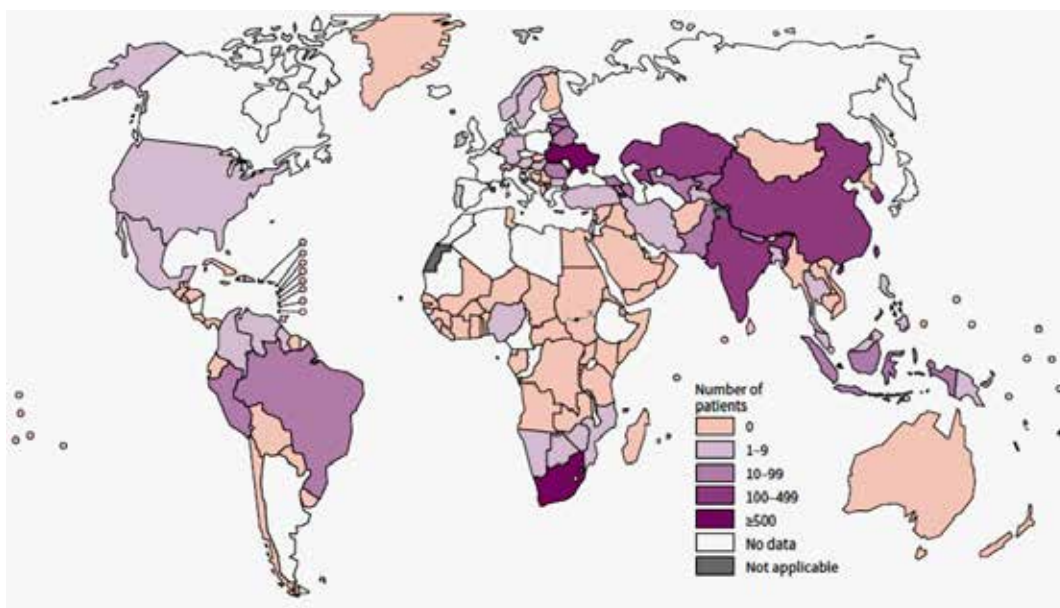


Figure 1. Number of patients with laboratory confirmed XDR-TB in 2013

สาเหตุของการดื้อยาของเชื้อ *M. tuberculosis*

สาเหตุที่ทำให้เกิดการดื้อยาของเชื้อ อาจเนื่องมาจากการเลือกใช้ยาหรือวิธีการรักษาที่ไม่เหมาะสมของแพทย์ หรืออาจเกิดจากการรับประทานยาไม่ต่อเนื่องของผู้ป่วย จึงทำให้เชื้อเกิดการกลายพันธุ์เป็นเชื้อดื้อยา⁶ การดื้อยาของเชื้อสามารถแบ่งได้เป็นสามประเภท ได้แก่ primary resistance เป็นการดื้อยา โดยได้รับเชื้อสายพันธุ์ดื้อยาจากบุคคลอื่นที่ติดเชื้อ amplified resistance เป็นการดื้อยาจากการได้รับการรักษาที่ผิดวิธี หรือการเลือกยาในการรักษาที่ไม่เหมาะสม และ acquired resistance เป็นการดื้อยาที่เกิดขึ้นระหว่างการรักษา โดยเชื้อเกิดการเปลี่ยนจากเชื้อที่ไวต่อยาเป็นเชื้อดื้อยา⁷ สาเหตุของการดื้อยาส่วนใหญ่เกิดจากการกลายพันธุ์ในบริเวณที่ยาออกฤทธิ์ โดยที่การกลายพันธุ์แบบ spontaneous mutation ภายในจีโนมของเชื้อ *M. tuberculosis* สามารถเกิดขึ้นได้ในหลายรูปแบบทั้ง point mutation, insertion, deletion และ full-gene deletion ทำให้เกิดการแปลรหัส mRNA ที่ผิดไป และเกิดเป็นเชื้อดื้อยาขึ้น⁸ ดังนั้นการพัฒนาไปเป็นเชื้อดื้อยาจึงทำให้การรักษาวัณโรคให้หายขาดเป็นไปได้ยาก และเกิดการแพร่กระจายมากขึ้น

เชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ใหม่ (XDR-TB)

ในปี 1990 พบการระบาดของ MDR-TB สายพันธุ์ Beijing/W genotype ในประเทศสหรัฐอเมริกา^{9,10} ต่อมาในปี 1996 ในงานวิจัยของ Davies¹¹ และคณะศึกษาเชื้อ *M. tuberculosis* ในชนบทของประเทศแอฟริกาใต้ พบเชื้อ *M. tuberculosis* ดื้อต่อยาวัณโรคในกลุ่ม first-line drug ได้แก่ isoniazid

และ rifampicin และอีกห้าปีต่อมาพบว่าเชื้อสายพันธุ์นี้มีการดื้อต่อยาวัณโรคในกลุ่ม second-line drug อีกหลายชนิด¹² ภายหลังพบว่าเป็นเชื้อสายพันธุ์ KwaZulu-Natal (KZN) family โดยจัดว่าเป็นเชื้อสายพันธุ์ XDR-TB ในปี 2006¹³ Gandhi และคณะ¹¹ ศึกษาเชื้อสายพันธุ์ XDR-TB ที่วินิจฉัยได้จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อวัณโรคจากโรงพยาบาลในเมือง KwaZulu-Natal ประเทศแอฟริกาใต้ ด้วยวิธี genotyping พบว่าจำนวน 39 isolates จากทั้งหมด 46 isolates เป็นสายพันธุ์ KZN family นอกจากนั้นงานวิจัยของ Motiwala และคณะ¹⁴ นำเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีจีโนมคล้ายกัน จำนวน 3 isolates จากเมือง Kwazulu-Natal จำนวน 3 isolates ได้แก่ MDR-TB, XDR-TB และเชื้อที่ไวต่อยามาทำ sequencing โดยใช้เทคนิค high-throughput DNA sequencing ในบริเวณ Rv3616c-Rv3617 intergenic region พบว่าเชื้อทั้งสามสายพันธุ์มี genetic background ที่แตกต่างกันไปจากเชื้อสายพันธุ์ F15/LAM4/KZN ซึ่งเป็นสายพันธุ์หลักที่ก่อโรคในประเทศแอฟริกาใต้ และเปรียบเทียบ single-nucleotide polymorphisms (SNPs) ระหว่างเชื้อที่ไวต่อยา และเชื้อ XDR-TB พบว่ามีความแตกต่างกัน 33 SNPs (single-nucleotide polymorphisms) ร่วมกับการเกิด insertion และ deletion ซึ่งผลของ SNPs ที่ได้เป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อ XDR-TB ได้แก่ A90V (DNA gyrase subunit A, *gyrA*), L25I (transmembrane transport protein, *mmpL13a*), Y207Y (arylsulfatase, *atsD* [aryl-sulfate sulphohydrolase]), D441G (DNA-directed RNA polymerase beta subunit, *rpoB*), L458P (DNA-directed RNA polymerase beta subunit, *rpoB*), I1112T (DNA-directed RNA polymerase beta subunit,

rpoB), A1401G (ribosomal RNA 16S, *rrs*), L275P (hypothetical protein), V188A (conserved integral membrane protein), A84A (30S ribosomal protein S11, *rpsK*), D64E (hypothetical protein) และ G418W (PPE family protein)

การทำงานของยา และกลไกในการดื้อยาของเชื้อ *M. tuberculosis*

การดื้อยาของเชื้อ ส่วนมากเกิดจากการ กลายพันธุ์ บริเวณที่ยาจะไปออกฤทธิ์ ซึ่งในปัจจุบันพบการกลายพันธุ์ ของยีน และทำให้เกิดการดื้อยาในกลุ่ม first-line และ second-line antituberculosis ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยการดื้อยาส่งผลทำให้ยาไม่มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ ตัวอย่างการทำงาน และกลไกการดื้อยาที่ใช้รักษาการติดเชื้อ XDR-TB ได้แก่ isoniazid และ rifampicin ซึ่งเป็นยารักษา วัณโรคในกลุ่ม first-line drug และยาในกลุ่ม second-line drug ได้แก่ fluoroquinolone, kanamycin, amikacin และ capreomycin

Table 1. Drug resistance gene of *M. tuberculosis*

Anti-TB drug	Genes mutated in resistance
First-line drugs	
Isoniazid	<i>katG</i> , <i>inhA</i> , <i>ahpC</i> , <i>oxyR</i> , <i>kasA</i> , <i>furA</i> , <i>ndh</i>
Rifampicin	<i>rpoB</i>
Ethambutol	<i>embCAB</i>
Pyrazinamide	<i>pncA</i>
Streptomycin	<i>rrs</i> , <i>rpsL</i> , <i>gidB</i>
Second-line drugs	
Fluoroquinolones	<i>gyrA</i> , <i>gyrB</i>
Injectables: Kanamycin and amikacin Capreomycin	<i>rrs</i> <i>rrs</i> , <i>tlyA</i>
Streptomycin	<i>Rrs</i> , <i>rpsL</i> , <i>gidB</i>
Cycloserine	<i>alrA</i> , <i>ddl</i>
Ethionamide	<i>inhA</i> , <i>etaA/ethA</i>
Para-aminosalicylic acid	Unknown

1. Isoniazid (INH)

ยารักษาวัณโรคในกลุ่ม first-line drug หรือ isonicotinic acid hydrazide (INH) เป็นยาที่มีความจำเพาะสูง ในการกำจัดเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่ม *M. tuberculosis* complex⁸ โครงสร้างของยาประกอบด้วย pyridine ring และหมู่ hydrazine^{8,15} isoniazid เป็นยาที่ยัง ไม่สามารถทำงานได้ (prodrug) จำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์ KatG ของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ซึ่งเป็นเอนไซม์เกี่ยวกับ catalase-peroxidase ในการเปลี่ยนโครงสร้างให้สามารถ ทำงานออกฤทธิ์ทำลายเชื้อได้ (active form)¹⁵ เมื่อยาเข้าสู่เซลล์

จะถูกตัดหมู่ไนโตรเจนด้วยเอนไซม์ KatG กลายเป็น isonicotinoyl radical มีความสามารถในการดึงหมู่ NAD⁺ มาสร้างพันธะ โคเวเลนต์ ทำให้ยาอยู่ในรูปของ INH-NAD adduct สามารถยับยั้งเอนไซม์ enoyl-acyl carrier protein reductase (InhA) ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญที่เชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ใช้สังเคราะห์ mycolic acid ที่เป็นส่วนประกอบหลักของ ผนังเซลล์^{2,8,15} เชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* มีกลไกในการดื้อยา isoniazid โดยมีการกลายพันธุ์ทั้งในระดับยีน และกรดอะมิโน ที่สัมพันธ์กับการออกฤทธิ์ของยา แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม catalase-peroxidase (KatG) กลุ่ม Enoyl-acyl carrier protein reductase (InhA) กลุ่ม Alkyl hydroperoxidase reductase (AhpC) และกลุ่ม NADH dehydrogenase (Ndh)^{2,16-18} โดยส่วนมากเกิดการกลายพันธุ์ที่บริเวณยีน *inhA* และ *katG* โดยที่ยีน *inhA* กำหนดการสร้างเอนไซม์ InhA เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ mycolic acid ซึ่งเป็นส่วน ประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อ ส่วนยีน *katG* กำหนดการ สร้างเอนไซม์ katG ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของ isoniazid จาก pro-drug กลายเป็น active form เมื่อเกิดการกลายพันธุ์ที่ยีน *inhA* ส่งผลให้ *inhA* มีการแสดงออกที่สูงขึ้น และจัดว่าเป็น low-level isoniazid resistance ส่วนการกลายพันธุ์ที่บริเวณ *katG* เป็น moderate ถึง high-level isoniazid resistance^{2,8}

2. Rifampicin (RMP)

เป็นกลุ่มยารักษาวัณโรคอันดับแรกอีกหนึ่งชนิด ที่ทำให้เชื้อพัฒนาเป็น MDR-TB ยา rifampicin เป็นยาที่ กิ่งสังเคราะห์จากเชื้อ *Amiclatopsis rifamycinica* ที่อยู่ในกลุ่ม rifamycin ยา rifampicin มีผลต่อแบคทีเรียหลายชนิด¹⁹ การ ออกฤทธิ์ของยา rifampicin ออกฤทธิ์โดยจับที่ β -subunit ของ RNA polymerase ทำให้ยับยั้งการสังเคราะห์ RNA โดยยับยั้ง กระบวนการ elongation^{2,8} กลไกในการดื้อยา rifampicin ของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* เกิดจากการกลายพันธุ์ภายในยีน *rpoB* ที่กำหนดการสร้าง β -subunit ของ RNA polymerase โดยการกลายพันธุ์เกิดขึ้นที่ตำแหน่ง 81 bp central region ที่ กำหนดการสร้างกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 507-533 หรือ rifampicin resistant-determining region (RRDR) ซึ่งพบได้ถึงร้อยละ 96 จากเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ที่ดื้อยา rifampicin ทั้งหมด¹⁹ โดยตำแหน่งที่มีการกลายพันธุ์มากที่สุดคือ กรดอะมิโน ตำแหน่งที่ 531 เปลี่ยน serine เป็น leucine และตำแหน่งที่ 526 เปลี่ยน histidine เป็น tyrosine ซึ่งจัดว่าเป็น high-level rifampicin resistance นอกจากนี้ยังพบการกลายพันธุ์ใน ตำแหน่งอื่น ได้แก่ กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 511, 516, 518, 522, 529 และ 533 จัดเป็น low-level rifampicin resistance^{2,16}

3. Fluoroquinolones (FQs)

Fluoroquinolones เป็น bactericidal antibiotic ที่ใช้รักษาวัณโรค จัดอยู่ในกลุ่ม second-line drug² ยาในกลุ่มนี้ประกอบด้วย moxifloxacin, levofloxacin, ofloxacin และ gatifloxacin²⁰ โดยยาจับบริเวณเอนไซม์ topoisomerase IV และ topoisomerase II หรือ DNA gyrase บน DNA ซึ่งขัดขวางการเคลื่อนที่ของ replication fork ที่เกี่ยวกับกระบวนการ DNA replication²¹ เชื้อ *M. tuberculosis* มีเฉพาะ topoisomerase II (DNA gyrase)²² ซึ่งเป็น tetramer ของ subunit A และ B ที่ถูกถอดรหัสจากยีน *gyrA* และ *gyrB* เกี่ยวข้องกับกระบวนการ catalyse supercoiling ของ DNA ในขั้นตอน replication^{23,24} กลไกในการดื้อต่อยา fluoroquinolone ของเชื้อเกิดจากการกลายพันธุ์บริเวณ conserved quinolone resistance determining region (QRDR) ของยีน *gyrA* และ *gyrB* ซึ่งส่งผลรบกวนการ interaction ระหว่างยา และ DNA gyrase²⁵ โดยส่วนมากพบการกลายพันธุ์บริเวณ Ala-90 และ Asp-94 ในยีน *gyrA*²⁶

4. Injectable second-line drugs

ยาในกลุ่มยาฉีด ได้แก่ kanamycin, amikacin และ capreomycin ใช้เป็นยารักษา MDR-TB จัดอยู่ในกลุ่ม second-line drug ยา kanamycin และ amikacin เป็น aminoglycoside antibiotic ในขณะที่ capreomycin เป็น cyclic peptide antibiotic² แต่ออกฤทธิ์เหมือนกัน โดยยารบกวนกระบวนการ translation ของเชื้อ *M. tuberculosis* เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ ribosome ที่ตำแหน่ง 16S rRNA²⁷ ส่งผลยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของเชื้อ^{2,8} กลไกการดื้อต่อยา kanamycin และ amikacin ที่พบบ่อยคือเกิดการกลายพันธุ์ที่ A1401G ของยีน *rrs* ที่ทำหน้าที่ในการถอดรหัส 16S rRNA ซึ่งเป็น high-level resistance ต่อยา kanamycin และ amikacin²⁸ กลไกในการดื้อต่อยา capreomycin คือเกิดการกลายพันธุ์บริเวณยีน *tlyA* โดยยีนนี้มีหน้าที่ในการถอดรหัส rRNA methyltransferase ที่จำเพาะกับ 2'-O-methylation ของ ribosome ใน rRNA ซึ่งเมื่อเกิดการกลายพันธุ์จะส่งผลให้ไม่เกิดกระบวนการ methylation²⁹

การวินิจฉัย

ขั้นตอนในการวินิจฉัย XDR-TB เริ่มจากเมื่อได้รับการวินิจฉัยว่าติดเชื้อ MDR-TB ซึ่งเชื้อ *M. tuberculosis* ดื้อต่อยา isoniazid และ rifampicin จากนั้นทำการทดสอบความไวต่อยา (drug susceptibility test หรือ DST) ในกลุ่ม second-line drug ได้แก่ ยาในกลุ่ม fluoroquinolone และกลุ่มยาฉีดสามชนิด ได้แก่ kanamycin, amikacin และ capreomycin โดยในปี 2008 องค์การอนามัยโลกได้แนะนำวิธี automated

liquid-culture system เป็นวิธีมาตรฐานในการทำ second-line drug susceptibility test โดยใช้ยา fluoroquinolones และยารักษาวัณโรคในกลุ่มยาฉีด ซึ่งให้ผลภายใน 4-9 สัปดาห์³⁰ แต่วิธีนี้มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก ใช้เวลานาน มีราคาแพง ต้องการเครื่องมือที่มีความจำเพาะ และต้องการ biosafety ระดับสาม³¹ ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาวิธีทาง molecular เป็นวิธีทาง genotypic method เกี่ยวกับการเพิ่มปริมาณ nucleic acid ของเชื้อ (PCR-based method) ได้แก่วิธี Line-probe hybridization assay (Genotype® MTBDRsl) ซึ่งศึกษาหาลำดับหรือ marker ที่พบในเชื้อที่ดื้อต่อยา fluoroquinolones, kanamycin, amikacin, capreomycin และ etambutol⁴ เป็นวิธีที่มีความถูกต้อง และความไวสูงในการวินิจฉัย แต่มีราคาแพง³² มีการพัฒนาวิธีที่มีค่าใช้จ่ายน้อย มีขั้นตอนไม่ยุ่งยาก ได้แก่ วิธี microscopic-observation drug susceptibility (MODS) assay ซึ่งเป็นการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว (liquid culture) โดยดูการสร้าง cord ของเชื้อ *M. tuberculosis* ผ่านทางกล้องจุลทรรศน์ ใช้เวลาประมาณ 6-8 วัน^{6,7} จะเห็นได้ว่าการวินิจฉัยที่ถูกต้องและรวดเร็ว มีความสำคัญ และจำเป็นต่อการรักษาการติดเชื้อ XDR-TB³³ และป้องกันไม่ให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อไปยังบุคคลอื่น

การรักษา

ในปัจจุบันยาที่ใช้รักษาวัณโรคแบ่งได้เป็นสองกลุ่ม คือ first-line antituberculosis และ second-line antituberculosis (ดังแสดงในตารางที่ 2) การรักษาวัณโรคสามารถแบ่งได้เป็นสองแบบ ได้แก่ standardized regimen คือการให้ยาที่ใช้ในการรักษาผู้ติดเชื้อ ขึ้นอยู่กับข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อดื้อยาในพื้นที่อยู่อาศัยนั้นๆ และ individualized regimen คือการให้ยาโดยขึ้นกับประวัติการรักษาวัณโรคของผู้ป่วย และผลจากการทำการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อ ซึ่งวิธีนี้เหมาะสมในการรักษา XDR-TB^{34,35}

เมื่อได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น XDR-TB องค์การอนามัยโลกได้แนะนำแนวทางในการรักษาเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยา โดยให้ใช้ยาในการรักษาตามลำดับ²⁰ ดังนี้

1. Amikacin, capreomycin หรือ kanamycin
2. Moxifloxacin หรือ levofloxacin
3. Prothionamide หรือ ethionamide
4. Cycloserine หรือ terizidone
5. Para-aminosalicylic acid
6. Pyrazinamide และ etambutol
7. Linezolid ร่วมกับยาในกลุ่ม 5 anti-tuberculosis drugs ได้แก่ clofazimine, amoxicillin/clavulanate, imipenem/cilastin และ clarithromycin³⁷

ระยะเวลาในการรักษา XDR-TB ใช้เวลาอย่างน้อย 20 เดือน และควรรับคำปรึกษาจากผู้เชี่ยวชาญ (TB expert) ในการเลือกยาในการรักษา^{20,37}

Table 2. Antibiotic drug regimen of *M. tuberculosis*³⁶

Group	Anti-tuberculosis agent
First-line oral agent	Isoniazid Rifampicin Ethambutol Pyrazinamide Streptomycin
Second-line parenteral agent (Injectable anti-tuberculosis drugs)	Kanamycin Amikacin Capreomycin
Fluoroquinolones	Levofloxacin Moxifloxacin Gatifloxacin Ofloxacin
Oral bacteriostatic second-line Anti-tuberculosis drugs	Ethionamide Prothionamide Cycloserine Terizidone Para-aminosalicylic acid
Group 5 anti-tuberculosis drugs	Clofazimine Linezolid Amoxicillin/Clavulanate Imipenem/Cilastatin Clarithromycin

ยาชนิดใหม่ที่ใช้รักษาวัณโรคดื้อยา

1. Nitroimidazole

ยาในกลุ่ม nitroimidazole แบ่งเป็นสองชนิด ได้แก่ PA-824 และ delamanid หรือ OPC-67683^{38,39} โดย PA-824 เป็น nitroimidazo-oxazine ออกฤทธิ์ทำลายเชื้อ bacilli ที่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ในสภาวะไม่มีออกซิเจน (anaerobic non-replicating bacilli)⁴⁰ โดยยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์และโปรตีนของเชื้อ³⁸ delamanid เป็น nitroimidazole-oxazole กลไกการออกฤทธิ์คือยับยั้งการสร้าง methoxy-mycolic acid และ keto-mycolic acid⁴¹ ปัจจุบัน delamanid ยังอยู่ใน clinical trial phase ที่ III⁴² ยาทั้งสองชนิดมีโครงสร้างทางเคมี ดังแสดงในรูปที่ 2

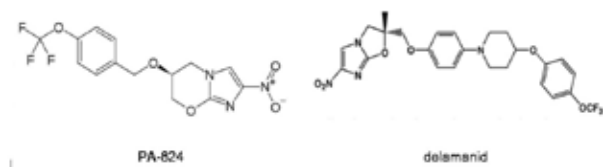


Figure 2. Chemical structure of PA-824 and delamanid (OPC-67683)

2. SQ109

เป็น 1,2-diamine analogue ของยา ethambutol การออกฤทธิ์ของยายังไม่ทราบแน่ชัด แต่คาดว่าเกี่ยวข้องกับ การสังเคราะห์ผนังเซลล์ของเชื้อ โดยใช้กลไกที่แตกต่างจาก ยา ethambutol² ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมี ดังแสดงในรูปที่ 3

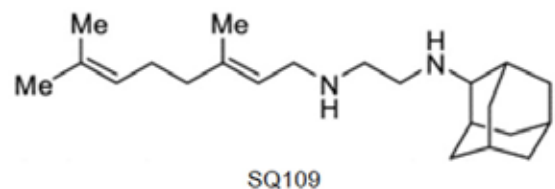


Figure 3. Chemical structure of SQ109

3. TMC207

TMC207 หรือ bedaquiline เป็นส่วนประกอบของ diarylquinoline⁴³ ออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการสร้าง ATP ของเชื้อ mycobacteria^{43,44} การศึกษาโดยใช้ TMC207 ร่วมกับ ยามาตรฐานที่ใช้รักษา MDR-TB พบว่าทำให้รักษาได้เร็วขึ้น⁴⁵ ปัจจุบัน TMC207 ยังอยู่ใน clinical trial phase ที่ IIb⁴² และได้มีการรับรองโดยองค์การอาหารและยา (Food and Drug Administration) ให้ยา bedaquiline ใช้ในการรักษาวัณโรคดื้อยา MDR-TB³⁶ โครงสร้างทางเคมีของยา ดังแสดงในรูปที่ 4

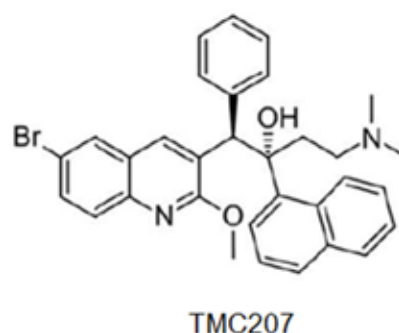


Figure 4. Chemical structure of TMC207

4. NAS-21 และ NAS-91

เป็นยาที่ใช้รักษาโรคมาลาเรีย แต่ยังสามารถรักษาวัณโรคได้ กลไกการออกฤทธิ์ของยา คือยับยั้งการสังเคราะห์ mycolic acid ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อ⁴⁶ ตำแหน่งในการออกฤทธิ์ คือ FAS-II dehydratase ซึ่งถูกถอดรหัสมาจากโปรตีน Rv063647 ยาทั้งสองชนิดมีโครงสร้างทางเคมี ดังแสดงในรูปที่ 5

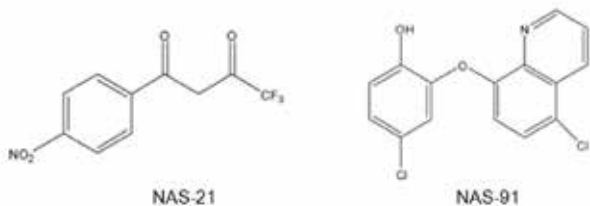


Figure 5. Chemical structure of NAS-21 and NAS-91

5. Phenothiazines

ยาในกลุ่มนี้ ได้แก่ thioridazine และ chlorpromazine เป็น calmodulin antagonist⁴⁸ ออกฤทธิ์ทำลายเชื้อ mycobacteria ที่อาศัยอยู่ใน macrophage⁴⁹ โดยยับยั้งกระบวนการขนส่งแคลเซียม และยับยั้งเอนไซม์ที่ต้องอาศัยแคลเซียม นอกจากนี้พบว่ายากลุ่ม phenothiazines อาจเกี่ยวข้องกับ efflux pump inhibitor⁵⁰ ซึ่งโครงสร้างทางเคมีของยา thioridazine ดังแสดงในรูปที่ 6

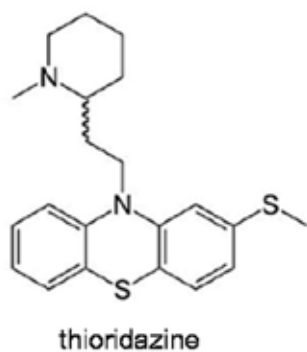


Figure 6. Chemical structure of thioridazine

6. Benzothiazinones

ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของเชื้อ โดยพบว่าตำแหน่งที่ยาออกฤทธิ์อยู่ที่ DprE1 subunit ของเอนไซม์ decaprenylphosphoryl- β -o-ribose 2'-epimerase ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่ใช้ในการสังเคราะห์ผนังเซลล์² มีโครงสร้างทางเคมีดังแสดงในรูปที่ 7

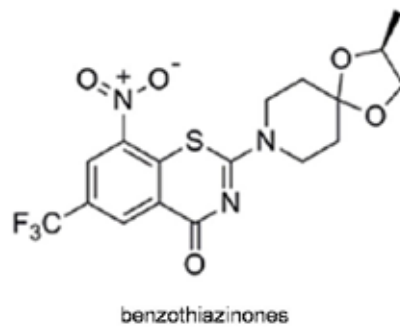


Figure 7. Chemical structure of benzothiazinones

นอกจากนี้ยังมียาชนิดใหม่ที่มีการค้นพบ มีกลไกในการทำลายเชื้อที่แตกต่างจากยารักษาวัณโรคเดิมที่สามารถนำมาใช้ในการรักษาผู้ติดเชื้อวัณโรคได้ ได้แก่ ยา bedaquiline หรือ delamanid ซึ่งมีการเพิ่มในสูตรยาที่ใช้รักษา MDR-TB โดยพบว่าสามารถเพิ่มระยะเวลาของ sputum-culture conversion ในสัปดาห์ที่ 8 ของการรักษา^{45, 51} ปัจจุบันยังอยู่ในขั้นตอนของ clinical trial และจะมีแนวโน้มนำมาใช้ในการรักษาวัณโรคได้จริง

การป้องกัน

การลดอุบัติการณ์ของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ XDR-TB เป็นเป้าหมายของการป้องกันการติดเชื้อ XDR-TB แพทย์ควรให้คำแนะนำในการรับประทายยาแก่ผู้ป่วย โดยให้กินยาอย่างสม่ำเสมอ และให้ผู้ป่วยเข้ารับการรักษอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้หายขาดจากโรค ลดการแพร่กระจายเชื้อไปยังบุคคลอื่น นอกจากนั้นควรใช้ยาที่มีประสิทธิภาพ โดยใช้สูตรยาตามท้องที่การอนามัยโลกได้แนะนำให้ใช้ในการรักษา XDR-TB และรักษาตามที่แพทย์เห็นสมควร สำหรับการตรวจวินิจฉัยควรมีความรวดเร็ว ถูกต้อง และมีประสิทธิภาพ เนื่องจากการวินิจฉัยได้เร็วมีประโยชน์ในการเลือกใช้ยาที่เหมาะสมแก่ผู้ติดเชื้อ บุคลากรในห้องปฏิบัติการควรได้รับการอบรมเกี่ยวกับการเก็บส่งตรวจ และวิธีปฏิบัติงานกับเชื้อ mycobacteria เมื่อต้องปฏิบัติงานเกี่ยวกับเชื้อควรทำใน biological safety cabinets (BSC) ระดับ 3 โดยใส่อุปกรณ์ป้องกันตัวเอง เช่น เสื้อกาวน์ ถุงมือ และหน้ากากทุกครั้งในการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการหรือภายในโรงพยาบาล ควรมีเครื่องกรองอากาศ (air filtration) หรือ หลอดยูวี (ultraviolet germicidal radiation) เพื่อทำลายเชื้อที่อาจอยู่ในอากาศ^{52, 53} สำหรับการจัดการกับสิ่งส่งตรวจที่มีเชื้อ ควรทิ้งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อทำลายเชื้อก่อนนำออกนอกห้องปฏิบัติการ หากเป็นของเหลวควรทิ้งใน 5% phenol เป็นเวลาหนึ่งชั่วโมง แล้วทิ้งลงในถังขยะที่จัดแยกไว้ นอกจากนั้นการป้องกันตัวเองจากเชื้อ

เป็นสิ่งที่สำคัญ โดยหลีกเลี่ยงการอยู่ในที่ที่มีผู้ติดเชื้อ บริเวณที่คนอยู่กันหนาแน่น หรือถ้าจำเป็นควรใส่ผ้าปิดจมูกเพื่อเป็นการป้องกัน

สรุป

XDR-TB เป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุข โดยมีอัตราการติดเชื้อ และอัตราการเสียชีวิตสูง เนื่องจากเชื้อดื้อยาที่ใช้รักษาวินโรค ทำให้ผู้ติดเชื้อสามารถแพร่กระจายเชื้อไปยังบุคคลอื่น สาเหตุส่วนใหญ่ที่ทำให้เชื้อดื้อยาเกิดจากการกลายพันธุ์ในบริเวณยีนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของยา ในปัจจุบันยังมีเครื่องมือไม่เพียงพอ และไม่เหมาะสมในการวินิจฉัยเชื้อดื้อยา ยิ่งไปกว่านั้นการรักษา XDR-TB ถูกจำกัดเนื่องจากเชื้อดื้อยาที่ใช้รักษาวินโรคเกือบทุกชนิด ดังนั้นจึงต้องการการตรวจวินิจฉัยที่มีความรวดเร็ว ถูกต้อง มีขั้นตอนไม่ซับซ้อน ราคาถูก และมีประสิทธิภาพ เพื่อใช้รักษาผู้ติดเชื้อ และเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อ วิธีตรวจวินิจฉัย XDR-TB ที่มีในปัจจุบัน ได้แก่ automated liquid-culture system, line-probe hybridization assay และ MODS assay เป็นต้น และมีการพัฒนาการวินิจฉัยวินโรค โดยการหา biomarker ที่ใช้แยกระหว่าง active tuberculosis และ latent tuberculosis นอกจากนั้นยังมี marker ที่ใช้บอกเกี่ยวกับการดื้อยาของเชื้อ ได้แก่ Rv0560c และ Rv0559c ซึ่งใช้เป็น marker เกี่ยวกับการดื้อยา rifampicin ของเชื้อ mycobacteria⁵⁴ และ

มีการคิดค้นพัฒนายาชนิดใหม่ ได้แก่ ยาในกลุ่ม nitroimidazole ได้แก่ PA-824, delamanid (OPC-67683), SQ109, bedaquiline (TMC207), NAS-21, NAS-91, phenothiazines และ benzothiazinones เพื่อใช้รักษาผู้ป่วยที่ไม่สามารถใช้ยารักษาวินโรคเดิมรักษาได้ หรือใช้ยาใหม่ร่วมกับยาสูตรเดิม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา สำหรับห้องปฏิบัติการควรเตรียมเครื่องมือให้พร้อม และเพียงพอต่อการทำการทดสอบความไวต่อยา และควรมี biosafety ระดับ 3 เพื่อป้องกันอันตรายจากการปฏิบัติงานบุคลากรในห้องปฏิบัติการควรได้รับการอบรมเกี่ยวกับการปฏิบัติงานต่อเชื้อ *M. tuberculosis* และในอนาคตเมื่อเข้าสู่สมาคมอาเซียน จะมีการเคลื่อนย้ายของประชากรจากประเทศเพื่อนบ้านเข้ามาในประเทศไทย ดังนั้นจึงควรมีการตรวจคัดกรองเชื้อวินโรคของบุคคลที่จะเข้ามาในประเทศ โดยบุคคลที่เข้ามาควรมีเอกสารทางการแพทย์รับรอง เพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อ นอกจากนั้นภายในประเทศควรมีการเฝ้าระวังการเกิดเชื้อดื้อยาภายในประเทศ ไม่ให้มีแนวโน้มที่สูงขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโครงการวิจัยพัฒนาและวิศวกรรมทุนสนับสนุนจาก สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีกลุ่มวิจัยวินโรคแขนงจุลชีววิทยาคลินิกภาควิชาเทคนิคการแพทยมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และ ผศ.ดร.สุชาติ ปันจยสีห์ ที่ให้คำปรึกษา ช้แนะในการศึกษาเชื้อวินโรคดื้อยาเป็นอย่างสูง

เอกสารอ้างอิง

1. da Silva PE, Von Groll A, Martin A, Palomino JC. Efflux as a mechanism for drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. FEMS Immunol Med Microbiol 2011; 63(1): 1-9.
2. Almeida Da Silva PE, Palomino JC. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: classical and new drugs. J Antimicrob Chemother 2011; 66(7): 1417-30.
3. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2014 2014: [cited 2014 Nov 12]. Available from: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/
4. Gunther G. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a review of current concepts and future challenges. Clin Med 2014; 14(13): 279-85.
5. World Health Organization. Definitions and Reporting Framework for Tuberculosis – 2013 revision.2014 [cited 2014 Oct 24]. Available from: <http://www.who.int/tb/publications/definitions/en/>
6. Banerjee R, Schechter GF, Flood J, Porco TC. Extensively drug-resistant tuberculosis: new strains, new challenges. Expert Rev Anti Infect Ther 2008; 6(5): 713-24.

7. Jassal M, Bishai WR. Extensively drug-resistant tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 2009; 9(1): 19-30.
8. Kolyva AS, Karakousis PC. Old and New TB Drugs: Mechanisms of Action and Resistance: InTech; 2012. Available from: <http://www.intechopen.com/books/understanding-tuberculosis-new-approaches-to-fighting-against-drug-resistance/old-and-new-tb-drugs-mechanisms-of-action-and-resistance>
9. Frieden TR, Sterling T, Pablos-Mendez A, Kilburn JO, Cauthen GM, Dooley SW. The emergence of drug-resistant tuberculosis in New York City. *N Engl J Med* 1993; 328(8): 521-6.
10. Frieden TR, Woodley CL, Crawford JT, Lew D, Dooley SM. The molecular epidemiology of tuberculosis in New York City: the importance of nosocomial transmission and laboratory error. *Tuber Lung Dis* 1996; 77(5): 407-13.
11. Davies GR, Pillay M, Sturm AW, Wilkinson D. Emergence of multidrug-resistant tuberculosis in a community-based directly observed treatment programme in rural South Africa. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 3(9): 799-804.
12. Pillay M, Sturm AW. Evolution of the extensively drug-resistant F15/LAM4/KZN strain of *Mycobacterium tuberculosis* in KwaZulu-Natal, South Africa. *Clin Infect Dis* 2007; 45(11): 1409-14.
13. Gandhi NR, Moll A, Sturm AW, Pawinski R, Govender T, Lalloo U, et al. Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. *Lancet* 2006; 368(9547): 1575-80.
14. Motiwala AS, Dai Y, Jones-Lopez EC, Hwang SH, Lee JS, Cho SN, et al. Mutations in extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* that do not code for known drug-resistance mechanisms. *J Infect Dis* 2010; 201(6): 881-8.
15. Timmins GS, Deretic V. Mechanisms of action of isoniazid. *Mol Microbiol* 2006; 62(5): 1220-7.
16. Somoskovi A, Parsons LM, Salfinger M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir Res* 2001; 2(3): 164-8.
17. Guo H, Seet Q, Denkin S, Parsons L, Zhang Y. Molecular characterization of isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from the USA. *J Med Microbiol* 2006; 55(Pt11): 1527-31.
18. Hazbon MH, Brimacombe M, Bobadilla del Valle M, Cavatore M, Guerrero MI, Varma-Basil M, et al. Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(8): 2640-9.
19. Wehrli W. Rifampin: mechanisms of action and resistance. *Rev Infect Dis* 1983; 5 Suppl 3: S407-11.
20. World Health Organization. Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis 2011 update. 2011 [cited 2014 Oct 24]. Available from: http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501583_eng.pdf.
21. Drlica K, Malik M. Fluoroquinolones: action and resistance. *Curr Top Med Chem* 2003;3(3):249-82.
22. Aubry A, Pan XS, Fisher LM, Jarlier V, Cambau E. *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase: interaction with quinolones and correlation with antimycobacterial drug activity. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(4): 1281-8.
23. Drlica K. Mechanism of fluoroquinolone action. *Curr Opin Microbiol* 1999; 2(5): 504-8.

24. Takiff HE, Salazar L, Guerrero C, Philipp W, Huang WM, Kreiswirth B, et al. Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis* *gyrA* and *gyrB* genes and detection of quinolone resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38(4): 773-80.
25. Ginsburg AS, Grosset JH, Bishai WR. Fluoroquinolones, tuberculosis, and resistance. *Lancet Infect Dis* 2003; 3(7): 432-42.
26. Aubry A, Veziris N, Cambau E, Truffot-Pernot C, Jarlier V, Fisher LM. Novel gyrase mutations in quinolone-resistant and -hypersusceptible clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*: functional analysis of mutant enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(1): 104-12.
27. Wade MM, Zhang Y. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Biosci* 2004; 9: 975-94.
28. Jugheli L, Bzekalava N, de Rijk P, Fissette K, Portaels F, Rigouts L. High level of cross-resistance between kanamycin, amikacin, and capreomycin among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Georgia and a close relation with mutations in the *rrs* gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(12): 5064-8.
29. Johansen SK, Maus CE, Plikaytis BB, Douthwaite S. Capreomycin binds across the ribosomal subunit interface using tlyA-encoded 2'-O-methylations in 16S and 23S rRNAs. *Mol Cell* 2006; 23(2): 173-82.
30. World Health Organization Policy Guidance on Drug-Susceptibility Testing (DST) of Second-Line Antituberculosis Drugs. 2008 [cited 2014 Oct 24]. Available from: http://www.who.int/tb/publications/2008/whohtmtb_2008_392/en/
31. O'Grady J, Maeurer M, Mwaba P, Kapata N, Bates M, Hoelscher M, et al. New and improved diagnostics for detection of drug-resistant pulmonary tuberculosis. *Curr Opin Pulm Med* 2011; 17(3): 134-41.
32. Dheda K, Ruhwald M, Theron G, Peter J, Yam WC. Point-of-care diagnosis of tuberculosis: past, present and future. *Respirology* 2013; 18(2): 217-32.
33. Nunn P, Williams B, Floyd K, Dye C, Elzinga G, Raviglione M. Tuberculosis control in the era of HIV. *Nat Rev Immunol* 2005; 5(10): 819-26.
34. Dhingra VK, Rajpal S, Mittal A, Hanif M. Outcome of multi-drug resistant tuberculosis cases treated by individualized regimens at a tertiary level clinic. *Indian J Tuberc* 2008; 55(1): 15-21.
35. Mukherjee JS, Rich ML, Succi AR, Joseph JK, Viru FA, Shin SS, et al. Programmes and principles in treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Lancet* 2004; 363(9407): 474-81.
36. Zumla A, Raviglione M, Hafner R, von Reyn CF. Tuberculosis. *N Engl J Med* 2013; 368(8): 745-55.
37. Lange C, Abubakar I, Alffenaar JW, Bothamley G, Caminero JA, Carvalho AC, et al. Management of patients with multidrug-resistant/extensively drug-resistant tuberculosis in Europe: a TBNET consensus statement. *Eur Respir J* 2014; 44(1): 23-63.
38. Stover CK, Warren P, VanDevanter DR, Sherman DR, Arain TM, Langhorne MH, et al. A small-molecule nitroimidazopyran drug candidate for the treatment of tuberculosis. *Nature* 2000; 405(6789): 962-6.
39. Rivers EC, Mancera RL. New anti-tuberculosis drugs in clinical trials with novel mechanisms of action. *Drug Discov Today* 2008; 13(23-24): 1090-8.
40. Singh R, Manjunatha U, Boshoff HI, Ha YH, Niyomrattanakit P, Ledwidge R, et al. PA-824 kills nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis* by intracellular NO release. *Science* 2008; 322(5906): 1392-5.

41. Matsumoto M, Hashizume H, Tomishige T, Kawasaki M, Tsubouchi H, Sasaki H, et al. OPC-67683, a nitro-dihydro-imidazo[4,5-c]quinoxaline derivative with promising action against tuberculosis in vitro and in mice. *PLoS Med* 2006; 3(11): e466.
42. Matteelli A, Roggi A, Carvalho AC. Extensively drug-resistant tuberculosis: epidemiology and management. *Clin Epidemiol* 2014; 6: 111-8.
43. Andries K, Verhasselt P, Guillemont J, Gohlmann HW, Neefs JM, Winkler H, et al. A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 2005; 307(5707): 223-7.
44. Koul A, Dendouga N, Vergauwen K, Molenberghs B, Vranckx L, Willebrords R, et al. Diarylquinolines target subunit c of mycobacterial ATP synthase. *Nat Chem Biol* 2007; 3(6): 323-4.
45. Diacon AH, Pym A, Grobusch M, Patientia R, Rustomjee R, Page-Shipp L, et al. The diarylquinoline TMC207 for multidrug-resistant tuberculosis. *N Engl J Med* 2009; 360: 2397-405.
46. Gratraud P, Surolia N, Besra GS, Surolia A, Kremer L. Antimycobacterial Activity and Mechanism of Action of NAS-91. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(3): 1162-6.
47. Bhowruth V, Brown AK, Besra GS. Synthesis and biological evaluation of NAS-21 and NAS-91 analogues as potential inhibitors of the mycobacterial FAS-II dehydratase enzyme Rv0636. *Microbiology* 2008; 154(Pt 7): 1866-75.
48. Zhang Y. The magic bullets and tuberculosis drug targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45: 529-64.
49. Ordway D, Viveiros M, Leandro C, Bettencourt R, Almeida J, Martins M, et al. Clinical concentrations of thioamides kill intracellular multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(3): 917-22.
50. Martins M, Dastidar SG, Fanning S, Kristiansen JE, Molnar J, Pages JM, et al. Potential role of non-antibiotics (helper compounds) in the treatment of multidrug-resistant Gram-negative infections: mechanisms for their direct and indirect activities. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 31(3): 198-208.
51. Gler MT, Skripconoka V, Sanchez-Garavito E, Xiao H, Cabrera-Rivero JL, Vargas-Vasquez DE, et al. Delamanid for multidrug-resistant pulmonary tuberculosis. *N Engl J Med* 2012; 366: 2151-60.
52. Porco TC, Getz WM. Controlling extensively drug-resistant tuberculosis. *Lancet* 2007; 370(9597): 1464-5.
53. Stroud LA, Tokars JI, Grieco MH, Crawford JT, Culver DH, Edlin BR, et al. Evaluation of infection control measures in preventing the nosocomial transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in a New York City hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1995; 16(3): 141-7.
54. de Knecht GJ, Bruning O, ten Kate MT, de Jong M, van Belkum A, Endtz HP, et al. Rifampicin-induced transcriptome response in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 2013; 93(1): 96-101.

อุบัติการณ์ของภาวะพร่องเอนไซม์ Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) โดยวิธี methemoglobin reduction test ในผู้บริจาคโลหิต จังหวัดเชียงใหม่

Prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency (G-6-PD) using methemoglobin reduction test in blood donors of Chiang Mai Province

■ พูนทรัพย์ ผลาจรศักดิ์^{1*} เฟ้าพันธ์ ศรีวังพล²
Poonsub Palacajornsuk^{1*} Phaophan Sriwangpon²

¹ แผนกวิชาวิทยาศาสตร์การบริการโลหิต ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

¹ Division of Transfusion Sciences, Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University

² กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลอุดรธานี จังหวัดอุดรธานี

² Clinical Pathology, Udon Thani Hospital, Udon Thani 41000, Thailand

* Corresponding author (E-mail: poonsub@yahoo.com)

Received December 2014

Accepted as revised January 2015

Abstract

Introduction: Glucose-6-phosphate dehydrogenase is an enzyme that protects RBCs from oxidative damage by free radicals in food, drug, chemical or infectious conditions. If blood from donors with G-6-PD deficiency is transfused to patients, it can cause hemolysis, especially in exchange transfusion for neonate.

Objective: To study the prevalence of G-6-PD deficiency in blood donors of Chiang Mai Province using methemoglobin reduction test.

Materials and methods: One thousand and seventeen EDTA blood samples obtained from blood donors at Regional Blood Center X Chiang Mai, Thai Red Cross Society were subjected to screen of G-6-PD deficiency using methemoglobin reduction test.

Results: Nine hundred and ten samples (89.5%) were found to have normal G-6-PD activity. Thirty three samples (3.2%) were partially deficient and 74 samples (7.3%) were completely deficient for G-6-PD enzyme. The prevalence of G-6-PD deficiency in blood donors was estimated to be 10.5%, with males being 6.4% and females being 4.1%.

Conclusions: Prevalence of G-6-PD deficiency in blood donors of Chiang Mai Province is considerably high. Thus, screening for G-6-PD deficiency among blood donors in this area and other areas with high prevalence is recommended in order to suggest the donation of blood components instead of red blood cells.

Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2015; 48(1): 29-33. Doi: 10.14456/jams.2015.4

Keywords: G-6-PD deficiency, methemoglobin reduction test, blood donors

บทคัดย่อ

บทนำ: Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) เป็นเอนไซม์ที่ช่วยป้องกันเม็ดเลือดแดงจากการทำลายของสารอนุมูลอิสระจากอาหาร ยา สารเคมี หรือการติดเชื้อ หากนำเลือดของผู้บริจาคโลหิตที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD ให้ผู้ป่วย จะเกิดภาวะเม็ดเลือดแดงแตกหลังจากผู้ป่วยได้รับเลือดได้โดยเฉพาะการให้เลือดแก่ทารกแรกคลอด

วัตถุประสงค์: เพื่อหาอุบัติการณ์ของภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD โดยวิธี methemoglobin reduction test (MRT) ในผู้บริจาคโลหิต ณ ภาคบริการโลหิตแห่งชาติที่ 10 จ. เชียงใหม่ สภาากาชาดไทย

วัสดุและวิธีการ: นำตัวอย่างเลือดของผู้บริจาคโลหิตที่เก็บในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็ง EDTA จำนวน 1,017 ราย มาตรวจกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD โดยวิธี MRT

ผลการทดลอง: พบผู้ที่ไม่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD จำนวน 910 ราย (89.5%) ผู้ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD แบบ partial deficiency จำนวน 33 ราย (3.2%) และแบบ deficiency จำนวน 74 ราย (7.3%) ความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD ในผู้บริจาคโลหิตพบ 10.5% เป็นเพศชาย 6.4% และเพศหญิง 4.1%

สรุปผลการทดลอง: ความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD ค่อนข้างสูงในการรับบริจาคโลหิตจังหวัดเชียงใหม่ ดังนั้นควรมีการตรวจกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD ในผู้บริจาคโลหิตในพื้นที่นี้และในพื้นที่ที่มีอุบัติการณ์สูง เพื่อแนะนำให้ผู้บริจาคโลหิตที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD บริจาคเป็นส่วนประกอบของเลือดอื่นแทนการบริจาคเม็ดเลือดแดง

วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2558; 48(1): 29-33. Doi: 10.14456/jams.2015.4

คำรหัส: ภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD, methemoglobin reduction test, ผู้บริจาคโลหิต

บทนำ

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งในร่างกายที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมตาบอลิซึม ในวิถี pentose phosphate pathway ของน้ำตาลกลูโคส มีส่วนสำคัญช่วยป้องกันภาวะ oxidative stress ในเม็ดเลือดแดง เมื่อมีภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD จะทำให้กระบวนการต่อต้านออกซิเดชันบกพร่อง ทำให้เกิด oxidative stress ต่อ เม็ดเลือดแดง โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากเม็ดเลือดแดงได้รับสาร oxidant บางอย่าง หรือเมื่อผู้ป่วยมีภาวะต่างๆ เช่น ทารกแรกเกิด โรคเบาหวาน ภาวะเลือดเป็นกรด ภายหลังการติดเชื้อได้รับยา หรือรับประทานอาหารบางชนิด ทำให้เกิดภาวะเม็ดเลือดแดงแตกอย่างรวดเร็ว¹⁻⁴ หากอาการรุนแรงอาจทำให้เกิดภาวะโลหิตจางได้ ในระยะที่เริ่มมีการแตกของเม็ดเลือดแดงจะมีอาการไข้ อ่อนเพลีย หนาวสั่น ตัวเหลือง และซีดได้ รวมทั้งอาจพบปัสสาวะสีเข้มคล้ายสีน้ำปลา ภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD เป็นความผิดปกติที่มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบ X-link recessive ซึ่งมีอุบัติการณ์สูง และพบได้ทั่วโลกปัจจุบันในประชากรทั่วโลกพบภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD จำนวนมากกว่า 400 ล้านคน

อุบัติการณ์ของแต่ละพื้นที่ที่มากน้อยแตกต่างกันขึ้นอยู่กับพื้นที่การศึกษา พบได้ในทุกเพศและทุกวัย มักพบในเพศชายได้มากกว่าเพศหญิง⁴⁻⁶ สำหรับประเทศไทยมีรายงานพบภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD ประมาณ 10-20% พบในเพศชายประมาณ 11% และเพศหญิงประมาณ 6%⁷ แต่ยังไม่มีการตรวจกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD ในผู้บริจาคโลหิตมีเพียงแต่ใช้แบบสอบถามให้ผู้บริจาคโลหิตตอบข้อมูลคำถามเกี่ยวกับโรคประจำตัวในการคัดกรองผู้บริจาคโลหิตเท่านั้น ซึ่งผู้บริจาคโลหิตส่วนใหญ่ไม่ทราบว่าตนเองมีภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD เนื่องจากไม่ได้แสดงอาการผิดปกติใดๆ เกี่ยวกับการมีภาวะเม็ดเลือดแดงแตก หรือมีอาการไม่เด่นชัดที่บ่งชี้ว่ามีภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD ผู้บริจาคโลหิตที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD หากไม่มีสิ่งเร้าที่กระตุ้นให้เม็ดเลือดแดงแตกก็สามารถบริจาคเลือดได้ตามปกติ ในต่างประเทศได้มีรายงานผลการเปรียบเทียบการนำเลือดของผู้บริจาคโลหิตที่ไม่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD และเลือดของผู้บริจาคโลหิตที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD ไปให้แก่ผู้ป่วยกลุ่มต่างๆ พบว่าเลือดของผู้บริจาคโลหิตที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD

มีผลทำให้ผู้ป่วยที่ได้รับเลือดเกิดภาวะเม็ดเลือดแดงแตกโดยเฉพาะในผู้ป่วยเด็กทารกแรกคลอด และแนะนำว่าหากเป็นไปได้ในพื้นที่ที่มีอุบัติการณ์ของภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD สูงควรมีการตรวจภาวะพร่องเอนไซม์ในผู้บริจาคโลหิต เพื่อที่จะได้คัดเลือกเลือดที่มีคุณภาพและช่วยลดปัญหาการเกิดภาวะเม็ดเลือดแดงแตกหลังจากได้รับเลือดได้^{4, 8-11}

วัตถุประสงค์

เพื่อหาอุบัติการณ์ของภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD โดยวิธี methemoglobin reduction test ในผู้บริจาคโลหิต ณ ภาคบริการโลหิตแห่งชาติที่ 10 จ. เชียงใหม่ สภาการขาดไทย

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างเลือด

ตัวอย่างเลือดของผู้บริจาคโลหิต เก็บในสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA ที่เหลือจากการตรวจ nucleic acid testing เก็บไว้ไม่เกิน 1 วันหลังจากวันเจาะบริจาค ซึ่งมีการเก็บตัวอย่างแบบสุ่ม ณ ภาคบริการโลหิตแห่งชาติที่ 10 จังหวัดเชียงใหม่ ระหว่างเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2554 ถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2555 จำนวน 1,017 ราย เป็นเพศชาย 641 ราย และเพศหญิง 376 ราย เจ้าหน้าที่ของภาคบริการโลหิตฯ จะเก็บตัวอย่างเลือดไว้ในตู้เย็นเก็บเลือดอุณหภูมิ 4°C สำหรับการขนส่งตัวอย่างเลือดจากภาคบริการโลหิตแห่งชาติที่ 10มายังคณะเทคนิคการแพทย์ บรรจุในกล่องโฟมอุณหภูมิ 4°C และตรวจภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD โดยวิธี methemoglobin reduction test ทันทีในวันที่ได้รับตัวอย่างเลือด งานวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ของคณะเทคนิคการแพทย์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตามเอกสารเลขที่ 030E/54

การตรวจกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD โดยวิธี methemoglobin reduction test

ในการตรวจกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD แต่ละครั้งต้องนำเลือดคนปกติที่ไม่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD และเลือดของคนที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD แบบ partial deficiency และ deficiency มาตรวจร่วมกับเลือดของผู้บริจาคโลหิตทุกครั้ง นอกจากนี้เลือดของผู้บริจาคโลหิตแต่ละรายจะทำการตรวจ 4 หลอด คือหลอด deficiency control และ normal control หลอดละ 1 หลอด และ test 2 หลอด ตามลำดับ โดยมีวิธีการ คือ นำ whole blood ของผู้บริจาคโลหิต ปริมาตร 200 μ L ลงในหลอดทั้ง 4 หลอด จากนั้นเติม glucose/ NaNO_2 ปริมาตร 10 μ L ลงในหลอด deficiency control และหลอด test แล้วเติม methylene blue

ปริมาตร 10 μ L ลงในหลอด normal control และหลอด test ผสมให้เข้ากัน และทุกหลอดนำไปอุ่นที่ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติมน้ำปริมาตร 5 mL ลงในทุกหลอด และผสมให้เข้ากัน อ่านผลและแปลผล โดยเทียบกับหลอด deficiency control และ normal control ดังรูปที่ 1

(A) Normal (B) Partial deficiency (C) Deficiency



Figure 1. Interpretation of G-6-PD using methemoglobin reduction test. Tube No. 1 = Deficiency control, Tube No. 2 = Normal control, Tube No. 3 and 4 = Test (duplicate)

หากหลอด test เป็นสีแดงเหมือนหลอด normal control แสดงว่ามี G-6-PD ปกติ รายงานผลว่า normal หากหลอด test เป็นสีแดงคล้ำระหว่างหลอด normal control และหลอด deficiency control แสดงว่ามีภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD รายงานผลว่า partial deficiency และหากหลอด test เป็นสีน้ำตาลเหมือนหลอด deficiency control แสดงว่ามีภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD รายงานผลว่า deficiency

ผลการทดลอง

ผลการตรวจกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD โดยวิธี methemoglobin reduction test ของผู้บริจาคโลหิต ณ ภาคบริการโลหิตแห่งชาติที่ 10 จ. เชียงใหม่ สภาการขาดไทย จำนวน 1,017 ราย ซึ่งมีการเก็บตัวอย่างแบบสุ่ม พบว่าเป็นเพศชาย 641 ราย และเพศหญิง 376 ราย พบผู้ที่ไม่มีความพร่องเอนไซม์ G-6-PD 910 ราย (89.5%), พบผู้ที่มีความพร่องเอนไซม์ G-6-PD แบบ partial deficiency 33 ราย (3.2%) และแบบ deficiency 74 ราย (7.3%) อุบัติการณ์ของภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD ในผู้บริจาคโลหิตพบ 10.5% ซึ่งเป็นเพศชาย 6.4% และเพศหญิง 4.1% ดังตารางที่ 1

Table 1. Results of G-6-PD using methemoglobin reduction test in blood donors at Regional Blood Center X Chiang Mai, Thai Red Cross Society

Results	No. of samples (%)		
	Male	Female	Total
Normal	575 (89.7)	335 (89.1)	910 (89.5)
Partial deficiency	6 (0.9)	27 (7.2)	33 (3.2)
Deficiency	59 (10.1)	15 (4.0)	74 (7.3)
Total	641 (100)	376 (100)	1,017 (100)

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

จากงานวิจัยนี้ทำให้ทราบถึงอุบัติการณ์ของภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD โดยวิธี methemoglobin reduction test ในผู้บริจาคโลหิต ณ ภาคบริการโลหิตแห่งชาติที่ 10 จ. เชียงใหม่ สภากาชาดไทย พบ 10.5% ในเพศชาย (6.4%) มากกว่าเพศหญิง (4.1%) ซึ่งในประเทศไทยยังไม่มี การตรวจกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD ในผู้บริจาคโลหิต มีเพียงแต่ใช้แบบสอบถามให้ผู้บริจาคโลหิตตอบข้อมูลคำถามเกี่ยวกับโรคประจำตัวในการคัดกรองผู้บริจาคโลหิตเท่านั้น ซึ่งผู้บริจาคโลหิตส่วนใหญ่ไม่ทราบว่าตนเองมีภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD เนื่องจากไม่ได้แสดงอาการผิดปกติใดๆ เกี่ยวกับการมีภาวะเม็ดเลือดแดงแตก หรือมีอาการไม่เด่นชัดที่จะบ่งชี้ว่ามีภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD นอกจากมีสิ่งไปกระตุ้น เช่น อาหาร ยา สารเคมี หรือการติดเชื้อบางอย่าง เป็นต้น¹⁻⁴ ดังนั้นผู้บริจาคโลหิตที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD หากไม่มีสิ่งเร้ากระตุ้นให้เม็ดเลือดแดงแตกก็สามารถ

บริจาคเลือดได้ตามปกติ ปัจจุบันในประเทศไทยยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการนำเลือดของผู้บริจาคโลหิตที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD ไปให้แก่ผู้ป่วยแล้วมีภาวะเม็ดเลือดแดงแตกหลังจากได้รับเลือด แต่ในต่างประเทศได้มีรายงานผลการเปรียบเทียบการนำเลือดของผู้บริจาคโลหิตไม่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD และเลือดของผู้บริจาคโลหิตที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD ไปให้แก่ผู้ป่วยกลุ่มต่างๆ พบว่าเลือดของผู้บริจาคโลหิตที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD มีผลทำให้ผู้ป่วยที่ได้รับเลือดเกิดภาวะเม็ดเลือดแดงแตกโดยเฉพาะในกลุ่มของผู้ป่วยที่เป็นเด็กทารกแรกคลอด^{4,8-11} ดังนั้นในการรับบริจาคโลหิตควรมีการตรวจกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD ในผู้บริจาคโลหิตในพื้นที่ที่มีอุบัติการณ์สูง และแจ้งให้ผู้บริจาคโลหิตทราบถึงผลของการตรวจกรอง เพื่อดูแลสุขภาพของตนเอง นอกจากนี้ควรอธิบายให้ทราบถึงผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นหลังจากผู้ป่วยได้รับเลือดให้ผู้บริจาคโลหิตทราบ นอกจากนี้ไม่ควรนำเม็ดเลือดแดงของผู้บริจาคโลหิตที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD ไปให้แก่ผู้ป่วย ซึ่งจะสามารถช่วยลดการเกิดภาวะเม็ดเลือดแดงแตกหลังจากผู้ป่วยได้รับเลือดได้ รวมถึงหากผู้บริจาคโลหิตยังคงต้องการบริจาคเลือดต่อไปต้องแนะนำให้งดการบริจาคส่วนประกอบของเลือดที่เป็นเม็ดเลือดแดง แต่สามารถบริจาคเป็นส่วนประกอบของเลือดอื่นๆ ได้ เช่น พลาสมา หรือเกล็ดเลือด เพื่อลดความเสี่ยงของการเกิดภาวะเม็ดเลือดแดงแตกหลังจากผู้ป่วยได้รับเลือดต่อไป¹¹⁻¹⁴

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาคบริการโลหิตแห่งชาติที่ 10 จ. เชียงใหม่ สภากาชาดไทย ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างเลือดเพื่อนำมาวิจัย

References

1. Beutler E. G6PD deficiency. *Blood* 1994; 84: 3613-36.
2. Frank JE. Diagnosis and management of G6PD deficiency. *Am Fam Physician*. 2005; 72: 1277-82.
3. Cappellini MD, Fiorelli G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet*. 2008; 371: 64-74.
4. Francis RO, Jhang JS, Pham HP, Hod EA, Zimring JC, Spitalnik SL. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in transfusion medicine: the unknown risks. *Vox Sang*. 2013; 105: 271-82.
5. Di Domenico G, Mottola M, Caldora M, Bevilacqua P, Meluccio E, Nocera C, et al. Characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency (FAVISM) in a population of blood donors in Maples, Italy. *Vox Sang*. 2010; 48: 154-65.
6. Nkhoma ET, Poole C, Vannappagari V, Hall SA, Beutler E. The global prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a systematic review and meta-analysis. *Blood Cells Mol Dis*. 2009; 42: 267-78.
7. Nuchprayoon I, Sanpavat S, Nuchprayoon S. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations in Thailand: G6PD Viangchan (871G>A) is the most common deficiency variant in the Thai population. *Hum Mutat*. 2002; 19: 185.
8. Shalev O, Manny N, Sharon R. Post-transfusional hemolysis in recipients of glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient erythrocytes. *Vox Sang* 1993; 64: 94-8.
9. Kumar P, Sarkar S, Narang A. Acute intravascular haemolysis following exchange transfusion with G-6-PD deficient blood. *Eur J Pediatr*. 1994; 153: 98-9.
10. Samanta S, Kumar P, Kishore SS, Garewal G, Narang A. Donor blood glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency reduces the efficacy of exchange transfusion in neonatal hyperbilirubinemia. *Pediatrics*. 2009; 123: 96-100.
11. Renzaho AM, Husser E, Polonsky M. Should blood donors be routinely screened for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency? A systematic review of clinical studies focusing on patients transfused with glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient red cells. *Transfus Med Rev*. 2014; 28: 7-17.
12. Blood donation: Frequently asked questions. I Have G6PD Deficiency, Can I Still Donate Blood? [cited 2015 Jan 23]. Available from: <http://www.hsa.gov.sg/pub/faq/faq/faqcategory/blood-donation.aspx>.
13. Blood donor selection. [cited 2015 Jan 23]. Available from: http://www.who.int/blood_safety/publications/guide_selection_assessing_suitability.pdf.

การประเมินประสิทธิภาพของเครื่องวิเคราะห์ทางเคมีคลินิกอัตโนมัติ BA400 ของบริษัท Biosystems

Analytical performance evaluation of the Biosystems BA400 Clinical Chemistry Analyzer

■ ขนิษฐา ทานีฮิลล์^{1*} ปภัสสร ฐานุสา² สุวัณณิศา กิตติคุณธรรม¹
Khanittha Taneyhill^{1*} Papatsorn Thanosua² Suwatsin Kittikunnathum¹
สุรัชย์ อุดมสม³ นันทน์นภัส อินอ้าย¹ ณัฐฐิศา สีมา²
Suruk Udomsom³ Nannapas Inay¹ Natthita Seema²

¹แผนกวิชาเคมีคลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

¹Division of Clinical Chemistry, Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University

²แผนก Center of Excellence บริษัท อีฟอว์แอล เอ็ม จำกัด (มหาชน) กรุงเทพมหานคร

²Department of Center of Excellence, E For L Co. Ltd. (Public company), Bangkok

³สาขาวิชาวิศวกรรมชีวการแพทย์ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

³Division of Biomedical Engineering, Faculty of Engineering, Chiang Mai University

*Corresponding author (Email: kpunture@gmail.com)

Received December 2014

Accepted as revised January 2015

Abstract

Introduction: BA400 (Biosystems, Spain) is a new clinical chemistry analyzer for spectrophotometric, turbidimetric and ion-selective determination of biochemical analytes. Validation of method performance before routine operation is needed.

Objective: The objective of this study was to perform the analytical evaluation of BA400 analyzer.

Materials and methods: The evaluation was performed according to the guidelines of Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA). The evaluation included determination of within-run and between-run imprecision, linearity and method comparison with Cobas 6000 (Roche). The 39 test analytes including metabolites, enzymes, trace elements, proteins and electrolytes were evaluated.

Results: All analytes met the required specifications for imprecision except opiates, amphetamines and Phenytoin. The result showed acceptable inaccuracy for all analytes except cholinesterase, AST, microalbumin and valproic acid. The linearity was in acceptable ranges for all analytes.

Conclusions: BA400 analyzer has satisfactory accuracy, precision and linearity for majority of analytes. However, some analytes require more study and adjustment for routine operation.

Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2015; 48(1): 34-48. Doi: 10.14456/jams.2015.2

Keywords: BA400 analyzer, method validation, imprecision, inaccuracy, method comparison

บทนำ: เครื่อง BA400 ของบริษัท Biosystems เป็นเครื่องวิเคราะห์ทางเคมีคลินิกอัตโนมัติที่ผลิตออกมาใหม่ ซึ่งใช้หลักการวัดสี วัดความขุ่น รวมทั้งการวัดด้วยอิเล็กโทรดจำเพาะ การศึกษาครั้งนี้เป็นการตรวจสอบความใช้ได้ของเครื่องมือวิเคราะห์ก่อนนำไปใช้จริงในงานประจำวัน

วัตถุประสงค์: เพื่อประเมินประสิทธิภาพของเครื่องวิเคราะห์ทางเคมีคลินิกอัตโนมัติ BA400

วัสดุและวิธีการ: ประเมินประสิทธิภาพของเครื่อง BA400 ตามแนวทางของ Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA) การประเมินประกอบไปด้วยการทดสอบความเที่ยง โดยการทำ within-run และ between-run การประเมินความเป็นเส้นตรงและการประเมินความถูกต้องของผลการตรวจโดยเทียบกับเครื่อง Cobas 6000 (Roche) รายการตรวจวิเคราะห์มีทั้งการตรวจวัดเมตาโบไลต์ เอ็นไซม์ แร่ธาตุ โปรตีน และ อิเล็กโตรไลต์ จำนวน 39 รายการ ตัวอย่างที่วิเคราะห์มีทั้งซีรัม พลาสมาและปัสสาวะ

ผลการศึกษา: ผลการประเมินความเที่ยงพบว่าเครื่อง BA400 มีความเที่ยงและผ่านตามเกณฑ์ที่กำหนด มีเพียง 3 การทดสอบเท่านั้นที่ไม่ผ่านเกณฑ์ที่กำหนดคือ opiates, amphetamines และ phenytoin ผลการประเมินความถูกต้องพบว่ามีความถูกต้องดี ยกเว้น cholinesterase, AST, microalbumin และ valproic acid ที่ไม่ผ่านเกณฑ์ที่กำหนด และผลการประเมินความเป็นเส้นตรงของการทดสอบ พบว่าทุกการทดสอบมีค่าความเป็นเส้นตรงอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด

สรุปผลการศึกษา: เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ BA400 มีความเที่ยงและมีความถูกต้องเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการตรวจสารเคมีในเลือดในงานประจำวันได้ สำหรับรายการที่ไม่ผ่านเกณฑ์ที่กำหนด ควรมีการทดสอบเพิ่มเติมก่อนนำไปใช้งานจริง

วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2558; 48(1): 34-48. Doi: 10.14456/jams.2015.2

คำรหัส: เครื่องวิเคราะห์ทางเคมีคลินิกอัตโนมัติ BA400 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ ความไม่แม่นยำ ความไม่ถูกต้อง การเปรียบเทียบระหว่างวิธีทดสอบ

บทนำ

วิธีการทดสอบหรือเครื่องมือตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติในห้องปฏิบัติการชั้นสูงก่อนนำมาใช้งานจริง ต้องมีขั้นตอนการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีหรือเครื่องมือนั้นๆ เพื่อให้มั่นใจได้ว่าผลการตรวจวิเคราะห์ที่รายงานไปนั้นมีความถูกต้อง กระบวนการนี้เรียกว่า Method validation (MV) ซึ่งหมายถึงกระบวนการที่ทำเพื่อพิสูจน์ว่าเครื่องมือหรือวิธีที่เลือกใช้นั้น เป็นไปตามที่ต้องการและให้ผลตามที่กำหนดหรือตั้งไว้ สำหรับห้องปฏิบัติการชั้นสูงโดยทั่วไปเมื่อต้องมีการเลือกเครื่องมือตรวจวิเคราะห์ใหม่ปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงคือคุณสมบัติของเครื่องมือวิเคราะห์ในด้านคุณภาพของตัวเครื่องเทคโนโลยี และขนาดของเครื่องมือเมื่อเทียบกับปริมาณงาน งบประมาณ และบริการหลังการขาย นอกจากนี้คุณสมบัติของวิธีการที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ (performance characteristics) ของแต่ละรายการทดสอบก็เป็นสิ่งจำเป็นที่ห้องปฏิบัติการต้องคำนึงถึง

การทำ MV ตามกฎของ CLIA (Clinical Laboratory Improvement Amendment) นั้นแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

1. Waived Tests หมายถึงวิธีการทดสอบหรือวิธีการตรวจวิเคราะห์ทั้งหมดที่ห้องปฏิบัติการนำมาให้ก่อน วันที่ 24 เมษายน พ.ศ. 2546 ให้ดำเนินการตาม คำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต ไม่จำเป็นต้องทำ MV

2. Non-waived Tests Approved by FDA หมายถึงการทดสอบใดก็ตามที่ห้องปฏิบัติการนำมาใช้หลังวันที่ 24 เมษายน พ.ศ. 2546 และผ่านการรับรองจากองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration of America; FDA) แล้ว และจัดอยู่ในกลุ่ม unmodified FDA cleared or approved systems ให้ทำ MV โดยประกอบไปด้วย

2.1 Comparison of method เพื่อประเมินความถูกต้อง (accuracy)

2.2 Replication experiment เพื่อประเมินความเที่ยง (precision)

2.3 Linearity experiment เพื่อประเมินช่วงของผลการทดสอบ (reportable range)

2.4 Verification of reference range เพื่อประเมินหรือหาค่าอ้างอิงสำหรับกลุ่มประชากรที่ห้องปฏิบัติการนั้นให้บริการอยู่สำหรับขั้นตอนนี้หัวหน้าห้องปฏิบัติการอาจรับรองให้ใช้ค่าที่บริษัทผู้ผลิตกำหนดมาให้ หรือใช้ค่าที่กำหนดไว้ในตำรา หากเหมาะสมกับกลุ่มประชากรที่ให้บริการอยู่

3. Non-waived Tests Modified or Developed In-House หมายถึงการทดสอบใดก็ตามที่ห้องปฏิบัติการนำมาใช้หลังวันที่ 24 เมษายน พ.ศ. 2546 และเป็นรายการตรวจที่มีการประยุกต์วิธีการ หรือเป็นการทดสอบที่พัฒนาขึ้นใช้เองโดยห้องปฏิบัติการ การทำ MV ต้องประกอบไปด้วย

3.1 Comparison of method เพื่อ ประเมินความถูกต้อง

3.2 Replication of experiment เพื่อประเมินความเที่ยง

3.3 Linearity experiment เพื่อประเมินช่วงของผลการทดสอบ

3.4 Detection limit experiment เพื่อตรวจหาระดับต่ำสุดที่วิธีการทดสอบนั้นๆสามารถทำได้

3.5 Interference experiment เพื่อตรวจหาสิ่งรบกวนประเภท constant interferences

3.6 Recovery experiment เพื่อตรวจหาสิ่งรบกวนประเภท proportional interferences

3.7 Extensive reference เพื่อประมาณ reference range

สำหรับการทดสอบครั้งนี้อยู่ในกลุ่ม Non-waived tests approved by FDA การทำ MV จึงประกอบไปด้วยการทดสอบหาความถูกต้อง ความเที่ยง ช่วงความกว้างในการรายงานผล รวมทั้งตรวจสอบค่าอ้างอิงที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ให้บริการ¹⁻³ แม้ว่าในขั้นตอนการขอรับการรับรองจาก FDA นั้น บริษัทผู้ผลิตจะต้องส่งผลการประเมินเหล่านี้ให้กับ FDA แล้วก็ตาม แต่ผลการประเมินที่ดำเนินการโดยบริษัทผู้ผลิตและส่งให้กับ FDA นั้นเป็นการดำเนินการเพื่อการขอรับรองจาก FDA และแสดงคุณสมบัติของสินค้า ส่วนห้องปฏิบัติการต้องทำ MV อีกครั้งหนึ่ง และการประเมินนั้นทำไปเพื่อพิสูจน์ว่ารายการทดสอบหรือรายการตรวจที่นำมาให้บริการนั้น มีคุณสมบัติเป็นไปหรืออยู่ในกรอบผลการประเมินที่บริษัทผู้ผลิตดำเนินการและแสดงไว้กับ FDA จริงภายใต้ปัจจัยและสิ่งแวดล้อมของห้องปฏิบัติการนั้นๆ⁴⁻⁶

เครื่องตรวจวิเคราะห์สารเคมีในเลือดอัตโนมัติ รุ่น BA400 ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท BioSystems S.A. ประเทศสเปน เครื่องวิเคราะห์ดังกล่าวใช้หลักการวัดสี ความขุ่น รวมทั้งการวัดด้วยอิเล็กโทรดจำเพาะ มีความสามารถในการตรวจวิเคราะห์สารชีวเคมี และสารอิเล็กโทรไลต์ในตัวอย่าง ซีรัม พลาสมา ปัสสาวะ รวมทั้งสารน้ำในร่างกายมนุษย์ (body fluid) และมีการนำเทคโนโลยี Light-emitting diode (LED) มาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของเครื่องมือตรวจวิเคราะห์ทางด้านเคมีคลินิกให้ดียิ่งขึ้น เพื่อเป็นการสร้างความเชื่อมั่นในประสิทธิภาพของเครื่องมือและวิธีการวิเคราะห์ จึงมีความจำเป็นที่ต้องมีการประเมินประสิทธิภาพของเครื่องมือ ว่ามีคุณสมบัติเป็นไปตามที่บริษัทผู้ผลิตได้มีการรับรองคุณภาพ และประเมินประสิทธิภาพของวิธีการตรวจวิเคราะห์ เพื่อพิสูจน์ว่าวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่นั้นมีคุณสมบัติเป็นไปตามกฎเกณฑ์ขององค์การมาตรฐานกำหนด ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่อง BA400 โดยการทำการทดสอบซ้ำ (replication experiment) เพื่อประเมินความเที่ยง (precision) การเปรียบเทียบผลการทดสอบ (comparison of method) เพื่อประเมินความถูกต้อง (accuracy) โดยเทียบกับเครื่อง Cobas 6000 (Roche) และการทดสอบพิสัยของวิธีที่ใช้วิเคราะห์ (linearity experiment) เพื่อประเมินช่วงของผลการทดสอบ (reportable range) ตามแนวทางของ CLIA⁷⁻⁹ (replication experiment) เพื่อประเมินความเที่ยง (precision) การเปรียบเทียบผลการทดสอบ (comparison of method) เพื่อประเมินความถูกต้อง (accuracy) โดยเทียบกับเครื่อง Cobas 6000 (Roche) และการทดสอบพิสัยของวิธีที่ใช้วิเคราะห์ (linearity experiment) เพื่อประเมินช่วงของผลการทดสอบ (reportable range) ตามแนวทางของ CLIA⁷⁻⁹

วัสดุและวิธีการ

วิธีการประเมินประสิทธิภาพ (method validation) ของเครื่องตรวจวิเคราะห์สารเคมีในเลือดอัตโนมัติ รุ่น BA400 ทำโดยอ้างอิงตามกฎของ CLIA แบบ Non - Waive Test Approve by FDA สำหรับรายการตรวจวิเคราะห์ที่ต้องการประเมินมีทั้งสิ้น 39 รายการ ดังแสดงในตารางที่ 1

Table 1. Methods and reagents used in the evaluation of BA400 analyzer.

Analyte	Unit	Method
AMY	U/L	CNPG3
TP	g/dL	Biuret
ALB	g/dL	BCG
AST	U/L	Kinetic without Pyridoxol-5-Phosphate
ALT	U/L	Kinetic without Pyridoxol-5-Phosphate
ALP	U/L	AMP-pNPP; IFCC
GGT	U/L	Enzymatic:IFCC
TBIL	mg/dL	Diazo
DBIL	mg/dL	Diazo
BUN	mg/dL	Urease
CRE	mg/dL	Jaffe
CK	U/L	Kinetic IFCC
CK-MB	U/L	Enzymatic
LDH	U/L	L>P; IFCC
CHOL	mg/dL	Oxidase/POD
HDL-C	mg/dL	Accelerated
LDL-C	mg/dL	Direct
TG	mg/dL	Enzymatic GPO
Ca	mg/dL	Arzenaso III
Mg	mg/dL	Xylidyl blue
P	mg/dL	Molybdate UV
Na	mmol/L	Direct ISE
K	mmol/L	Direct ISE
Cl	mmol/L	Direct ISE
CO2	mmol/L	PEPC
GLU	mg/dL	Hexokinase
CHE	U/L	Bulylrythiocholine
Iron	µg/dL	Ferrozine
Uric	mg/dL	Uricase
HbA1C	mmol/L	Immuno inhibition
hsCRP	mg/L	Latex- high sensitivity
MicroALB	mg/L	Latex
TP-urine	mg/dL	Pyrogallol red
BUN-urine	mg/dL	Urease
CRE-urine	mg/dL	Jaffe
Amphetamine	ng/mL	Homogeneous enzyme immunoassay
Opiate	ng/mL	Homogeneous enzyme immunoassay
Phenyltoin	µg/mL	Recombinant DNA
Valproic acid	µg/mL	Recombinant DNA

AMY-Amylase; TP-Total protein; ALB-Albumin; AST-Aspartate aminotransferase; ALT-Alanine aminotransferase; ALP-Alkaline phosphatase; GGT -Glutamyltransferase; TBIL-Total bilirubin; DBIL-Direct bilirubin; BUN-Blood urea nitrogen; CRE-Creatinine; CK-Creatine kinase; CK-MB-Creatine kinase-MB; LDH-Lactate dehydrogenase; CHOL-Cholesterol; HDL-C-High density lipoprotein cholesterol; LDL-C-Low density lipoprotein cholesterol; TG-Triglyceride; Ca-Calcium; Mg-Magnesium; P-Phosphorus; Na-Sodium; K-Potassium; Cl-Chloride; CO2-Carbondioxide; GLU-Glucose; CHE-Cholinesterase; Uric-Uric acid; HbA1C-Hemoglobin A1C; hsCRP-High sensitivity C-reactive protein; MicroALB-Microalbumin.

1. Replication experiment

ตัวอย่างที่วิเคราะห์: ใช้สารควบคุมคุณภาพ (control material) Lyphochek® Assayed Chemistry Control 2 ระดับจากบริษัท Bio-rad

วิธีการประเมิน: ทำการวิเคราะห์สารควบคุมคุณภาพทั้ง 2 ระดับโดยแบ่งการวิเคราะห์ออกเป็น 2 แบบคือ

1.1 Within-run variation วิเคราะห์สารควบคุมคุณภาพทั้ง 2 ระดับซ้ำ 20 ครั้งภายในวันเดียวกัน

1.2 Between-run variation วิเคราะห์สารควบคุมคุณภาพทั้ง 2 ระดับ วันละ 1 ครั้ง ติดต่อกันเป็นเวลา 20 วัน

การวิเคราะห์ข้อมูล: นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation, %CV) ของ within-run variation (CVw) และ between-run variation (CVb) จากนั้นนำไปคำนวณ Total CV ได้จากสูตร $SQRT((CVw)^2 + (CVb)^2)$

เกณฑ์ในการประเมิน: ใช้เกณฑ์ของ CLIA⁷ คือ สำหรับ within-run variation ค่า %CV ต้องไม่เกิน 0.25 เท่าของค่า allowable total error (TEa) และสำหรับ between-run variation และ total CV ค่า %CV ต้องไม่เกิน 0.33 เท่าของค่า TEa

2. Comparison of method

ตัวอย่างที่วิเคราะห์: สิ่งส่งตรวจที่เป็นซีรัม พลาสมา หรือ ปัสสาวะ เก็บจากห้องปฏิบัติการเคมีคลินิก โรงพยาบาลมหาราช นครเชียงใหม่ ในแต่ละการทดสอบใช้ตัวอย่างจำนวนอย่างน้อย 40 ตัวอย่าง ที่มีค่าความเข้มข้นครอบคลุมค่าพิสัยของการทดสอบหรือมีค่าที่ครอบคลุมค่าที่มีนัยสำคัญทางคลินิก (ต่ำ ปกติ สูง) ใน ขณะเดียวกันก็เป็นค่าที่ใช้ในการวินิจฉัย ติดตามผลการรักษา และค่าที่เป็นเกณฑ์ให้แพทย์ใช้ตัดสินใจ โดยใช้เกณฑ์พิจารณาจากค่า medical decision level (MDL) ที่ CLIA กำหนดมาให้ร่วมด้วย

วิธีการประเมิน: ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ นำมาแบ่งเป็น 2 ชุด ชุดที่ 1 ทดสอบด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ BA400 ส่วนตัวอย่างอีกชุดบรรจุในน้ำแข็งแห้งส่งไปทดสอบที่บริษัท N-Health กรุงเทพมหานคร ทางเครื่องบิน บริษัท N-Health ใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Cobas 6000 ของบริษัท Roche ทำการวิเคราะห์ทันทีที่ได้รับสิ่งส่งตรวจ โดยใช้เวลาไม่เกิน 12 ชั่วโมงนับตั้งแต่ส่งตัวอย่าง

การวิเคราะห์ข้อมูล: เมื่อได้ค่าที่วิเคราะห์จากเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติทั้งสองแล้วให้นำข้อมูลมาสร้างกราฟระหว่างค่าที่ได้จากเครื่อง BA400 กับค่าจากเครื่อง Cobas 6000 จากกราฟทำให้ได้สมการ regression equation ซึ่งก็คือ $Y_c = a + bX_c$ จากสมการนี้ค่า Y_c คือค่าที่วิเคราะห์

ด้วยเครื่อง BA400 ประเมินค่า bias จากการนำค่า Y_c ลบด้วยค่า X_c ซึ่งหมายถึงค่า MDL นั้นเอง เมื่อได้ค่า %Bias แล้วก็สามารถนำไปคำนวณค่า TEcal ซึ่งเป็นค่า total error รวมของวิธีที่ต้องการประเมินนั้น โดยหาได้จากสมการ $TEcal = \%Bias + Total CV$ ซึ่งค่า total CV ได้มาจากการทำ precision study ดังที่กล่าวมาแล้ว

เกณฑ์ในการประเมิน: ใช้เกณฑ์ของ CLIA⁸ คือ จากการสร้างกราฟระหว่างค่าที่ได้จากเครื่อง BA400 กับค่าจากเครื่อง Cobas 6000 ทำให้ได้ค่า correlation coefficient (r) ซึ่งสามารถใช้ประเมินความสัมพันธ์ของสองวิธีการทดสอบค่า r ควรมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 0.975 หรือค่า r^2 ควรมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 0.950 และต้องพิจารณาค่า TEcal ต้องน้อยกว่าค่า TEa ในกรณีที่ค่า r ไม่น่าเชื่อถือ คือค่า $r < 0.975$ ($r^2 < 0.95$) ควรหาค่า bias จากวิธีอื่นเช่น t-test

3. Linearity experiment

ตัวอย่างที่วิเคราะห์: สารมาตรฐาน (standard solution) หรือ สิ่งส่งตรวจ โดยทำการเตรียมสารตัวอย่างให้มี 2 ค่า คือ Pool 1 (P1) เป็นสารค่าต่ำ ที่มีค่าความเข้มข้นใกล้เคียง และ Pool 5 (P5) เป็นสารค่าสูง ที่มีค่าความเข้มข้นสูงครอบคลุมค่า Linearity ของวิธีการทดสอบ จากนั้นนำสารตัวอย่างทั้งสองที่เตรียมได้มาผสมกันในอัตราส่วนต่างๆ โดย Pool 2, Pool 3 และ Pool 4 จะเป็นการผสม P1 กับ P5 ในอัตราส่วน 3:1, 2:2 และ 1:4 ตามลำดับ

วิธีการประเมิน: ตรวจวัดสารตัวอย่าง 5 ระดับที่เตรียมได้ข้างต้น โดยทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง

การวิเคราะห์ข้อมูล: นำค่าที่ตรวจวัดได้มาหาค่าเฉลี่ย แล้วคำนวณ %Bias โดยเทียบกับค่าที่ควรจะเป็นซึ่งหาได้จากการคำนวณ

เกณฑ์ในการประเมิน: ใช้เกณฑ์ของ CLIA⁹ %Bias ต้องมีค่าน้อยกว่าค่า TEa

ผลการศึกษา

ผลการประเมินความเที่ยงของเครื่อง BA400

การประเมินความเที่ยงของเครื่องวิเคราะห์ BA400 แบ่งออกเป็น short-term และ long-term หรือที่เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า within-run และ between-run ตามลำดับ โดยหาค่าความแปรปรวน ผลพบว่าเครื่อง BA400 มีความเที่ยงที่ดี ผ่านเกณฑ์ที่กำหนดเป็นส่วนใหญ่ โดย within-run imprecision มีค่าอยู่ในช่วง 0.19-4.38% ส่วน between-run imprecision มีค่าอยู่ในช่วง 1.26-13.48% พบบางรายการตรวจเท่านั้นที่ไม่ผ่านเกณฑ์ที่กำหนด ซึ่งได้แก่ amphetamines %CV (between-run) ของ level 1 สูงกว่าที่กำหนด opiates มี %CV (ทั้ง within-run และ between-run) ของ level 1 สูงกว่า

ที่กำหนด และ phenytoin %CV ของ between-run ไม่ผ่านทั้ง
level 1 และ 2 ดังแสดงในตารางที่ 2

Table 2. Within-run and between-run imprecision of tests analyzed by BA400 analyzer (n = 20).

Analyte	Within-run imprecision					Between-run imprecision				
	Level 1		Level 2		%CV accept ^b	Level 1		Level 2		%CV accept
	Mean	%CV ^a	Mean	%CV		Mean	%CV	Mean	%CV	
AMY	66.70	1.26	380.04	2.11	7.50	70.79	4.39	398.75	3.70	9.90
TP	6.25	1.53	3.87	1.52	2.50	6.72	2.85	3.96	2.21	3.30
ALB	3.90	1.19	2.79	1.66	2.50	4.08	1.87	2.60	2.46	3.30
AST	43.28	2.90	225.69	0.71	5.00	47.06	3.85	242.85	1.78	6.60
ALT	33.33	4.14	88.85	1.90	8.75	33.16	2.35	96.26	1.45	11.55
ALP	83.98	4.32	407.33	1.94	7.50	82.38	9.68	364.42	2.51	9.90
GGT	51.57	4.38	145.76	3.02	5.55	58.34	7.09	154.55	3.17	7.33
TBIL	1.26	3.68	4.21	1.94	7.75	1.25	4.09	4.08	2.41	10.23
DBIL	0.29	6.75	1.89	1.71	11.13	0.29	13.48	1.69	4.20	14.69
BUN	16.67	3.70	42.11	1.87	3.93	16.97	5.08	42.81	3.03	5.18
CRE	1.89	1.89	4.25	0.57	6.25	2.02	6.60	4.47	4.26	8.25
CK	147.96	1.71	506.59	0.88	7.50	151.24	2.84	505.93	1.64	9.90
CK-MB	34.45	3.46	N/Ad	N/A	6.03	36.2	4.99	N/A	N/A	7.95
LDH	149.55	2.81	329.08	1.84	5.00	170.44	4.29	368.14	3.11	6.60
CHOL	244.01	0.53	106.01	1.80	2.50	249.58	2.79	104.17	2.20	3.30
HDL-C	64.57	3.69	18.91	2.83	7.50	72.60	5.55	19.38	9.41	9.90
LDL-C	122.86	1.13	61.44	0.77	3.40	109.69	3.28	56.48	3.65	4.49
TG	191.55	1.77	76.41	4.07	6.25	195.95	3.18	79.47	5.32	8.25
Ca	8.95	1.32	12.17	1.02	2.56	9.94	2.68	12.55	1.57	3.38
Mg	2.53	1.63	4.82	3.18	6.25	2.10	4.77	4.42	5.86	8.33
P	3.16	1.81	7.37	0.77	2.56	3.68	2.03	7.57	1.82	3.41
Na	142.13	0.29	121.87	0.12	1.25	148.74	1.51	126.63	1.27	1.65
K	3.79	0.20	6.03	0.35	1.50	3.92	3.16	6.10	1.02	1.98
Cl	99.08	0.19	84.15	0.20	1.25	101.91	1.26	86.02	1.52	1.65
CO2	44.46	1.03	19.54	1.21	5.00	38.25	4.03	17.52	4.61	6.60
GLU	89.07	1.76	281.55	0.97	2.50	88.20	2.07	284.17	0.84	3.30
CHE	6302.1	1.20	9173.37	1.77	2.33	6346.84	2.98	8555.00	1.77	3.23
Iron	245.80	1.13	39.65	4.69	5.00	233.54	1.62	71.96	2.56	6.60
Uric	4.95	2.92	9.01	0.92	4.25	5.07	4.35	9.13	3.21	5.67
HbA1C	5.05	1.61	10.04	2.70	2.98	5.34	1.26	9.94	2.09	3.93
hsCRP	4.56	1.27	10.24	0.57	12.50	4.20	2.74	10.75	1.97	16.50
MicroALB	39.63	0.82	N/A	N/A	11.53	40.94	1.58	N/A	N/A	15.21
TP-urine	68.78	4.83	N/A	N/A	12.88	74.96	6.95	N/A	N/A	14.36

Table 2. Within-run and between-run imprecision of tests analyzed by BA400 analyzer (n = 20). (Continued)

Analyte	Within-run imprecision					Between-run imprecision				
	Level 1		Level 2		%CV accept ^b	Level 1		Level 2		%CV accept
	Mean	%CV ^a	Mean	%CV		Mean	%CV	Mean	%CV	
BUN-urine	413.32	1.86	746.42	5.67	6.83	391.95	7.69	722.72	4.88	9.01
CRE-urine	49.49	1.69	105.31	1.51	10.53	50.99	4.34	108.83	3.29	13.89
Amphetamine	28.48	5.06	109.79	3.36	5.50	41.64	12.91	112.34	6.57	6.60
Opiate	14.03	7.26	100.62	2.62	5.50	50.85	11.28	339.55	3.81	6.60
Phenyltoin	16.77	4.47	53.96	2.22	6.25	32.23	14.49	79.35	10.00	8.25
Valproic acid	179.40	3.18	810.63	2.01	6.25	166.46	5.01	775.54	2.72	8.25

^aCoefficient of variation (%CV) is SD divided by mean and multiply by 100.

^bAcceptable CV is not more than 0.25 times of allowable total error (TEa) for within-run variation and not more than 0.33 times of TEa for between-run variation.

^cN/A-Not done

การเปรียบเทียบผลการตรวจเพื่อประเมินความถูกต้องของเครื่อง BA400

การประเมินความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทำโดยทดสอบตัวอย่างจากสิ่งส่งตรวจเดียวกัน ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการที่ต้องการทดสอบกับเครื่องที่ใช้อ้างอิง ในการศึกษาครั้งนี้ต้องการทดสอบเครื่อง BA400 analyzer โดยเทียบกับเครื่อง Cobas 6000 เมื่อได้ผลการทดสอบ นำมาสร้างกราฟระหว่างค่าที่ได้จากเครื่อง BA400 กับค่าจากเครื่อง Cobas 6000 ทำให้ได้ค่า correlation coefficient (r) ดังแสดงในรูปที่ 1 ซึ่งสามารถใช้ประเมินความสัมพันธ์ของสองวิธีการทดสอบได้ โดย ค่า r ควรมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 0.975 หรือค่า r^2 ควรมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 0.950 และต้องพิจารณาค่า TEcal ต้องน้อยกว่าค่า TEa ด้วยในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการประเมิน 37 รายการทดสอบ

โดยที่ amphetamine และ opiate ผู้ศึกษาไม่สามารถหาตัวอย่างจริงจากผู้ป่วยได้ จากผลการประเมินพบว่าเกือบทุกรายการทดสอบผ่านเกณฑ์ที่กำหนด โดยมีค่า r ในช่วง 0.975 ถึง 1.000 ดังแสดงในตารางที่ 3 มีเพียง 4 รายการเท่านั้นที่ไม่ผ่านเกณฑ์ที่กำหนดคือ วิธีตรวจวัด cholinesterase และ AST ซึ่งมีค่า TEcal มากกว่า TEa เฉพาะช่วงค่า MDL ต่ำๆ เท่านั้น ส่วน microalbumin และ valproic acid พบว่าค่า r น้อยกว่าเกณฑ์ที่กำหนดคือ 0.975 ดังแสดงผลในตารางที่ 3 เมื่อนำผลการศึกษาของ microalbumin และ valproic acid มาวิเคราะห์โดยใช้ paired t-test ผลการทดสอบพบว่าการตรวจ microalbumin และ valproic acid ด้วยเครื่องวิเคราะห์ทั้งสองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยได้ค่า p = 0.115 และ 0.648 ตามลำดับ

Table 3. Accuracy analysis of BA400 analyzer. Comparison study was performed for BA400 analyzer using the Cobas 6000 analyzer as the comparative method.

Analyte (units)	N	r	Slope	Intercept	MDL	TEcal	TEa	% Bias
AMY (U/L)	42	1.000	0.893	0.000	50.00	15.27	30	10.70
					120.00	15.27		10.70
					200.00	14.96		10.70
TP (g/dL)	40	0.978	0.961	0.000	4.5	7.13	10	3.90
					6	7.13		3.90
					8	7.13		3.90
ALB (g/dL)	100	0.986	0.941	0.000	2	8.87	10	5.90
					3.5	8.11		5.90
					5.2	8.11		5.90
AST (U/L)	100	0.997	1.102	1.381	20	21.19	20	17.11
					60	17.3		12.50
					300	12.6		10.66
ALT (U/L)	40	0.987	1.011	0.000	20	9.3	35	1.1
					60	9.3		1.1
					300	3.5		1.1
ALP(U/L)	42	0.994	1.029	0.000	50	13.50	30	2.9
					150	13.50		2.9
					400	6.07		2.9
GGT (U/L)	40	0.989	0.915	0.000	20.00	16.83	22.20	8.50
					50.00	16.83		8.50
					150.00	12.87		8.50
TBIL (mg/dL)	41	0.997	1.102	0.204	1.40	20.28	31	24.77
					2.50	23.83		18.36
					20.00	14.31		11.22
DBIL (mg/dL)	43	0.991	1.228	-0.063	1.1	21.61	44.50	17.07
					4.2	25.83		21.30
					14	26.88		22.35
BUN (mg/dL)	108	0.991	1.000	0.000	6	6.28	15.70	0
					25	6.28		0
					50	3.56		0
CRE (mg/dL)	40	0.999	0.927	0.000	0.6	14.17	25.00	7.30
					1.6	14.17		7.30
					6	11.60		7.30
CK (U/L)	40	0.998	1.050	-9.846	100.00	8.16	30	4.85
					240.00	4.21		0.90
					1800.00	6.31		4.45
CK-MB (U/L)	40	0.976	0.822	0.000	48	23.87	24.10	17.80

Table 3. Accuracy analysis of BA400 analyzer. Comparison study was performed for BA400 analyzer using the Cobas 6000 analyzer as the comparative method. (Continued)

Analyte (units)	N	r	Slope	Intercept	MDL	TEcal	TEa	% Bias
LDH (U/L)	40	0.995	0.913	19.96	120	13.06	20	7.3
					300	5.66		2.05
					500	8.32		4.71
CHOL (mg/dL)	42	0.9976	1.057	0.000	90.00	8.54	10.00	8.70
					240.00	8.54		5.70
					260.00	8.54		5.70
					350.00	8.54		5.70
HDL-C (mg/dL)	40	0.978	0.888	0.000	25.93	21.02	30	11.20
					76.15	17.84		11.20
LDL-C (mg/dL)	40	0.983	0.983	0.000	59.01	5.43	13.60	1.70
					120.34	5.16		1.70
TG (mg/dL)	100	0.989	1.020	-6.369	40	20.61	25.00	13.92
					150	8.94		2.25
					400	7.10		0.41
Ca (mg/dL)	40	0.978	1.027	0.000	17	5.69	10.20	2.70
					11	4.57		2.70
					13.5	4.57		2.70
Mg (mg/dL)	40	0.985	1.047	0.000	1.20	9.76	25	4.70
					2.00	9.76		4.70
					5.00	11.36		4.70
P (mg/dL)	40	0.988	1.028	0.000	1.5	5.52	10.20	2.80
					2	5.52		2.80
					5	4.78		2.80
Na (mmol/L)	44	0.985	0.997	0.000	115	1.57	5	0.30
					135	1.83		0.30
					150	1.83		0.30
K (mmol/L)	44	0.977	0.943	0.306	3	7.67	6	4.50
					5.8	1.51		0.42
					7.5	2.70		1.62
Cl (mmol/L)	44	0.984	0.872	11.71	90	1.49	5	0.21
					112	3.62		2.34
CO ₂ (mmol/L)	40	0.975	0.906	4.444	20	17.57	20	12.80
					33	8.21		4.05
GLU (mg/dL)	100	0.989	1.070	-5.585	45	8.13	10	5.41
					120	8.07		2.35
					180	5.18		3.90

Table 3. Accuracy analysis of BA400 analyzer. Comparison study was performed for BA400 analyzer using the Cobas 6000 analyzer as the comparative method. (Continued)

Analyte (units)	N	r	Slope	Intercept	MDL	TEcal	TEa	% Bias
CHE (U/L)	40	0.998	0.9842	-369.300	4275	13.45	9.80	10.24
					11150	9.80		4.91
Iron (µg/dL)	40	0.997	1.025	0.000	50	7.84	20	2.50
					220	4.47		2.50
					400	4.47		2.50
Uric (mg/dL)	41	0.985	0.934	0.000	2	11.84	17.00	6.60
					8	11.84		6.60
					10.7	9.93		6.60
HbA1C (%)	40	0.996	1.193	-1.134	5.7	2.64	11.90	0.59
					9.3	10.52		7.11
hsCRP (mg/L)	40	0.982	0.998	0.658	2.53	28.83	50	25.81
					6.64	11.76		9.71
MicroALB (mg/L)	40	0.974	1.150	0.000	11.8	16.78	46.10	15.0
					56.7	16.78		15.0
TP-urine (mg/dL)	40	0.980	0.962	0.000	78.7	11.26	42.5	3.8
BUN-urine (mg/dL)	44	0.992	0.934	0.000	419	17.45	27.3	6.6
					721	14.08		6.6
CRE-urine (mg/dL)	40	0.999	1.338	0.000	688	38.46	42.1	33.8
					158	37.41		33.8
Phenytoin (µg/mL)	40	0.989	0.946	0.000	39.2	15.64	25	5.40
					86.6	15.64		5.40
Valproic acid (µg/dL)	40	0.914	0.872	0.000	260	18.73	25.00	12.80
					972	16.19		12.80

MDL-Medical decision level; TEcal-Calculated total error; TEa-Allowable total error.

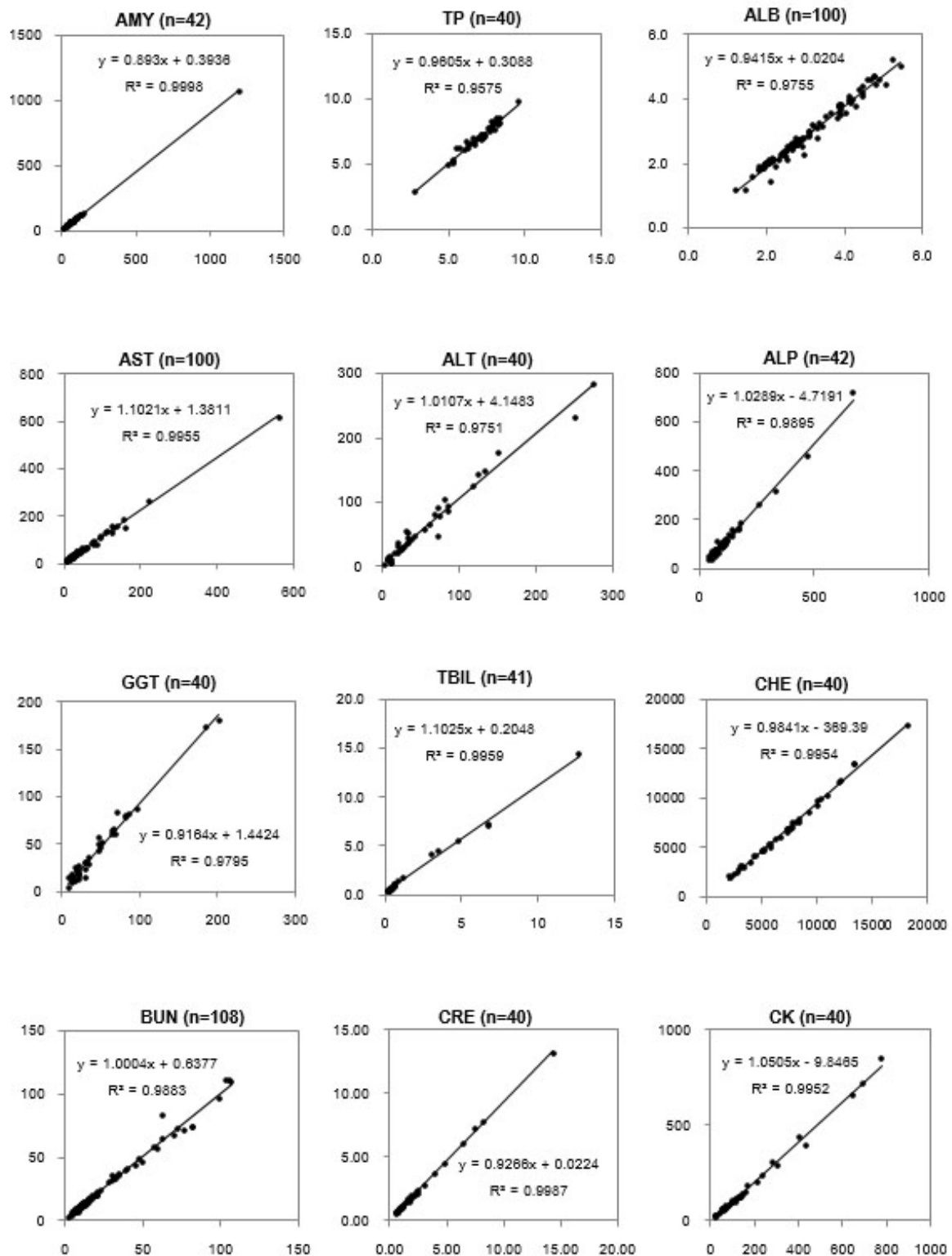


Figure 1. Comparison plot of selected analytes. Graphs were plotted between comparative result (Cobas 6000 analyzer) on X-axis and test result (BA400 analyzer) on Y-axis.

เป็นการทดสอบพิสัยของวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ (analytical range หรือ reportable range) โดยการหาระดับต่ำสุดและสูงสุดของวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ที่ยังมีค่าความถูกต้อง (inaccuracy) และค่าความเที่ยง (imprecision) เป็นที่น่าเชื่อถือได้ โดยนำสารมาตรฐานหรือสิ่งส่งตรวจมาเจือจางเป็นความเข้มข้นต่างๆ แล้ววิเคราะห์ตัวอย่างที่เตรียมได้ โดยวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าที่ตรวจวัดได้มาหาค่าเฉลี่ย แล้วคำนวณ %bias โดยเทียบกับค่าที่ควรจะเป็นซึ่งหาได้จากการคำนวณ สำหรับการประเมิน %bias ต้องมีค่าน้อยกว่าค่า TEa จึงจะถือว่ายอมรับได้ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดสอบทั้งหมด 34 รายการทดสอบ โดยที่การตรวจ CK-MB amphetamine opiate phenytoin และ valproic acid เนื่องจากไม่สามารถหาตัวอย่างค่าสูงๆ ได้ จากการศึกษาพบว่าทุกรายการตรวจมีความถูกต้องผ่านเกณฑ์ที่กำหนด คือมีค่า %bias น้อยกว่าค่า TEa ดังแสดงในตารางที่ 4

Table 4. Linearity experiment of BA400 analyzer.

Analyte (units)	Theoretical value	Bias	%Error	TEa accept (%)	Linearity ^a
AMY (U/L)	0 – 1163.29	9.79 – 19.71	1.07 - 3.37	30	0-1,317
TP (g/dL)	0 – 14.05	0.18 - 0.48	1.68 - 8.16	10	0-15
ALB (g/dL)	0 – 8.07	0.04 – 0.17	0.69 - 4.71	10	0.1-7.0
AST (U/L)	0 – 693.27	1.40 – 17.80	0.20 - 9.40	20	0-500
ALT (U/L)	0 – 645.20	1.31 – 24.85	0.27 – 10.38	20	1.6-500
ALP (U/L)	0 – 1473.89	4.73 – 14.17	0.32 – 3.21	30	0-1,200
GGT (U/L)	0 – 312.81	2.56 – 14.18	3.25 – 4.53	22.2	0-300
TBIL (mg/dL)	0 – 15.58	0.09 – 0.49	0.78 – 9.80	20	0-15
DBIL (mg/dL)	0 – 24.71	0.36 -1.76	3.96 - 7.11	44.5	0-15
BUN (mg/dL)	0 – 150.39	0.14 – 17.32	0.39 – 11.52	15.7	0-140
CRE (mg/dL)	0 – 25.23	0.02 – 1.29	0.12 – 5.11	15	0-20
CK (U/L)	0 - 1274.0	4.50 – 14.50	1.10 – 1.52	30	9.2-1,300
LDH (U/L)	0 – 1049.45	4.01 – 12.29	1.16 – 1.56	20	6.2-1000
CHOL (mg/dL)	0 – 846.31	11.71 – 29.05	1.85 – 6.36	10	0-1,000
HDL-C (mg/dL)	0 – 201.10	4.37 – 9.77	4.32 – 8.69	30	0-200
LDL-C (mg/dL)	0 – 946.67	4.00 – 15.67	1.37 – 2.21	13.6	0-990
TG (mg/dL)	0 – 497.00	7.44 – 47.05	5.99 – 9.47	25	1.6-600
Ca (mg/dL)	0 – 22.39	0.28 – 1.11	4.97 – 6.24	10.2	0-18
Mg (mg/dL)	0 – 4.30	0.005 – 0.12	0.36 – 5.12	25	0-4
P (mg/dL)	0 – 21.29	0.26 – 0.73	1.64 – 6.98	10.2	0-20
Na (mmol/L)	0 – 240.80	0.13 – 5.20	1.09 – 2.16	3	100-200
K (mmol/L)	0 – 11.04	0.02 – 0.29	0.85 – 2.66	5.8	1-10
Cl (mmol/L)	0 – 168.40	1.67 – 4.77	2.16 – 3.96	5	50-150
CO2 (mmol/L)	0 – 70.12	0.09 – 2.49	0.51 – 4.74	10	2.62-50
GLU (mg/dL)	0 – 573.76	2.22 – 11.7	0.39 – 8.28	10	0-500
CHE (U/L)	0 – 23591.39	188.27 – 222.69	0.80 – 2.83	8.9	0-25,000
Iron (µg/dL)	0 – 1155.04	1.72 – 5.33	0.15 – 1.85	20	0-1,000
Uric (mg/dL)	0 – 14.21	0.04 – 2.39	0.61 – 8.40	17	0-25
HbA1C (mmol/L)	0 – 1.77	0.00 – 0.06	0.05 – 8.20	11.9	0.06-1.61

Table 4. Linearity experiment of BA400 analyzer. (Continued)

Analyte (units)	Theoretical value	Bias	%Error	TEa accept (%)	Linearity ^a
hsCRP (mg/L)	0 – 16.04	0.13 – 0.33	0.05 – 3.46	50	0.06-15
MicroALB (mg/L)	0 – 92.92	0.25 – 2.77	0.36 – 8.93	46.1	0-130
TP-urine (mg/L)	0 – 4373.01	38.74 – 544.07	3.54 – 12.44	43.5	70-4000
BUN-urine (mg/dL)	0 – 8516.00	19.67 – 1229.00	0.92 – 14.43	27.3	0-7000
CRE-urine (mg/dL)	0 – 1021.35	0.84 – 17.88	0.33 – 1.75	28.4	0-1000

^a Linearity values were reported by Biosystem company.

วิจารณ์ผลการศึกษา

การทำ method validation ของเครื่องมือตรวจวิเคราะห์ใหม่ วิธีการตรวจวิเคราะห์ใหม่ เพื่อจะทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องมือหรือวิธีการวิเคราะห์นั้นสามารถทำได้ตามข้อกำหนดต่างๆ ตามความเหมาะสมกับเครื่องมือ วิธีการและสภาวะของห้องปฏิบัติการนั้นๆ การทำ method validation บางครั้งอาจเจอปัญหา คือทดสอบแล้วไม่ผ่านเกณฑ์ที่กำหนด ปัญหาเหล่านี้ก็มักเกิดจากปัจจัยหลายอย่างในกระบวนการทำ method validation จากการประเมินประสิทธิภาพของเครื่องตรวจวิเคราะห์สารเคมีในเลือดอัตโนมัติ BA400 โดยทดสอบความเที่ยง ความถูกต้อง และ ความเป็นเส้นตรง พบว่าผ่านเกณฑ์ที่กำหนดเป็นส่วนใหญ่ มีเพียงบางรายการตรวจเท่านั้นที่ไม่ผ่านเกณฑ์ที่กำหนด

จากการศึกษา replication experiment เพื่อประเมินความเที่ยง (precision) หรือการหาค่าความไม่แม่นยำ (imprecision) หรือการหาค่าความผิดพลาดแบบสุ่ม (random error) ซึ่งอาจเกิดขึ้นในกระบวนการวิเคราะห์ของเครื่องตรวจวิเคราะห์สารเคมีในเลือดอัตโนมัติ BA400 จากการทดสอบทั้งหมด 39 รายการทดสอบ โดยมีวิธีการหาความเที่ยง 2 แบบ คือ within-run imprecision และ between-run imprecision โดยใช้สารควบคุมคุณภาพวิเคราะห์จำนวน 20 ครั้ง แล้วนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธีการทางสถิติเพื่อประเมินค่าความไม่แม่นยำ โดยการหา coefficient of variation หรือ %CV ของแต่ละการทดสอบ โดยอ้างอิงเกณฑ์ในการยอมรับผล ตามที่ CLIA กำหนด หลังการประเมินผลพบว่า การทดสอบจำนวน 36 รายการทดสอบ มีค่าความไม่แม่นยำอยู่ในเกณฑ์ที่ CLIA กำหนด และพบเพียง 3 รายการทดสอบเท่านั้นที่มีค่าความไม่แม่นยำมากกว่าเกณฑ์ที่ CLIA กำหนด คือ amphetamine มีค่า %CV between-run imprecision ของ level 1 = 12.91 (%CV accept = 6.60)

สูงกว่าที่กำหนด opiate มีค่า % CV within-run imprecision และ between-run imprecision ของ level 1 = 7.26 (%CV accept = 5.50) และ %CV between-run precision = 11.28 (%CV accept = 6.60) สูงกว่าที่กำหนด (%CV accept = 6.60) สูงกว่าที่กำหนด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารควบคุมคุณภาพที่นำมาทำการทดสอบอาจจะมีค่าต่ำมากเกินไป จึงทำให้ค่าที่วัดได้ไม่เที่ยง นอกจากนี้ยังพบว่า Phenyltoin มีค่า % CV between-run imprecision ของ level 1 = 14.49 และของ level 2 = 10.00 (%CV accept = 8.25) ซึ่งไม่ผ่านเกณฑ์ทั้งสอง level ซึ่งอาจเกิดจากปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวิเคราะห์หลายประการ เช่น ตัวอย่างที่ใช้ในการคำนวณสถิติ ช่วงเวลาที่ทำการทดสอบ คุณสมบัติของตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ และวิธีการหรือเกณฑ์ที่ใช้ในการสรุปผล เป็นต้น สำหรับช่วงเวลาที่ใช้ในการทดสอบ หากดำเนินการทดสอบในช่วงเวลาที่ใกล้เคียงกัน และสภาพแวดล้อมที่ใกล้เคียงกันมากหรือแทบไม่เปลี่ยนแปลง ทำให้ค่าที่ได้มีความใกล้เคียงกันมาก การดำเนินการในช่วงเวลาที่ห่างกันออกไป อาจจะทำให้ได้ค่าที่ความเที่ยงที่ได้กระจายตัวกว้างมากขึ้น

จากการศึกษาเพื่อประเมินความถูกต้อง (accuracy) หรืออีกนัยหนึ่งคือการประเมินค่าความคลาดเคลื่อนแบบเป็นระบบ (systematic error) โดยการเปรียบเทียบระหว่างสองวิธี หรือเปรียบเทียบกับวิธีเดิมที่ใช้อยู่ ในการศึกษาครั้งนี้ได้เปรียบเทียบกับเครื่อง Cobas 6000 เหตุผลที่เลือกเครื่อง Cobas 6000 สำหรับเปรียบเทียบ เนื่องจากในประเทศไทยมีห้องปฏิบัติการจำนวนมากใช้เครื่องอัตโนมัตินี้ ประกอบกับหลักการในการทดสอบส่วนใหญ่เหมือนกับเครื่อง BA400 และที่เลือกบริษัท N-Health เนื่องจากเป็นห้องปฏิบัติการที่ได้มาตรฐานผ่านการรับรอง ISO15189 จากการทดสอบทั้งหมด 37 การทดสอบ โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างตรวจ จำนวน 40 ราย เป็นอย่างน้อย แล้วนำผลที่ได้

มาทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธีทางสถิติ โดยใช้ regression equation: $Y_c = a + bX_c$ ประเมินค่า bias และประเมินค่าความสัมพันธ์ของสองวิธีการทดสอบ (correlation coefficient; r) ค่าที่ยอมรับได้คือ $r > 0.975$ ($r^2 > 0.95$) จากนั้นทำ difference plot เพื่อประเมินค่าความแตกต่างระหว่างสองวิธีการทดสอบว่ามีความแตกต่างกันเป็นไปในทางต่ำหรือสูง โดยเกณฑ์ในการยอมรับผล จะดูที่ค่าผลวิเคราะห์ผิดพลาดรวม Allowable Total Error (TEa) ค่าที่ยอมรับได้คือ TEcal ต้องน้อยกว่า TEa ผลการทดสอบพบว่ารายการทดสอบส่วนใหญ่ผ่านเกณฑ์ที่กำหนด มีเพียง 4 รายการทดสอบที่ไม่ผ่านเกณฑ์ที่กำหนด คือ AST ได้ค่า TEcal = 21.9 (TEa=20), cholinesterase ได้ค่า TEcal = 13.45 (TEa= 9.80), microalbumin ได้ค่า $r = 0.974$ ($r > 0.975$) และ valproic acid ได้ค่า $r = 0.914$ ($r > 0.975$) สาเหตุของความไม่ถูกต้องนี้อาจเกิดจากหลายประการเช่น วิธีการเปรียบเทียบ จำนวนตัวอย่าง ช่วงเวลาในการทดสอบ ความเสถียรของตัวอย่าง การวิเคราะห์ข้อมูล วิธีการทางสถิติ และเกณฑ์ในการสรุปผล สำหรับการทดสอบ AST และ cholinesterase ปัญหาที่ค่าต่ำๆ ไม่ผ่านเกณฑ์น่าจะเกิดจากธรรมชาติของการทดสอบสารที่มีค่าต่ำๆ ส่งผลให้ความเที่ยงในการทดสอบลดลง สำหรับการตรวจ microalbumin และ valproic acid สาเหตุที่ไม่ผ่านเกณฑ์เนื่องจากการใช้ตัวอย่างในการทดสอบเพียง 40 ราย ซึ่งอาจมีไม่มากพอ หรืออาจเกิดจากหลักการในการทดสอบของทั้งสองเครื่องต่างกัน นอกจากนี้เวลาที่ใช้ในการทดสอบระหว่างสองเครื่องก็ห่างกันเกิน 2 ชั่วโมง ตามข้อกำหนดการทำ comparison study นั้นควรทำการตรวจวัดในเวลาใกล้เคียงกันไม่ควรห่างกันเกิน 2 ชั่วโมง¹⁰⁻¹² แต่ในการศึกษาครั้งนี้มีข้อจำกัดคือเครื่อง Cobas 6000 ตั้งอยู่ที่กรุงเทพมหานครทำให้สูญเสียเวลาในการส่งตัวอย่าง เวลาตรวจวัดในทุกการทดสอบทำภายใน 12 ชั่วโมง ซึ่งก็ยิ่งมากกว่าที่กำหนด ซึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ค่าจากทดสอบด้วยเครื่องทั้งสองมีความแตกต่างกันในบางรายการทดสอบ

จากการทดสอบช่วงค่าของการตรวจวิเคราะห์ หรือพิสัยของวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ (analytical range หรือ

reportable range) โดยการทำการ linearity experiment ซึ่งเป็นการหาระดับต่ำสุดและสูงสุดของวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ ทำการวิเคราะห์สิ่งส่งตรวจนั้นระดับ 3 ครั้งโดยใช้สารมาตรฐาน แล้วนำค่าที่ได้จากการวิเคราะห์มาสร้างกราฟพร้อมกับค่าความเข้มข้นที่คำนวณได้ และคำนวณ % Error โดยที่ % Error ที่ได้นั้นน้อยกว่าหรือเท่ากับ TEa ของรายการ ตรวจนั้นๆ ผลพบว่าทุกรายการทดสอบมีค่า % Error น้อยกว่าหรือเท่ากับค่า TEa ซึ่งผ่านเกณฑ์ที่กำหนด และเมื่อเปรียบเทียบกับค่า linearity ที่บริษัทกำหนดมาพบว่ามีค่าครอบคลุมที่กำหนด

การศึกษานี้เป็นการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องวิเคราะห์ทางเคมีคลินิกอัตโนมัติ BA400 ครั้งแรกในประเทศไทย ซึ่งเป็นการทดสอบในห้องปฏิบัติการ ภายใต้สภาวะแวดล้อมจริงของห้องปฏิบัติการ และจากผลการทดสอบสามารถสรุปได้ว่าเครื่อง BA400 มีความถูกต้องแม่นยำ และมีความเป็นเส้นตรงตามเกณฑ์ที่บริษัท และหน่วยงานมาตรฐานกำหนดเป็นส่วนใหญ่ สำหรับบางการทดสอบที่ไม่ผ่านเกณฑ์ แนะนำให้มีการประเมินก่อนเปิดรายการตรวจนั้นๆ อีกครั้งหนึ่งสำหรับแต่ละห้องปฏิบัติการ

สรุปผลการศึกษา

จากการประเมินประสิทธิภาพเครื่องตรวจวิเคราะห์สารเคมีในเลือดอัตโนมัติ รุ่น BA400 ของบริษัท Biosystem โดยการทดสอบ replication experiment, comparison of method และ linearity experiment พบว่าเครื่องตรวจวิเคราะห์สารเคมีในเลือดอัตโนมัติรุ่น BA400 มีความเที่ยงสูง มีความถูกต้องดีเมื่อเทียบกับเครื่องที่เป็นเครื่องเปรียบเทียบ คือ Cobas 6000 มีเพียงบางการทดสอบเท่านั้นที่ไม่ผ่านเกณฑ์ และมีความเป็นเส้นตรงผ่านเกณฑ์ที่กำหนดในทุกรายการทดสอบ

ผลการทดลองนี้สามารถยืนยันได้ว่าเครื่องตรวจวิเคราะห์สารเคมีในเลือดอัตโนมัติ รุ่น BA400 เป็นเครื่องที่มีประสิทธิภาพดี มีความเที่ยง และมีความถูกต้องตามที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด และเป็นไปตามเกณฑ์ที่องค์กรมาตรฐานกำหนด ทำให้มั่นใจได้ว่าจะสามารถนำเครื่องวิเคราะห์นี้ไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ในงานประจำวันได้

1. Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE. Clinical chemistry; principles, techniques, and correlations. 7th edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia PA, USA; 2013.
2. Theodorsson E. Validation and verification of measurement methods in clinical chemistry. *Bioanalysis* 2012; 4: 305-20.
3. Nichols JH. Verification of method performance for clinical laboratories. *Adv Clin Chem* 2009; 47: 121-37.
4. Haeckel R. Verification, validation and evaluation of analytical procedures in laboratory medicine. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 111-2.
5. Westgard JO. Managing quality versus measuring uncertainty in the medical laboratory. *Clin Chem Lab Med* 2010; 48: 31-40.
6. Wood R. How to validate analytical methods. *Trends Anal Chem* 1999; 18: 624-32.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Approved guideline for precision performance of clinical chemistry devices. Villanova, PA: NCCLS; 1999 (Document no. EP5-A).
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Approved guideline for method comparison and bias estimation using patient samples. Villanova, PA: NCCLS; 2002 (Document no. EP9-A2).
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Proposed guideline for evaluation of linearity of quantitative analytical methods. Villanova, PA: NCCLS; 2001 (Document no. EP6-P2).
10. Hanneman SK. Design, analysis and interpretation of method-comparison studies. *AACN Adv Crit Care* 2008; 19: 223-34.
11. Petersen PH, Stöckl D, Blaabjerg O, Pedersen B, Birkemose E, Thienpont L, *et al.* Graphical interpretation of analytical data from comparison of a field method with reference method by use of difference plots. *Clin Chem* 1997; 43: 2039-46.
12. นวพรรณ จารุรักษ์. การทำ Method Validation. พิมพ์ครั้งที่ 1, บริษัท ฐานการพิมพ์ จำกัด, กรุงเทพฯ; 2552.

การระบาดของ Type B Botulism ที่จังหวัดชัยภูมิ ประเทศไทยในปี 2014

An Outbreak of type B botulism in Chaiyaphum Province, Thailand 2014

■ ปิยะดา หวังรุ่งทรัพย์* ชุตติมา จิตตประสาธศิลป์ กรณ์ย์ สุทธิวรารคม
Piyada Wangroongsarb* Chutima Jittaprasartsin Karun Suthivarakom
ธนิตชัย คำแถลง นัฐพงษ์ ชื่นบาน สมชาย แสงกิจพร
Thanitchai Kamthlang Nattapong Cheunban Somchai Sangkitporn

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จ.นนทบุรี
National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Nonthaburi Province

*ผู้รับผิดชอบบทความ (Email : piyada.w@dmasc.mail.go.th)

Received December 2014

Accepted as revised January 2015

Abstract

Introduction: *Clostridium. botulinum* strains that produce types A and B to in generally associated with several outbreaks in the United States, China, South Amerca and southern European countries, and the most frequently implicated foods are vegetables. Diagnosis of botulism has been made by detecting the neurotoxin and *C. botulinum* cells in patients and/or suspected food samples. The aim of this study was to identify the cause of foodborne outbreak and analysis the symptoms of botulism in Chaiyaphum Province, 2014.

Materials and methods: The samples from Chaiyaphum Province outbreak were comprised of suspected food and clinical samples from 4 patients. Total 11 samples were identified by the cultivation, mouse bioassay and typing toxin genes amplication by multiplex PCR. The subtypes B1-B8 were compared based on the amino acid sequences alignment of bont/B1 to B8 subtypes using MEGA software which produce an unweighed pair group method with arithmetic mean (UPGMA).

Results: The clinical sytoms were observed especially with blurred vision, glossoplegia, dysarthria, nausea, dyspnea and required mechanical ventilation for support breathing. The etiological agent of this foodborne botulism outbreak detected by culturing, mouse bioassay and multiplex PCR method in fermented bamboo shoots contaminated was *C. botulinum* type B8. The phylogenetic tree of Chaiyaphum 2014 strain was constructed and the result demonstrated an identical to B8 subtype of Surat Thani 2012 strain (KC 714045).

Conclusions: From this study showed that the etiologic agent of an outbreak in Chaiyaphum Province was fermented bamboo shoot contaminated with *C. botulinum* type B8. Botulism disease must be considered clinical symptoms which was important to provide treatment of patients in time. It should combine with laboratory diagnosis in order to obtain the accurate results.

Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2015; 48(1): 49-58. Doi: 10.14456/jams.2015.3

Keywords: *C. botulinum*, foodborne, molecular technique

บทคัดย่อ

บทนำ: *Clostridium botulinum* ที่เป็นสายพันธุ์ที่ผลิตสารพิษชนิด A และ B เกี่ยวข้องกับการแพร่ระบาดในประเทศสหรัฐอเมริกา-จีน-อเมริกาใต้และประเทศในยุโรปตอนใต้และอาหารส่วนใหญ่ที่เกี่ยวข้องเป็นผัก การตรวจวินิจฉัยโรคโดยการตรวจสอบ neurotoxin และการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. botulinum* ในผู้ป่วยและ/หรือตัวอย่างอาหารที่สงสัยจุดประสงค์ของการศึกษาค้นคว้านี้เพื่อหาสาเหตุของการระบาดและวิเคราะห์อาการของโรค Botulism ที่เกิดในจังหวัดชัยภูมิ ปี 2014

วัสดุและวิธีการวิจัย: ตัวอย่างจากการระบาดที่จังหวัดชัยภูมิประกอบด้วยตัวอย่างอาหารที่สงสัยและสิ่งตัวอย่างจากผู้ป่วย 4 คน รวมทั้งหมด 11 ตัวอย่างนำมาทำการทดสอบด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ การทดสอบหาสารพิษในหนูทดลองและวิธีทางชีวโมเลกุล เชื้อ *C. botulinum* ทำ subtyping โดยการเปรียบเทียบการจัดตำแหน่งของกรดอะมิโนของ *bont/B1-B8* และใช้ software MEGA คำนวณแบบ unweighed pair group (UPGMA)

ผลการศึกษา: อาการทางคลินิกที่สังเกตเห็นชัดโดยเฉพาะคือ ตาพร่ามัว ลิ้นแข็ง ความผิดปกติเกี่ยวกับการพูด คลื่นไส้และการหายใจขัดซึ่งต้องอาศัยเครื่องช่วยหายใจ ส่วนสาเหตุของการระบาดครั้งนี้คือ หน่อไม้ปิ้งที่มีการปนเปื้อนเชื้อ *C. botulinum* type B8 ซึ่งได้ผลจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ การทดสอบหาสารพิษในหนูทดลองและวิธีทางชีวโมเลกุล ผลจากการสร้าง Phylogenetic tree โดย subtyping B1-B8 ของเชื้อ *C. botulinum* สายพันธุ์ชัยภูมิ 2014 พบว่าเป็น subtype B8 ซึ่งเหมือนกันกับสายพันธุ์สุราษฎร์ธานี 2012 (KC 714045)

สรุปผลการศึกษา: จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสาเหตุของการระบาดที่จังหวัดชัยภูมิคือหน่อไม้ปิ้งที่มีการปนเปื้อนเชื้อ *C. botulinum* type B8 การพิจารณาอาการทางคลินิกมีความสำคัญเพื่อให้การรักษาผู้ป่วยได้ทันเหตุการณ์ร่วมกับการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการเพื่อให้ได้ผลวินิจฉัยโรคที่ถูกต้อง

วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2558; 48(1): 49-58. Doi: 10.14456/jams.2015.3

คำรหัส: *C. botulinum*, foodborne, molecular technique

Introduction

Clostridium botulinum produces a characteristic botulinum neurotoxin (BoNT), which is classified by Centers for Disease Control and Prevention as one of the six highest risk threat agents for bioterrorism (Category A agent).¹ Botulinum neurotoxin (BoNT) exists into 8 toxin types (A-H), distinguished by the neutralization of toxin using type-specific polyclonal antibodies and molecular biology methods.^{2,3} Botulinum toxin types A, B, E, F, and H cause disease in humans. Types A, B, and E are associated with foodborne illness, especially type E associated with fish products. Type C produces limberneck in birds and type D causes botulism in other mammals. There is no disease associated with type G.

An eighth toxin, type H, was discovered by researchers at the California Department of Public Health in 2013. Four of these (types A, B, E and rarely F) cause human botulism. Types C, D and E cause illness in other mammals, birds and fish. *C. botulinum* strains that produce types A and B toxin were generally associated with several outbreaks in temperate and warmer regions. Proteolytic type toxins A and B are linked to majority of the outbreaks in the United States, China, South America and southern European countries, and the most frequently implicated foods are vegetables. In France 2014, an outbreak of human botulism was due to consumption of ham containing botulinum neurotoxins B and E.⁴ In China 2014, two patients from Sichuan Province with symptoms of food-borne botulism, a rare but fatal

illness caused by the consumption of foods containing *C. botulinum* type A.⁵ Also, occurring in Ontario, Canada 2014, two adult females consumed a meal consisting of a traditionally prepared salted fish contaminated with *C. botulinum* type E.⁶ Laboratory investigation of botulism has been made by detecting of the neurotoxin and microorganism in patients and/or suspected food samples.^{7,8} Mouse bioassay is the only universal method for the detection of toxin-producing *C. botulinum*. It is highly specific and sensitive whereas it is time-consuming and involves in rigors animal ethical issues. Phylogenetic analysis and typing of *C. botulinum* by molecular biology methods such as pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)⁹ ribotyping (rRNA analysis), amplified fragment length polymorphism (AFLP),¹⁰ multilocus sequence typing (MLST),¹¹ randomly amplified polymorphic DNA analysis (RAPD) and repetitive element sequence based PCR (Rep-PCR)^{12,13} are currently in use. Detection of virulence factor(s) is a prerequisite for the identification of toxigenic *C. botulinum* strains and other related species for causing the botulism. The aim of this study was to identify the cause of foodborne outbreak and analysis the symptoms of botulism in Chaiyaphum Province, 2014.

Materials and methods

Observation of patients

Clinical observations recorded by nurse as a part of clinical information on admission to hospital. The symptom of observations must reflect the requirements of therapies. In certain clinical circumstances further observations (for example neurological symptoms) may be required.

Culture and isolation of *C. botulinum*

The outbreak in Chaiyaphum province comprised of 3 stool samples, 6 sera samples and 2 fermented bamboo shoots samples received during 22 April to 1 May 2014. Stool and sera samples of the 1st-4th patients were received as showed in table 1. The fermented bamboo shoots were collected from the leftover (13-57-06653) and the same lot of the leftover collected from factory (13-57-06730). Epidemiology

staffs collected all samples and sent for identification at the Anaerobic bacteria section, National Institute of Health, Thailand. One gram of food or stool specimens was weighed in a sterilized container. The specimen was transferred to a sterilized mortar and 1 mL of cold gelatin diluent buffer was added. The samples were centrifuged in refrigerated centrifuge at 12,000 x g for 20 minutes, and the supernatant were applied for toxigenicity test using mouse bioassay.¹⁴ Half of pellet from samples was inoculated and grown on Egg Yolk Agar (EY) plates and incubated under anaerobic conditions at 35°C for 2 days. The results showed lipase positive which were suspected *C. botulinum*. The remaining of the pellet was divided into three parts and each was inoculated onto Chopped Meat-Glucose-Starch (CMGS) medium, CMGS medium heated at 80°C for 15 min, and Tryptone peptone glucose yeast extract trypsin (TPGYT). All of them were incubated in anaerobic conditions at 35°C for 5 days. All clinical isolates were characterized as followed by Dowell and Hawkins,¹⁵ and biochemical testing by Holdeman.¹⁶ The biochemical testing were SIM Test (hydrogen sulfide, indole, motile), hippurate hydrolysis Test, nitrate reduction test, gelatin, milk, esculin, the ferment of the peptone yeast extract containing starch, arabinose, dextrose, fructose, lactose, maltose, mannose, mannitol, salicin, sucrose, xylose. The results of suspected *C. botulinum* were milk digestion, gelatin and esculin hydrolysis positive. All suspected *C. botulinum* should confirm by mouse bioassay and molecular technique. Institute of Health Animal Care and Use Committee (NIH-ACUC) permit No. 57-017.

Mouse bioassay (MBA)

The mouse bioassay (MBA), a lethal assay, is the standard procedure for detection of BoNT. Mice are injected intraperitoneally with a sample suspected of containing toxin and monitored for as long as 4 day. BoNT potency is defined by the MBA and, by definition, the limit of detection is 1 LD₅₀. This value represents the results of serial dilutions of BoNT in which each dilution is injected intraperitoneally into 8-10 mice; 1 LD₅₀ is the amount of toxin that produces botulism in 50% of

the mice at a single dilution (for example, if 10 mice were injected with 1 LD₅₀, only 5 would be expected to show signs of botulism). Although the MBA typically is positive within 24 h, many clinical specimens have low levels of toxin (less than 4 LD₅₀/mL) which may not be evident within 4 days. If a sample is positive for botulinum neurotoxin, mice develop ruffled fur, a narrowed waist (due to respiratory failure), and muscle weakness. The toxin type can be determined by adding type-specific antitoxins to aliquots of the diluted sample; mice injected with a toxin-containing sample that also contains antitoxin do not exhibit symptoms of botulism. The MBA has been used to detect BoNT in a wide variety of matrices, including serum, stool, vomitus, gastric content, enema wash with sterilized water, food, tissue samples, and culture supernatants. Detection and typing of neurotoxin in serum and supernatant of culture were previously described by Hatheway et al.¹⁴ The neutralization test was conducted using monovalent botulism antitoxin reagent and performed according by qualified laboratories from the Biological Reagents Program, CDC. The protocol was approved by the National

Identification of *C. botulinum* DNA by multiplex PCR

C. botulinum were grown in Wilkins Charlgren broth (WB), incubated anaerobically at 35°C for 48 h, and bacterial cells were harvested by low speed centrifugation. Cell pellets were re-suspended in 1 mL of distilled water and chromosomal DNA were extracted using the QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA), according to the manufacturer's instructions and stored at 4°C until use. The multiplex PCR utilized for BoNT identification was performed as previously described by Lindstrom et al.¹⁷ The primers were as following, CBMLA1: 5'AGC TAC GGA GGC AGC TAT GTT3', CBMLA2: 5'CGT ATT TGG AAA GCT GAA AAG G3' for bont/A, CBMLB1: 5'CAG GAG AAG TGG AGC GAA AA3', CBMLB2: 5'CTT GCG CCT TTG TTT TCT TG3' for bont/B, CBMLE1: 5'CCA AGA TTT TCA TCC GCC TA3', CBMLE2: 5'GCT ATT GAT CCA AAA CGG TGA3' for bont/E and CBMLF1: 5'CGG CTT CAT TAG AGA ACG GA3', CBMLF2: 5'TAA CTC CCC TAG CCC CGT AT3' for bont/F. Thirty microliters of reaction

composed of 0.5 µL of extracted DNA template, 0.1 µM of each primer, 200 nM of each deoxynucleotide triphosphate (dNTP), 5X Buffer, 1U of GoTaq® DNA polymerase and 1.5 mM MgCl₂ (Promega). PCR was done in 35 cycles and the profiles were as followed denaturation at 95°C for 20 sec, annealing at 55°C for 30 sec, extension at 62°C for 2 min. The amplified PCR products were electrophoresed in 2% agarose gels, and stained with ethidium bromide and visualized by UV transilluminator (Syngene, UK). All positive results were confirmed by mouse bioassay.

Sequence analysis of bont genes

The neurotoxin genes of Chaiphum 2014 strain were amplified by PCR using the available sequences on GenBank database. PCR was performed in a 50 µL reaction containing 1 ng extracted DNA, 0.5 µM of each primer, 2.5 mM MgCl₂, 200 µM of each dNTP, 5X Buffer and 2.5 U of GoTaq® DNA polymerase and 1.5 mM MgCl₂ (Promega). Each PCR cycle composed of denaturation at 94°C for 1 min, 55°C for 1 min, 72°C for 1 min and was repeated for 30 times. Final extension was carried out 72°C for 10 min. Amplicons were directly sequenced by primer walking and using the ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Phylogenetic analysis

DNA alignments were created with Clustal-W version 2.0 (<http://www.clustal.org>).¹⁸ A phylogenetic tree was constructed based on the sequences of bont/B using the unweighed pair group (UPGMA) with 1,000 bootstrap replication, and analysed by MEGA program version 5.0.¹⁹

Results

Observation of patients

During the Songkran day (April 15, 2014), all relatives would gather and ate together. The outbreak occurred in Chaiphum Province, the family gathering was 4 persons with 3 female and 1 male, aged between 21 and 38 years. After consumption of the fermented bamboo shoots, all of them had typical food poisoning

ปีที่ 48 ฉบับที่ 1 มกราคม 2558

symptoms. Two persons stayed in the Chaiyaphum Province but one couple returned to Chonburi Province. On April 16, the first female patient with the aged of 27 years (Patient 1), had symptoms with severe pain in the lower right abdomen and admitted at Chaiyaphum Hospital. The doctor diagnosed suspected appendicitis. Upon slight recovery the patient was discharged on April 18. On April 19, she was admitted in hospital again with the symptom of blurred vision, dysarthria, dysphagia. On April 16, another 21-year-old female patient (Patient 2) with symptoms of nausea, vomiting and had diarrhea four times a day admitted in the Chaiyaphum Hospital. Two day later, she had symptoms of blurred vision, slurred speech, numbness of hands, dysphagia and drooping eyelids both. Both patients were diagnosed to be botulism and treated with antitoxin. The patients recovered and could spontaneously breathing after treatment. Likewise, the couple of patients consisted of a aged 38-year-old male (Patient 3) and a 33-year-old female (Patient 4) had symptom of headache, nausea on April 16, 2104, and one day later, they were admitted to Phyathai-Sriracha Hospital with similar

symptoms and subsequently ventilated to support breathing and transferred to the intensive care unit. On April 17, they were diagnosed to be botulism and were treated with antitoxin and the respiratory support indicated the severity of the illness. Eventually, they recovered under medical observation.

Identification of *C. botulinum* and detection of neurotoxin production

C. botulinum type B was identified in three stool specimens and one fermented bamboo shoots by culturing, and multiplex PCR whereas the remain sample was negative (Table 1). All supernatant samples were tested by mouse bioassay, the result of supernatant of all stools and fermented bamboo shoot (13-57-06653) were positive except the sera and fermented bamboo shoot (13-57-06730) as showed in table 1. The amplified PCR products for bont/A, B, E and F were 782 bps, 205 bps, 389 bps and 543 bps, respectively. The bont/B amplicon from Chaiyaphum 2014 strain was detected as shown in figure 1.

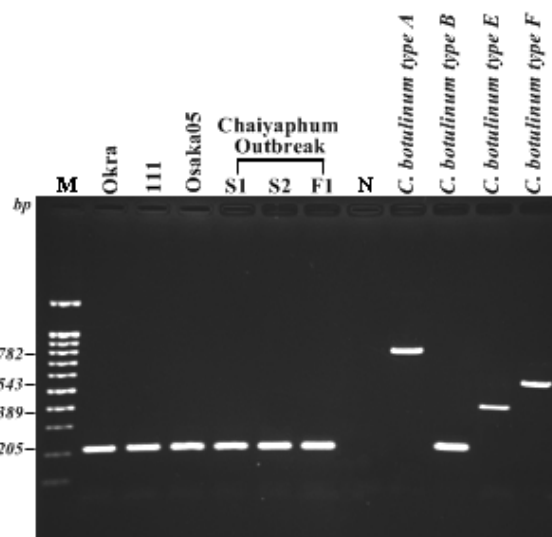


Figure 1. Sequencing analysis of *C. botulinum* bont/B genes from Chaiyaphum 2014 strain

The bont/B8 gene of *C. botulinum* Chaiyaphum 2014 strain showed the identical to Surat Thani 2012 strain (KC 714045) which classified as subtype B8 (Fig 2). The nucleotide sequences determined in this work were submitted to the NCBI database and designated to be accession numbers KM 0673795

Discussions

The information about botulism outbreak in Thailand showed that sources of outbreaks in 1997, 1998 and 2006 were associated with home-canned bamboo shoot preparations contaminated with *C. botulinum* type A.^{20,21} Pork sausage contaminated with *C. botulinum* type A(B) and fermented soy bean and fermented crab contaminated with *C. botulinum* type B8 were previously reported in several outbreaks.^{22,23} The BoNT produced by *C. botulinum* showed sequence differences in both within and between serotypes of wide environmental origin, and has geographical distribution. The gene transfer mechanisms are reportedly responsible for such sequence diversity in this species.² In this outbreak, Chaiphum 2014 strain was identified to be type B8 *C. botulinum* from fermented bamboo shoots samples. For table 1, the toxin was rarely detected in the sera of patients. Woodruff et al studied that the cultures were positive for 51% of stool specimens and toxin testing was positive for 37% of sera.²⁴ The lethal dose of 0.2-10 ng per kg for various animal including human,²⁵ due to MBA is still one of the most sensitive to detect BoNT.²⁶ The main limiting factors for growth of *C. botulinum* in foods are temperature, pH, water activity, redox potential, food preservatives, and competing microorganisms. All of these factors are interrelated and so changing one factor influences the effect of other factors. The interaction of factors may have a positive or negative effect on the inhibition of *C. botulinum*.²⁷ In this study, even the same lot of fermented bamboo shoots, the factors of the different may be the container contaminated with spore of *C. botulinum* and the random sampling which cause the variation of the results.

More than 90% of the outbreaks are caused by home-prepared or home-preserved foods, especially vegetables (asparagus, green beans and peppers),²⁸ dairy and fishery products.^{29,30} Intoxications with *C. botulinum* producing toxin are often associated with vegetable-based products that at some point contained soil with *C. botulinum* spores.³¹ Although heating at 100°C for 10 min can destroy botulinum toxin in food, but the

spores are heat-resistant and can survive even after prolonged heating. The thermo-resistance of *C. botulinum* spores varies by strain and other factors such as the lipid and protein content of the food matrix.³¹ In this outbreak, the patients did not heat the fermented bamboo shoots before eating. Certain environmental conditions, such as the absence of oxygen (anaerobic conditions), a pH of over 4.6, warm temperatures (greater than 4°C), moisture content (water activity) and a lack of competing bacterial flora could promote the botulinum toxin production in foods contaminated with *C. botulinum*.³² The alteration of environmental conditions could increase the pH and allow for the growth of *C. botulinum* and toxin production.

Conclusion

Foodborne botulism remains a public health problem because of its severity and epidemic potential. Our experiential data showed that the etiologic agent of outbreak in Chaiphum Province was fermented bamboo shoot contaminated with *C. botulinum* type B8. The molecular methods allow rapid identification and a better understanding the epidemiology of botulism so that proper preventive protocol has to be prioritized at the hospital level. It seems that variation of toxin variants will need to be produced for therapeutics and vaccine. Source of outbreak of foodborne botulism was associated with consumption of home-made, home-canned products. Improper cooking may have fostered *C. botulinum* growth and toxin formation. To prevent the future botulism outbreaks, raising awareness of botulism related to home-made fermented food and proper cooking process should be advocated.

Acknowledgements

We thank the Bureau of Epidemiology, Department of Disease Control, Ministry of Public Health for the information of clinical and symptom of patients. We thank Dr. T. Ramamurthy, National Institute of Cholera and Enteric Diseases, Kolkata India for his helpful comments on this manuscript.

Reference

1. Arnon SS, Schechter R, Inglesby TV, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, et al Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA* 2001; 285: 1059-70.
2. Hill KK, Smith TJ, Helma CH, Ticknor LO, Foley BT, Svensson RT, et al. Genetic diversity among Botulinum Neurotoxin-producing clostridial strains. *J Bacteriol* 2007; 189: 818-32.
3. Dover N, Barash JR, Hill KK, Xie G, Arnon SS. Molecular characterization of a novel botulinum neurotoxin type H gene. *J Infect Dis.* 2014; 209: 192-202.
4. Mazuet C, Sautereau J, Legeay C, Bouchier C, Bouvet P, Popoff MR. An atypical outbreak of foodborne botulism due to types B and E from ham. *J Clin Microbiol.* 2014; Nov 26. pii: JCM.02942-14.
5. Feng L, Chen X, Liu S, Zhou Z, Yang R. Two-family outbreak of botulism associated with the consumption of smoked ribs in Sichuan Province, China. *Int J Infect Dis.* 2014; 30: 74-7.
6. Walton RN, Clemens A, Chung J, Moore S, Wharton D, Haydu L, et al. Outbreak of type E foodborne botulism linked to traditionally prepared salted fish in Ontario, Canada *Foodborne Pathog Dis.* 2014; 10: 830-4.
7. Takeshi K, Fujinaga Y, Inoue K, Nakajima H, Oguma K, Ueno T, et al. Simple method for detection of *Clostridium botulinum* type A to F neurotoxin genes by polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol* 1996; 40: 5–11.
8. Nordic Committee on Food Analysis. Botulinum toxin. Detection in foods, blood and other test materials. Method no. 79, 2nd ed., Finland: NCFA Espoo. 1991
9. Nevas M, Lindström M, Hielm, Björkroth KJ, Peck MW, Korkeala H. Diversity of proteolytic *Clostridium botulinum* strains, determined by a pulsed-field gel electrophoresis approach. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71: 1311-7.
10. Keto-Timonen R, Nevas M, Korkeala H. Efficient DNA fingerprinting of *Clostridium botulinum* types A, B, E, and F by amplified fragment length polymorphism analysis. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71: 1148-54.
11. Jacobson MJ, Lin G, Whittam TS, Johnson EA. Phylogenetic analysis of *Clostridium botulinum* type A by multi-locus sequence typing. *Microbiol.* 2008; 154: 2408-15.
12. Lindström M, Korkeala H. Laboratory diagnostics of botulism. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19: 298–314.
13. Aranda E, Rodriguez MM, Asensio MA, Cordoba JJ. Detection of *Clostridium botulinum* types A, B, E and F in foods by PCR and DNA probe. *Lett Appl Microbiol.* 1997; 25: 186–90.
14. Hatheway CL. Botulism. In Balows A, Hausler, WH, Ohashi M and Turnano A (eds.), *Laboratory diagnosis of infectious disease: Principles and Practice*, vol 1. New York: Springer-Verlag 1988; 112-133.
15. Dowell VR Jr, Hawkins TM. Laboratory methods in anaerobic bacteriology *CDC Laboratory Manual.* Atlanta: DHEW Publication. 1987; 8272.
16. Holdeman LV, Cato EP, Moore WEC. *Anaerobe Laboratory Manual* 4ed Blacksburg: Virginia Polytechnic Institute and State University 1977; 156.
17. Lindström M, Keto R, Markkula A, Nevas M, Hielm S, Korkeala H. Multiplex PCR assay for detection and identification of *Clostridium botulinum* types A, B, E, and F in food and fecal material. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67: 5694-9.
18. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *BMC.* 2007; 23: 2947-8.

19. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 2011; 28: 2731-9
20. Swaddiwudhipong W, Wongwatcharapaiboon P. Foodborne botulism outbreaks following consumption of home-canned bamboo shoots in Northern Thailand. *J Med Assoc Thai.* 2000; 83: 1021-5.
21. Centers for Disease Control and Prevention. Botulism from home-canned bamboo Shoots -- Nan Province, Thailand, March 2006. *MMWR.* 2006; 55: 389-92.
22. Wangroongsarb P, Kohda T, Jittaprasartsin C, Suthivarakom K, Kamthlang T, Umeda K, et al. Molecular characterization of *Clostridium botulinum* isolates from foodborne outbreaks in Thailand, 2010. *PLoS One.* 2014; 9(1): e77792
23. Wangroongsarb P, Jittaprasartsin C, Suthivarakom K, Kamthlang T, Yeesoonsang S, Sangkitporn S. An outbreak of foodborne botulism in Surat Thani Province, Thailand, 2012. *Jpn J Infect Dis.* 2013; 66: 353-4.
24. Woodruff BA, Griffin PM, McCroskey LM, Smart JF, Wainwright RB, Bryant RG, et al. Clinical and laboratory comparison of botulism from toxin types A, B, and E in the United States, 1975-1988. *J Infect Dis* 1992; 166: 1281-6.
25. Scarlatos A, Welt BA, Cooper BY, Archer D, DeMarse T, Chau KV. Methods for detecting botulinum toxin with applicability to screening foods against biological terrorist attacks. *Journal of Food Science* 2005; 70: 121-30.
26. Sidell FR, Takafuji ET, Franz DR, eds. Medical aspects of chemical and biological warfare. Department of the Army, Washington, DC: Office of The Surgeon General and Borden Institute. 1997.
27. Centers for Disease Control and Prevention. Botulism in the United States, 1899–1996, handbook for epidemiologists, clinicians and laboratory workers. Atlanta: The Centers. 1998.
28. St Louis ME. Botulism. In: Evans AS, Brachman P, eds. *Bacterial infections of humans: Bacteriology and Control.* 2nded. New York: Plenum Publishing. 1991
29. Lindström M, Myllykoski J, Sivelä S, Korkeala H. *Clostridium botulinum* in cattle and dairy products. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2010; 50: 281-304.
30. Aberoumand A. Occurrence of *Clostridium botulinum* in fish and fishery products in retail trade. *World J Fish & Marine Sci.* 2010; 2: 246-50.
31. King LA. French Multidisciplinary Outbreak Investigation Team Two severe cases of botulism associated with industrially produced chicken enchiladas, France, August 2008. *Euro Surveill.* 2008; 13: pii: 18978
32. Loutfy MR, Austin JW, Blanchfield B, Fong IW. An outbreak of foodborne botulism in Ontario. *Can J Infect Dis.* 2003; 14: 206–9.

Figure legend

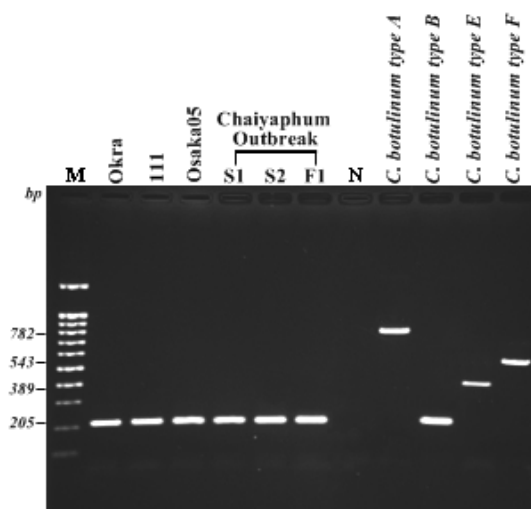


Fig 1. Multiplex PCR for typing of Chaiphaphum 2014 strain.

Lane M and N are 100 bp DNA marker and negative. Lane 1-6 were the bont/B amplicon (205 bps) from strain Okra, 111, Osaka05, Chaiphaphum 2014 (S1, S2 and F1), respectively. Lane 7-10 were the bont/A (782 bps), bont/B (205 bps), bont/E (389 bps) and bont/F (543bps) amplicons from *C. botulinum* type A (DMST27808), type B (DMST27809), type E (DMST48795) and type F (DMST 27810), respectively.

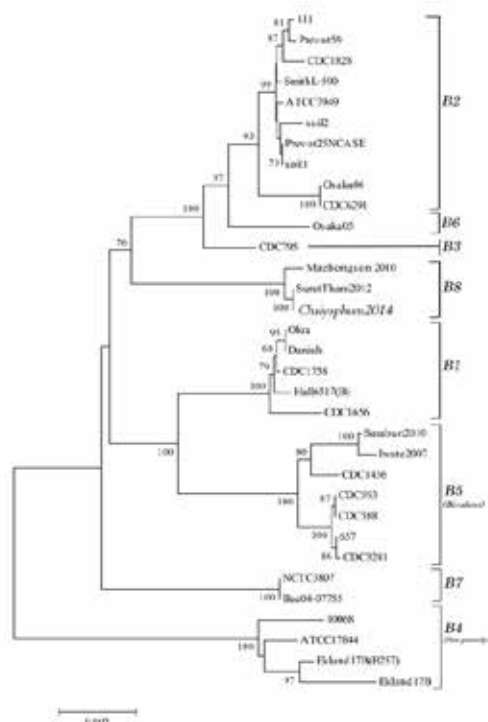


Fig 2. Comparison of the amino acid sequences of bont/B1 to B8 subtypes.

The phylogenetic analysis of nucleotide sequences representing all bont/ B. One representative of each subtype is shown. The phylogenetic tree was generated using the neighbor-joining method and p-distance model. Genetic distance and bootstrap values are shown. Botulinum toxin subtypes, and strains and Genbank accession numbers used in the analysis are as follows: B1 = Okra (AB232927); CDC1758 (EF033127); Danish (M81186); Hall6517(B) (EF028399); CDC1656 (EF028396); B2 = 111 (AB302854); Prevot25 NCASE (EF033129); ATCC7949 (EF028395); Smith L-590 (EF028398); Prevot59 (EF033128); CDC1828 (EF051571); CDC6291 (EF028401); Osaka06 (AB302853); Korean soil 1 (DQ417353); Korean soil 2 (DQ417354); B3= CDC795 (EF28400); B4= Eklund 17B (X71343); 10068 (EF028402); Eklund 17B (B257) (EF051570); ATCC17844 (EF028394); B5= CDC593 (AF300466); CDC1436 (AF295926); 657Ba (EF033130); CDC588 (AF300465); CDC3281 (Y13630); Iwate 2007 (AB665556); Saraburi 2010 (JQ964804); B6=Osaka05 (AB302852); B7 = Bac-04-07755 (JQ354985); NCTC3807 (JN120760); B8 = Maehongson 2010 (JQ964806); Surat Thani 2012 (KC714045); Chaiphaphum 2014 (KM0673795)

TABLE LEGEND

Table 1. Chaiyaphum 2014 outbreaks identified by using culture, mouse bioassays and molecular techniques.

Sample			received date	Mouse bioassay				Isolation C. botulinum	Molecular typing
				A	B	E	F		
Sera	Patient 1	13-57-06635 (BT)	22 April 57	A	A	A	A	ND	ND
	Patient 2	13-57-06636 (BT)	22 April 57	A	A	A	A	ND	ND
	Patient 3	13-57-06724 (BT)	28 April 57	A	A	A	A	ND	ND
		13-57-06725 (AT)	28 April 57	A	A	A	A	ND	ND
	Patient 4	13-57-06726 (BT)	28 April 57	A	A	A	A	ND	ND
		13-57-06727 (AT)	28 April 57	A	A	A	A	ND	ND
Stool	Patient 1	13-57-06637 (S1)	22 April 57	D	A	D	D	+	B8
	Patient 3	13-57-06728 (S2)	1 May 57	D	A	D	D	+	B8
	Patient 4	13-57-06729	1 May 57	D	A	D	D	+	B8
Fermented bamboo shoots	2 samples	13-57-06653 (F1)	22 April 57	D	A	D	D	+	B8
		13-57-06730	1 May 57	A	A	A	A	-	ND

อิทธิพลของอายุต่อค่าความคลาดเคลื่อนคงที่ของการรับรู้ตำแหน่งข้อต่อรยางค์ส่วนล่าง

The influence of age on the constant error of joint position sense of the lower extremities

■ อรุณีย์ พรหมศรี*
Arunee Promsri*

สาขาวิชากายภาพบำบัด คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา
Department of Physical Therapy, Faculty of Allied Health Sciences, University of Phayao

*Corresponding author (Email: arunee.pr@up.ac.th)

Received December 2014

Accepted as revised January 2015

Abstract

Introduction: Proprioception is the sense of knowing of joint position and kinesthetic movement. Proprioceptive feedback is also an importance in the control of voluntary movements. Impaired proprioceptive acuity with advancing age is an interesting topic for study.

Objectives: The purpose of this study was to compare the constant error of joint position sense (CEJPS) of the lower extremities between the young adult (20-35 yr.), middle-aged adult (40-55 yr.) and older adult (60-75 yr.) groups, and to compare the CEJPS between dominant and non-dominant legs in each individual group.

Material and methods: Twenty subjects in each group were blinded and instructed to be measured the error of joint position sense (EJPS) of both dominant and non-dominant legs in standing position, and the EJPS was calculated to be the CEJPS for statistical analysis. The CEJPS of all groups was analyzed by one way ANOVA for between subject effects, and were compared within subject effect by paired sample t-test.

Results: For between subject effects, the CEJPS of the lower extremities of all groups was significantly different in both dominant and non-dominant legs at $p=0.000$ and $p=0.001$, respectively. The CEJPS of the older adult group was significantly higher than the young adult and middle-aged adult groups, while the CEJPS between the young adult and middle-aged adult groups was not different. In other hand, for within subject effect, the CEJPS of both dominant and non-dominant legs in all groups was not different.

Conclusions: Advancing age was significantly influenced on the increasing of the CEJPS of lower extremities, and the difference between dominant and non-dominant legs was not influence on the joint position sense of the lower extremities.

Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2015; 48(1): 59-66. Doi: 10.14456/jams.2015.1

Keywords: proprioception, joint position sense, kinesthesia, ageing

บทคัดย่อ

บทนำ: การรับรู้อากัปกริยาเป็นการรับรู้ข้อมูลเกี่ยวกับตำแหน่งข้อต่อและการเคลื่อนไหว ซึ่งข้อมูลป้อนกลับจากการรับรู้อากัปกริยายังเป็นสิ่งสำคัญในการควบคุมการเคลื่อนไหวภายใต้อำนาจจิตใจ โดยความบกพร่องของความแม่นยำในการรับรู้อากัปกริยาจากอายุที่เพิ่มมากขึ้นถือเป็นหัวข้อที่น่าสนใจศึกษา

วัตถุประสงค์: การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบค่าความคลาดเคลื่อนคงที่ของการรับรู้ตำแหน่งข้อต่ออย่างครึ่งส่วนล่างในท่ายืนระหว่างกลุ่มผู้ใหญ่ตอนต้น (20-35 ปี) ผู้ใหญ่ตอนกลาง (40-55 ปี) และผู้สูงอายุ (60-75 ปี) และเพื่อเปรียบเทียบค่าความคลาดเคลื่อนคงที่ของการรับรู้ตำแหน่งข้อต่ออย่างครึ่งส่วนล่างในท่ายืนภายในกลุ่มผู้เข้าร่วมการศึกษาทั้งสามกลุ่ม

วัสดุและวิธีการศึกษา: ผู้เข้าร่วมการศึกษาจำนวนกลุ่มละ 20 คน ได้รับการปิดตาและการทดสอบความคลาดเคลื่อนของการรับรู้ตำแหน่งของข้อต่ออย่างครึ่งส่วนล่างในท่ายืนของขาต้านหน้าและด้านไม่ถนัด และค่าความคลาดเคลื่อนของการรับรู้ตำแหน่งข้อต่อถูกนำไปคำนวณหาค่าความคลาดเคลื่อนคงที่สำหรับการวิเคราะห์ทางสถิติ โดยค่าความคลาดเคลื่อนคงที่ของการรับรู้ตำแหน่งของข้อต่อของทุกกลุ่มถูกนำมาวิเคราะห์ระหว่างกลุ่มโดยใช้สถิติ One way ANOVA และเปรียบเทียบภายในกลุ่มใช้สถิติ Paired sample t-test

ผลการศึกษา: สำหรับการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม ค่าความคลาดเคลื่อนคงที่ของการรับรู้ตำแหน่งข้อต่ออย่างครึ่งส่วนล่างของทุกกลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งของขาต้านหน้าและด้านไม่ถนัดที่ระดับนัยสำคัญ $p=0.000$ และ $p=0.001$ ตามลำดับ โดยค่าความคลาดเคลื่อนคงที่ของการรับรู้ตำแหน่งข้อต่อของกลุ่มผู้สูงอายุมีค่ามากกว่ากลุ่มผู้ใหญ่ตอนต้นและกลุ่มผู้ใหญ่ตอนกลางอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ค่าความคลาดเคลื่อนคงที่ของการรับรู้ตำแหน่งข้อต่อระหว่างกลุ่มกลุ่มผู้ใหญ่ตอนต้นและกลุ่มผู้ใหญ่ตอนกลางไม่มีความแตกต่างกัน ในทางตรงข้าม สำหรับการเปรียบเทียบภายในกลุ่มที่ค่าความคลาดเคลื่อนคงที่ของการรับรู้ตำแหน่งของข้อต่อระหว่างขาต้านหน้าและด้านไม่ถนัดของทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน

สรุปผลการศึกษา: อายุที่เพิ่มขึ้นมีอิทธิพลต่อการเพิ่มขึ้นของความคลาดเคลื่อนคงที่ของการรับรู้ตำแหน่งข้อต่ออย่างครึ่งส่วนล่างและความแตกต่างระหว่างขาต้านหน้าและด้านไม่ถนัดไม่มีผลต่อการรับรู้ตำแหน่งของข้อต่ออย่างครึ่งส่วนล่าง

วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2558; 48(1): 59-66. Doi: 10.14456/jams.2015.1

คำรหัส: การรับรู้อากัปกริยา การรับรู้ตำแหน่งข้อต่อ การรับรู้การเคลื่อนไหว สูงอายุ

บทนำ

การรับรู้อากัปกริยา (proprioception) หมายถึง การรับรู้ตำแหน่งของร่างกายที่สัมพันธ์กับพื้นที่หรือสิ่งแวดล้อมโดยพื้นฐานแบ่งออกเป็นการรับรู้อากัปกริยาแบบอยู่นิ่ง (static) ได้แก่ การรับรู้ตำแหน่งหรือท่าทางของข้อต่อ (joint position sense) และแบบเคลื่อนไหว (dynamic) ได้แก่ การรับรู้การเคลื่อนไหวของร่างกาย (kinesthetic movement sense)¹ แม้ว่าองค์ประกอบพื้นฐานของการรับรู้อากัปกริยาคือการรับรู้ตำแหน่งและการเคลื่อนไหวของข้อต่อหรือส่วนของร่างกาย แต่มักพบว่าการทำกิจกรรมการเคลื่อนไหวต่างๆ ในชีวิตประจำวันอาศัยการทำงานประสานสัมพันธ์ของการรับรู้อากัปกริยาทั้งสองประเภทร่วมกันหรือที่เรียกว่าการรับรู้ตำแหน่งแบบเคลื่อนที่ (dynamic position sense) เช่น การวางถ้วยกาแฟลงบนจานรองจะอาศัยข้อมูลการรับรู้อากัปกริยาทั้งส่วนของความเร็วและตำแหน่งขณะเคลื่อนไหวของทั้งไหล่ ข้อศอก และข้อมือ² เป็นต้น นอกจากนี้ ข้อมูลป้อนกลับ

ของการรับรู้อากัปกริยา (proprioceptive feedback) ยังเป็นปัจจัยสำคัญในการควบคุมการเคลื่อนไหวที่เกิดจากความตั้งใจ (voluntary movement)³ ทั้งยังช่วยในการปรับแต่งการทรงท่า (postural adjustment) และการเคลื่อนไหวให้เหมาะสมกับการทำกิจกรรมต่างๆ⁴ โดยเฉพาะจากรยางค์ส่วนล่างซึ่งมีความสำคัญต่อการทรงตัวและช่วยในเรื่องการประสานสัมพันธ์ของข้อต่อขณะเดิน^{5,6}

การรับรู้อากัปกริยารับข้อมูลมาจากหน่วยรับความรู้สึกจากกล้ามเนื้อ (muscle spindles) เอ็นกล้ามเนื้อ (golgi tendon organ) และข้อต่อ (joint mechanoreceptors) เพื่อให้ร่างกายรับรู้ตำแหน่งหรือการเคลื่อนไหวของอวัยวะต่างๆ ขณะที่มีการทรงท่าหรือการเคลื่อนไหวเพื่อทำกิจกรรม⁴ โดยหน่วยรับความรู้สึกจากกล้ามเนื้อจะไวต่อการกระตุ้นด้วยการยืดทำให้ร่างกายรับรู้ข้อมูลเกี่ยวกับความยาวและความเร็วในการหดตัวของกล้ามเนื้อทำให้บุคคลนั้นๆ สามารถรับรู้ตำแหน่งและการเคลื่อนไหวของร่างกายได้ในขณะที่หน่วยรับความรู้สึก

ปีที่ 48 ฉบับที่ 1 มกราคม 2558

จากเอ็นกล้ามเนื้อจะไวต่อการเปลี่ยนแปลงของแรงดึงตัว กล้ามเนื้อที่เกิดขึ้นจากการหดตัวทั้งจากการเคลื่อนไหวด้วยตนเองและจากผู้อื่นทำให้ นอกจากนี้ หน่วยรับความรู้สึกจากข้อต่อจะรับรู้ความรู้สึกเกี่ยวกับการบิด การเปลี่ยนตำแหน่งของข้อและเอ็นกระดูก และแรงที่กระทำต่อข้อต่อและยังมีส่วนสำคัญในการตรวจสอบตำแหน่งของร่างกายอีกด้วย^{3,4,6,7}

ในทางตรงกันข้าม ความบกพร่องของความแม่นยำในการรับรู้อากัปกริยา (impaired proprioceptive acuity) สามารถเกิดได้จากหลายปัจจัย เช่น การบาดเจ็บต่อระบบโครงร่างและกล้ามเนื้อ โรคเบาหวาน พิษสุราเรื้อรัง การขาดวิตามินบี 12 การได้รับเคมีบำบัด โดยมีการศึกษาพบว่า ผู้ที่เป็นเบาหวานมานานกว่า 10 ปี การรับรู้ความรู้สึกส่วนปลายจะถูกทำลายร้อยละ 25 และหากเป็นเบาหวานนานมากกว่า 20 ปี จะมีโอกาสที่การรับรู้ความรู้สึกส่วนปลายจะลดลงถึงร้อยละ 50⁸ นอกจากนี้ ความบกพร่องของความแม่นยำในการรับรู้อากัปกริยายังพบได้เมื่อเข้าสู่วัยชรา (ageing) เนื่องจากโครงสร้างและการทำหน้าที่ของหน่วยรับความรู้สึกเกี่ยวกับการรับรู้อากัปกริยาเสื่อมลงอันเป็นผลจากกระบวนการเสื่อมตามธรรมชาติ โดยการประเมินการรับรู้อากัปกริยา (proprioceptive assessment) ที่นิยมประเมินในผู้สูงอายุส่วนใหญ่จะเป็นการประเมินความแม่นยำของการรับรู้ตำแหน่งข้อต่อ (proprioceptive acuity) ทั้งในส่วนข้อมุม ระยะเวลา หรือตำแหน่งของการเคลื่อนไหวเมื่อลดปัจจัยด้านการมองเห็นลง^{3,9} Laidlaw และ Hamilton¹⁰ ได้ศึกษาผลของอายุต่อการรับรู้ตำแหน่งข้อต่อ พบว่า กลุ่มบุคคลในช่วงอายุ 17-35 ปี สามารถบอกตำแหน่งของข้อสะโพก ข้อเข่า และข้อเท้า ได้แม่นยำมากกว่ากลุ่มบุคคลในอายุ 50-85 ปี ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Bullock-Saxton และคณะ¹¹ ที่ประเมินผลของอายุต่อความแม่นยำของการรับรู้การกลับคืนตำแหน่งของข้อเข่า (knee joint reposition sense) ในทำนอง โดยศึกษาในกลุ่มผู้ใหญ่ตอนต้น (20-35 ปี) กลุ่มผู้ใหญ่ตอนกลาง (40-55 ปี) และกลุ่มผู้สูงอายุ (60-75 ปี) พบว่า กลุ่มผู้สูงอายุมีความแม่นยำของการรับรู้การกลับคืนตำแหน่งของข้อเข่าน้อยกว่ากลุ่มผู้ใหญ่ตอนต้นและกลุ่มผู้ใหญ่ตอนกลางอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่าความสามารถในการรับรู้ตำแหน่งข้อต่อหรือตำแหน่งของร่างกายถือเป็นปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเคลื่อนไหวและยังสัมพันธ์กับผลของการเปลี่ยนแปลงของร่างกายตามอายุที่เพิ่มมากขึ้น การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ

1) เปรียบเทียบอิทธิพลของอายุต่อค่าความคลาดเคลื่อนครั้งที่ของการรับรู้ตำแหน่งข้อต่ออย่างร้อยละส่วนล่างในทำนองระหว่างกลุ่มผู้ใหญ่ตอนต้น กลุ่มผู้ใหญ่ตอนกลาง และกลุ่มผู้สูงอายุ และ

2) เพื่อเปรียบเทียบค่าความคลาดเคลื่อนครั้งที่ของการรับรู้ตำแหน่งข้อต่ออย่างร้อยละส่วนล่างในทำนองระหว่างขาด้านถนัดและด้านไม่ถนัดภายในกลุ่มผู้เข้าร่วมการศึกษาทั้งสามกลุ่ม

วัสดุและวิธีการศึกษา

1. รูปแบบและกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเชิงวิเคราะห์แบบตัดขวาง (cross-sectional analysis study) ทำการศึกษาในกลุ่มตัวอย่างทั้งเพศชายและเพศหญิงจำนวนเท่ากัน แบ่งเป็นกลุ่มผู้ใหญ่ตอนต้น (young adult) อายุ 20-35 ปี กลุ่มผู้ใหญ่ตอนกลาง (middle-aged adult) อายุ 40-55 ปี และกลุ่มผู้สูงอายุ (older adult) อายุ 60-75 ปี จำนวนกลุ่มละ 20 คน¹¹ โดยผู้เข้าร่วมการศึกษาในกลุ่มผู้สูงอายุต้องผ่านการทดสอบแบบประเมินสมรรถภาพทางสมอง (Thai Mental Stage Examination, TMSE)¹² และได้คะแนนมากกว่าหรือเท่ากับ 23 คะแนน สำหรับเกณฑ์การคัดออกของการศึกษานี้ ได้แก่ ผู้เข้าร่วมการศึกษาที่มีปัญหาการบาดเจ็บของรยางค์ส่วนล่าง ข้อเข่าเสื่อม เบาหวาน และพิษสุราเรื้อรัง

2. เครื่องมือ อุปกรณ์ และวิธีการศึกษา

การศึกษานี้ใช้วิธีวัดขนาดค่าความคลาดเคลื่อนของการรับรู้ตำแหน่ง (position sense) ของข้อต่ออย่างร้อยละส่วนล่าง โดยอาศัยหลักการจดจำอากัปกริยา (proprioceptive memory) โดยผู้รับการทดสอบจะกลับคืนสู่ท่าเริ่มต้นหลังจากที่มีการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งส่วนของร่างกายที่ต้องการทดสอบของท่าเริ่มต้นของด้านที่ทดสอบ (ipsilateral remembered matching tasks)³ การศึกษานี้ใช้วิธีการทดสอบของ Ahmad และคณะ¹³ โดยใช้อุปกรณ์ ได้แก่ เครื่องชั่งน้ำหนัก ไม้บรรทัด ผ้าปิดตา และเทปขาว โดยผู้เข้าร่วมการศึกษามาพบผู้วิจัยเพียงครั้งเดียว และในวันที่ทำการทดสอบผู้เข้าร่วมการศึกษาได้รับคำชี้แจงเกี่ยวกับขั้นตอนการทำวิจัยและผู้วิจัยบันทึกข้อมูลส่วนตัวของผู้เข้าร่วมการศึกษา ได้แก่ อายุ น้ำหนัก ส่วนสูง โรคประจำตัว ขาด้านถนัด พฤติกรรมการดื่มสุรา จากนั้น ผู้เข้าร่วมการศึกษาก็ได้รับการอธิบาย การสาธิต และทดลองทำการทดสอบก่อนการศึกษาจริง โดยผู้เข้าร่วมการศึกษทำการทดสอบโดยไม่สวมรองเท้าและได้รับการปิดตาด้วยผ้าปิดตา เมื่อเริ่มการทดสอบผู้เข้าร่วมการศึกษาก็ได้รับคำสั่งให้ยืนตรงโดยให้ปลายเท้าตรงกับบริเวณกึ่งกลางของเทปขาวที่ผู้วิจัยกำหนดไว้ เมื่อเริ่มทำการทดสอบผู้วิจัยจะออกคำสั่งแก่ผู้เข้าร่วมการศึกษาคือ “เริ่ม” จากนั้น ให้ผู้เข้าร่วมการศึกษาก้าวเข้ามารองเท้าขึ้นให้ได้มุมการข้อสะโพกและข้อเข่า 90 องศา และกลับสู่ท่าเริ่มต้น (รูปที่ 1)

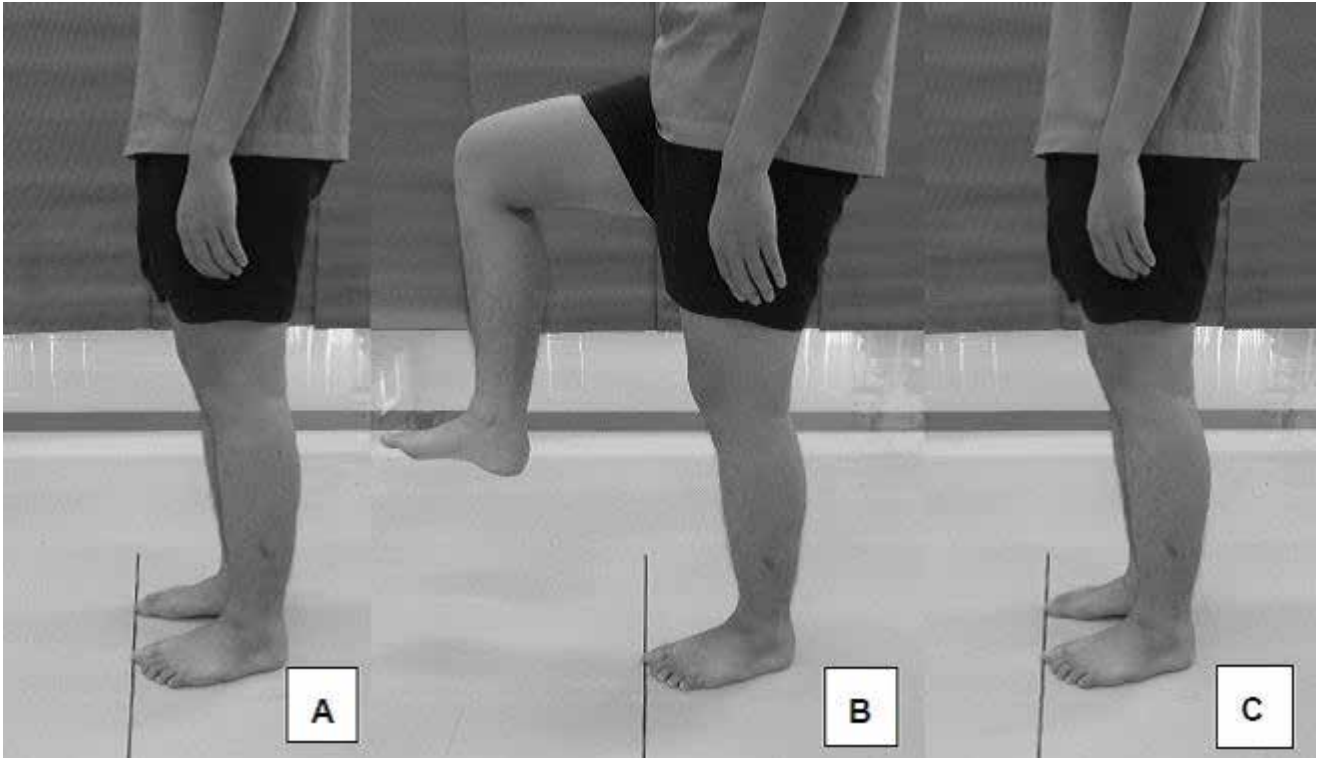


Figure 1. Standing proprioception test: A, Initial position; B, Flexed position; C, Return to initial position.

โดยผู้วิจัยบันทึกค่าขนาดของความคลาดเคลื่อนในการรับรู้การกลับคืนตำแหน่งของข้อต่อร่างกายส่วนล่างที่อาจเกิดขึ้นโดยวัดจากตำแหน่งกึ่งกลางของเทปขาวไปยังปลายนิ้วหัวแม่มือของขาข้างที่รับการทดสอบ ทั้งนี้ ผู้เข้าร่วมการศึกษาแต่ละคนจะได้รับการทดสอบจำนวน 3 ครั้ง มีระยะเวลาพักแต่ละครั้งของการทดสอบนาน 2 นาที และเมื่อทำการทดสอบครบทั้ง 3 ครั้ง โดยผู้เข้าร่วมการศึกษามีเวลาพัก 5 นาที ระหว่างการทดสอบของขาข้างหนึ่งและด้านไม่ถนัด นำค่าความคลาดเคลื่อนของการรับรู้ตำแหน่งข้อต่อร่างกายส่วนล่างไปคำนวณหาค่าความคลาดเคลื่อนคงที่ (constant error) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติต่อไป

3. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1) ใช้สถิติเชิงพรรณนาในการอธิบายผลเกี่ยวกับข้อมูลพื้นฐานของผู้เข้าร่วมการศึกษา

2) ใช้สถิติ one-way ANOVA ในการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความคลาดเคลื่อนคงที่ของการรับรู้ตำแหน่งข้อต่อร่างกายส่วนล่างของด้านถนัดและด้านไม่ถนัดระหว่างกลุ่มผู้เข้าร่วมการศึกษา (between subjects effect) และ

3) ใช้สถิติ paired sample t-test ในการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าความคลาดเคลื่อนคงที่ (constant error) ของการรับรู้ตำแหน่งข้อต่อร่างกายส่วนล่างระหว่างด้านถนัดและด้านไม่ถนัดของกลุ่มผู้เข้าร่วมการศึกษากลุ่ม (within subjects effect)

ผลการวิจัย

ผู้เข้าร่วมการศึกษามีจำนวน 60 คน แบ่งเป็นกลุ่มผู้ใหญ่ตอนต้น (อายุ 20-35 ปี) กลุ่มผู้ใหญ่ตอนกลาง (อายุ 40-55 ปี) และกลุ่มผู้สูงอายุ (อายุ 60-75 ปี) จำนวนกลุ่มละ 20 คน โดยในแต่ละกลุ่มมีจำนวนผู้เข้าร่วมการศึกษเพศชายและเพศหญิงกลุ่มละ 10 คน โดยกลุ่มผู้ใหญ่ตอนต้นมีจำนวนผู้ที่ถนัดขาขวา จำนวน 17 คน (ร้อยละ 85) กลุ่มผู้ใหญ่ตอนกลางมีจำนวนผู้ที่ถนัดขาขวา จำนวน 19 คน (ร้อยละ 95) และกลุ่มผู้สูงอายุมีจำนวนผู้ที่ถนัดขาขวาจำนวน 19 คน (ร้อยละ 95)

Table 1. Subjects demographic data (mean $\pm$ standard deviation).

Data	Young adult	Middle-aged adult	Older adult	p-value
Age (years)	22.20 $\pm$ 3.56 ^{1,2}	48.90 $\pm$ 3.47 ³	67.80 $\pm$ 5.21	0.000*
Weight (kilogram)	59.25 $\pm$ 13.62	61.75 $\pm$ 14.04 ³	51.90 $\pm$ 9.80	0.045*
Height (centimeter)	166.65 $\pm$ 9.07 ^{1,2}	158.15 $\pm$ 6.59	156.15 $\pm$ 6.20	0.000*
Body mass index (kilogram/meter ²)	21.21 $\pm$ 3.72 ¹	24.59 $\pm$ 4.93 ³	21.17 $\pm$ 3.25	0.012*

* One-Way ANOVA is significant at $p < 0.05$.

¹ Post Hoc Test is significant between young adult group and middle-aged adult group.

² Post Hoc Test is significant between young adult group and older adult group.

³ Post Hoc Test is significant between middle-aged adult group and older adult group.

จากตารางที่ 1 แสดงข้อมูลพื้นฐานของผู้เข้าร่วมการศึกษา พบว่า อายุ น้ำหนัก ส่วนสูง และค่าดัชนีมวลกายของผู้เข้าร่วมการศึกษาทั้ง 3 กลุ่ม มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่าน้ำหนักตัวของผู้เข้าร่วมการศึกษาในกลุ่มผู้ใหญ่ตอนกลางมีค่าน้ำหนักเฉลี่ยสูงที่สุดโดยมีน้ำหนักมากกว่ากลุ่มผู้สูงอายุอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่

$p = 0.017$ และส่วนสูงของกลุ่มผู้ใหญ่ตอนต้นมีค่ามากกว่ากลุ่มผู้ใหญ่ตอนกลางและกลุ่มผู้สูงอายุอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p = 0.001$ และ $p = 0.000$ ตามลำดับ ในขณะที่ค่าดัชนีมวลกายของกลุ่มผู้ใหญ่ตอนกลางมีค่ามากที่สุดและมีค่ามากกว่ากลุ่มผู้ใหญ่ตอนต้นและกลุ่มผู้สูงอายุอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p = 0.010$ และ $p = 0.010$ ตามลำดับ

Table 2. Comparison of the constant error of joint reposition sense (centimeter) of the lower extremities between young adult, middle aged adult, and older adult groups (within subject effect and between subject effects).

Data	Constant error of joint eposition			One-Way ANOVA
	Young adult	Middle-aged adult	Older adult	(p-value)
Dominant leg	1.73 $\pm$ 0.78 ¹	192 $\pm$ 0.92 ²	3.65 $\pm$ 2.47	0.000*
Non-dominant leg	1.48 $\pm$ 0.94 ¹	152 $\pm$ 0.76 ²	2.59 $\pm$ 1.16	0.001*
Paired-Sample T Test (p-value)	0.153	0.346	0.144	-

* One-Way ANOVA is significant at $p < 0.05$.

¹ Post Hoc Test is significant between young adult group and older adult group.

² Post Hoc Test is significant between middle-aged adult group and older adult group.

จากตารางที่ 2 แสดงข้อมูลขนาดของค่าความคลาดเคลื่อนของการกลับคืนสู่ตำแหน่งข้อต่อของข้อต่อส่วนล่างพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างทั้ง 3 กลุ่มของผู้เข้าร่วมการศึกษาทั้งด้านหน้าและด้านไม่ถนัด โดยพบว่าขนาดของความคลาดเคลื่อนของการรับรู้ตำแหน่งข้อต่อของข้อต่อส่วนล่างของขาหน้าของของผู้สูงอายุมีค่ามากที่สุดและมีค่ามากกว่ากลุ่มผู้ใหญ่ตอนต้นและกลุ่มผู้ใหญ่ตอนกลางอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p = 0.000$ และ $p = 0.001$

ตามลำดับ นอกจากนี้ ขนาดของความคลาดเคลื่อนของการรับรู้ ตำแหน่งข้อต่อของข้อต่อส่วนล่างของด้านไม่ถนัดในกลุ่มผู้สูงอายุยังมีค่ามากที่สุดและมีค่ามากกว่ากลุ่มผู้ใหญ่ตอนต้นและกลุ่มผู้ใหญ่ตอนกลางอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p = 0.001$ และ $p = 0.001$ ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ขนาดของค่าความคลาดเคลื่อนของการรับรู้ตำแหน่งข้อต่อของข้อต่อส่วนล่างของกลุ่มผู้ใหญ่ตอนต้นและกลุ่มผู้ใหญ่ตอนกลางทั้งด้านหน้าและด้านไม่ถนัดไม่มีค่าแตกต่างกัน

จากการศึกษาอิทธิพลของอายุต่อค่าความคลาดเคลื่อนครั้งที่ของการรับรู้ตำแหน่งข้อต่อของร่างกายส่วนล่างในผู้เข้าร่วมการศึกษาที่มีอายุระหว่าง 20-75 ปี ที่มีสุขภาพดี ไม่มีประวัติการเจ็บป่วย และโรคประจำตัวที่อาจส่งผลต่อการรับรู้เกี่ยวกับปฏิกิริยา ผลการศึกษา พบว่า ค่าความคลาดเคลื่อนครั้งที่ของการรับรู้ตำแหน่งข้อต่อของร่างกายส่วนล่างระหว่างด้านหน้าและด้านหลังไม่แตกต่างกันในกลุ่มผู้เข้าร่วมการศึกษาแต่ละกลุ่ม (within subject effect) ไม่พบความแตกต่างกันแสดงให้เห็นว่าอิทธิพลของขาข้างหนึ่งไม่ส่งผลต่อการรับรู้ตำแหน่งของข้อต่อ และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้เข้าร่วมการศึกษาแต่ละกลุ่ม (between subject effect) พบว่า ค่าความคลาดเคลื่อนครั้งที่ของการรับรู้ตำแหน่งข้อต่อของร่างกายส่วนล่างมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทั้งการทดสอบในด้านหน้าและด้านหลัง โดยพบว่าค่าความคลาดเคลื่อนครั้งที่ของการรับรู้ตำแหน่งข้อต่อของกลุ่มผู้สูงอายุ (60-75 ปี) มีค่ามากกว่ากลุ่มผู้ใหญ่ตอนต้น (20-35 ปี) และกลุ่มผู้ใหญ่ตอนกลาง (40-55 ปี) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตาม พบว่าค่าความคลาดเคลื่อนครั้งที่ของการรับรู้ตำแหน่งข้อต่อของกลุ่มผู้ใหญ่ตอนต้นและผู้ใหญ่ตอนกลางไม่แตกต่างกัน แต่มีแนวโน้มที่ค่าความคลาดเคลื่อนครั้งที่ของกลุ่มผู้ใหญ่ตอนกลางมีค่ามากกว่ากลุ่มผู้ใหญ่ตอนต้น ข้อมูลนี้ชี้ให้เห็นว่าร่างกายของวัยผู้ใหญ่ตอนกลางเริ่มปรากฏความเสื่อมของการรับรู้เกี่ยวกับปฏิกิริยา สอดคล้องกับการศึกษาของ Laidlaw และ Hamilton¹⁰ ที่ศึกษาผลของอายุต่อการรับรู้ตำแหน่งข้อต่อ โดยพบว่ากลุ่มบุคคลอายุระหว่าง 17-35 ปี สามารถบอกตำแหน่งของข้อสะโพก ข้อเข่า และข้อเท้าได้แม่นยำกว่ากลุ่มบุคคลที่มีอายุระหว่าง 50-85 ปี นอกจากนี้ Bullock-Saxton และคณะ¹¹ ได้ศึกษาผลของอายุต่อความแม่นยำของการรับรู้ตำแหน่งของข้อเข่าในท่ายืนระหว่างกลุ่มอายุ 20-35 ปี กลุ่มอายุ 40-55 ปี และกลุ่มอายุ 60-75 ปี พบว่า ความแม่นยำของการรับรู้ตำแหน่งของข้อเข่าระหว่างกลุ่มมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในการทดสอบแบบยืนลงน้ำหนักบางส่วน (partial weight bearing) ในขณะที่การทดสอบยืนลงน้ำหนักเต็มที่ (full weight bearing) ไม่พบความแตกต่าง จากข้อมูลข้างต้นชี้ให้เห็นว่าอายุที่เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะเมื่อเข้าสู่วัยสูงอายุ ความแม่นยำของการรับรู้ตำแหน่งข้อต่อมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับช่วงวัยอื่น ซึ่งอาจเป็นผลมาจากกระบวนการเสื่อมของวัยสูงอายุ (ageing-related changes) ที่โครงสร้างและการทำหน้าที่ของร่างกายของผู้สูงอายุมีความเสื่อมลงตามธรรมชาติ นอกจากนี้ มีการศึกษาเชิงสรีรวิทยาระบบประสาท พบว่า ความบกพร่องของการรับรู้เกี่ยวกับปฏิกิริยาในผู้สูงอายุเกี่ยวข้องกับการทำงานของทั้งระบบประสาทส่วนกลาง

(central nervous system) และระบบประสาทส่วนปลาย (peripheral nervous system) โดยในระดับระบบประสาทส่วนปลายที่พบการเปลี่ยนแปลงของหน่วยรับความรู้สึกทั้งที่อยู่ในกล้ามเนื้อ (muscle spindles) ที่ทำหน้าที่รับรู้ตำแหน่งและการเคลื่อนไหวของข้อโดยพบการหนาตัวของแคปซูลเพิ่มขึ้น (increased capsular thickness) เส้นผ่าศูนย์กลางลดลง (decreased spindle diameter) ความเร็วในการตอบสนองลดลง (decreased sensitivity) จำนวนใยกล้ามเนื้อ (intrafusal muscle fibers) น้อยลง และมีการบวมของแกนประสาทนำออก (axonal swelling) ซึ่งเป็นผลจากเส้นประสาทถูกทำลาย (denervation) นอกจากนี้ หน่วยรับความรู้สึกเชิงกลจากผิวหนังและใต้ผิวหนัง (cutaneous and subcutaneous mechanoreceptor) ในวัยสูงอายุยังมีจำนวนลดลงและค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของหน่วยรับความรู้สึกต่อหนึ่งหน่วยของผิวหนังยังลดลงอีกด้วย ได้แก่ พาซิเนียน คอปัสเซล (pacinian corpuscles) ที่ทำหน้าที่รับรู้การสั่นสะเทือน และไมสเนอร์ คอปัสเซล (meissner's corpuscles) ที่ทำหน้าที่การแยกจุดสัมผัส ซึ่งส่งผลให้การรับรู้ความรู้สึกสัมผัสและการรับสัมผัสลดลงโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่บริเวณฝ่าเท้า ทั้งยังส่งผลให้เกิดความไม่มั่นคงของการทรงตัวและการเคลื่อนไหว¹⁴ โดยมีการศึกษาพบว่า การลงน้ำหนักแบบเต็มที่ (full weight bearing) สามารถช่วยเพิ่มความสามารถในการรับรู้ตำแหน่งข้อต่อได้ดีขึ้นเนื่องจากมีการกระตุ้นการรับรู้ของหน่วยรับความรู้สึก (receptor activation)¹¹ เช่นเดียวกับหน่วยรับความรู้สึกจากข้อต่อ (joint mechanoreceptors) ที่มีจำนวนลดลงทั้งรฟฟินิ เอนดิง (ruffini ending) พาซิเนียน คอปัสเซล (pacinian corpuscles) และกอลจิ-เทนดอน (golgi-tendon)³ ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงของระบบประสาทส่วนกลางที่เกี่ยวกับการรับรู้เกี่ยวกับปฏิกิริยาพบว่าในวัยสูงอายุมีการสูญเสียนิวรอล ซับสเตรด (neural substrate) รวมถึงมีการลดลงของเนื้อเทา (grey matter) ของสมองซึ่งเป็นส่วนที่อยู่ของตัวเซลล์ประสาทในบริเวณตำแหน่งเปลือกสมองส่วนรับความรู้สึกทางกายปฐมภูมิ (primary somatosensory cortex) ที่อยู่ในรอยบุ๋มหลังร่องกลาง (postcentral gyrus) ของสมองกลีบข้าง (parietal lobe) ซึ่งเป็นพื้นที่หลักของสมองในการแปลผลจากสัญญาณความรู้สึกเกี่ยวกับสัมผัสที่หน่วยรับความรู้สึกอยู่ที่บริเวณผิวหนัง¹⁵

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาช่วยให้ตระหนักถึงความเสื่อมของร่างกายตามอายุ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในวัยสูงอายุที่การรับรู้ตำแหน่งของข้อต่อของร่างกายส่วนล่างมีการเสื่อมลงถึงแม้เป็นผู้ที่มีสุขภาพดีและไม่มีปัจจัยอื่นใดที่ส่งผลต่อความสามารถในการรับรู้ตำแหน่งข้อต่อ นอกจากนี้ ความสามารถในการรับรู้ตำแหน่งข้อต่อของผู้เข้าร่วมการศึกษาในวัยผู้ใหญ่ตอนกลางยังมีแนวโน้มที่ค่าความคลาดเคลื่อนเพิ่มมากขึ้น

เมื่อเทียบกับวัยผู้ใหญ่ตอนต้น ดังนั้น การออกกำลังกาย หรือการทำกิจกรรมทางกาย (physical activity) เพื่อฟื้นฟูความสามารถในการรับรู้เกี่ยวกับกิจกรรมเริ่มกระทำตั้งแต่ในวัยผู้ใหญ่ตอนต้น เนื่องจากมีการศึกษาว่าสามารถช่วยกระตุ้นการทำงานของหน่วยรับความรู้สึกของการรับรู้เกี่ยวกับกิจร¹⁶ โดยเฉพาะการทำกิจกรรมหรือการออกกำลังกายที่มีการลงน้ำหนักอย่างเต็มที่¹¹

สรุปผลการศึกษา

ขนาดของค่าความคลาดเคลื่อนครั้งที่ของการรับรู้ตำแหน่งข้อต่ออย่างครึ่งล่างของกลุ่มผู้สูงอายุ (60-75 ปี) มีค่าความคลาดเคลื่อนครั้งที่มากกว่ากลุ่มผู้ใหญ่ตอนต้น (20-35 ปี) และผู้ใหญ่ตอนกลาง (40-55 ปี) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มผู้ใหญ่อตอนต้นและผู้ใหญ่ตอนกลาง นอกจากนี้ ความถนัดของขาไม่มีผลต่อการรับรู้ตำแหน่งของข้อต่อ ซึ่งผลการศึกษา¹¹แสดงให้เห็นว่าเมื่อเข้าสู่วัยผู้สูงอายุความแม่นยำในการรับรู้ตำแหน่งข้อต่ออย่างครึ่งล่างจะลดลงอันเป็นผลจากความเสื่อมตามธรรมชาติของร่างกายมนุษย์ถึงแม้ว่าจะไม่มีปัจจัยอื่นมาเกี่ยวข้อง

สรุปผลการศึกษา

ขอขอบคุณคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา สำหรับการสนับสนุนทุนวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. Gandevia SC, Refshauge KM, Collins DF. Proprioception: peripheral inputs and perceptual interactions. *Adv Exp Med Biol.* 2002; 508: 61-8.
2. Bevan L, Cordo P, Carlton L, Carlton M. Proprioceptive coordination of movement sequences: discrimination of joint angle versus angular distance. *J Neurophysiol.* 1994; 71: 1862-72.
3. Goble DJ, Coxon JP, Wenderoth N, Impe AV, Swinnen SP. Proprioceptive sensibility in the elderly: Degeneration, functional consequences and plastic-adaptive processes. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* 2009; 33: 271-8.
4. Shumway-Cook A, Woollacott MH. *Motor control: translation research into clinical practice.* 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
5. Skinner HB, Barrack RL, Cook SD. Age-related decline in proprioception. *Clin Orthop.* 1984: 208-11.
6. Stillman BC. Making sense of proprioception: the meaning of proprioception, kinaesthesia and related terms. *Physiotherapy.* 2002; 88(11): 667-76.
7. Sturnieks DL, Lord S. Balance disorders in the elderly. *Neurophysiological Clinique/Clinical Neurophysiology.* 2008; 38: 467-78.
8. Pirart J. Diabetes mellitus and its degenerative complications: a prospective study of 4,440 patients observed between 1947 and 1973. *Diabetes Care.* 1979; 2: 168-88.
9. Kokmen E, Bossemeyer RW, Williams WJ. Quantitative evaluation of joint motion sensation in an aging population. *J Gerontol.* 1978; 33: 62-7.
10. Laidlaw RW, Hamilton NA. A study of thresholds in appreciation of passive movement among normal control subjects. *Bull Neurol Inst.* 1937; 6: 268-73.
11. Bullock-Saxton JE, Wong WJ, Hogan N. The influence of age on weight-bearing joint reposition sense of the knee. *Exp Brain Res.* 2001; 136: 400-6.

12. Train the brain forum committee. Thai mental state examination (TMSE). Siriraj Hosp Gaz. 1993; 45: 359-74 (In Thai).
13. Ahmad CS, Stein BE, Jeshuran W, Nercessian OA, Henry JH. Anterior cruciate ligament function after tibial eminence fracture in skeletally mature patients. Am J Sports Med. 2001; 29(3): 339-45.
14. Perry SD. Evaluation of age-related plantar-surface insensitivity and onset age of advanced insensitivity in older adults using vibratory and touch sensation tests. Neurosci Lett. 2006; 392: 62-7.
15. Quiton R, Roys S, Zhuo J, Keaser M, Gullapalli R, Greenspan J. Age-related changes in nociceptive processing in the human brain. Ann NY Acad Sci. 2007; 1097: 175-8.
16. Thompson KR, Mikesky AE, Bahamonde RE, DB B. Effects of physical training on proprioception in older women. J Musculoskel Neuron Interact. 2003; 3(3): 223-31.

การเปรียบเทียบระยะทางที่เดินได้ภายใน 6 นาที ระหว่างผู้ป่วยโรค ปอดอุดกั้นเรื้อรังที่มีและไม่มีภาวะโลหิตจาง

A comparison of six-minute walk distance between COPD patients with and without anemia

■ สรายุทธ มงคล^{1*} จตุพร วงศ์สาธิตกุล²
Sarayoot Mongkol^{1*} Jatuporn Wongsathikul²

¹คณะกายภาพบำบัด วิทยาลัยเซนต์หลุยส์

¹Faculty of Physical Therapy, Saint Louis College

²คณะกายภาพบำบัด มหาวิทยาลัยมหิดล

²Faculty of Physical Therapy, Mahidol University

*Corresponding author (Email: gm_pt15@hotmail.com)

Received December 2014

Accepted as revised January 2015

Abstract

It is known that exercise capacity in patients with COPD is reduced. Also, anemia can reduce exercise capacity. However, there was no evidence of the reduction of exercise capacity in anemic COPD patients. The aim of this study was to compare the six-minute walk distance (6MWD), the heart rate, and the oxygen saturation immediately after the test (HRim and SpO2im) among the normal subjects and the COPD patients with and without anemia during six-minute walk test (6MWT). Fifty one sedentary elderly subjects were recruited into this study. Thirty four subjects were diagnosed as COPD. According to their hemoglobin level, they were divided into two groups: the anemic group and the non-anemic group (11.58 ± 0.72 g/dL vs. 13.21 ± 1.00 g/dL; $p < 0.05$). Thirty five apparently healthy subjects were used as the control group. The spirometry maneuvers and the 6MWT were performed in all subjects. Additionally, blood samples were collected to identify their hemoglobin level. The lowest hemoglobin level was found in the anemic group compared with the non-anemic and the control group (11.58 ± 0.72 g/dL vs. 13.21 ± 1.00 g/dL vs. 13.08 ± 0.32 g/dL). The shortest 6MWD was statistically showed in the anemic group compared with the non-anemic and the control group (300.12 ± 88.55 m. vs. 390.12 ± 50.75 m. vs. 470.35 ± 43.10 m; $p < 0.05$). The SpO2im in the anemic group was statically significant difference among the groups ($84.82 \pm 6.69\%$ vs. $90.06 \pm 7.11\%$ vs. $96.65 \pm 2.62\%$; $p < 0.05$). However, the HRim was not different among the groups. Also, moderate to very severe COPD patients with anemia have reduced 6MWD.

Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2015; 48(1): 67-74. Doi: 10.14456/jams.2015.23

Key word: COPD, Anemia, Six minute walk test

บทคัดย่อ

โรคปอดอุดกั้นเรื้อรัง และภาวะโลหิตจางมีผลทำให้ความสามารถในการออกกำลังกายลดลง แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงความสามารถในการออกกำลังกายในผู้ป่วยโรคปอดอุดกั้นเรื้อรังที่มีภาวะโลหิตจาง การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบระยะทางที่เดินได้ในการทดสอบด้วยการเดิน 6 นาที อัตราการเต้นของหัวใจ และ ความอึดตัวของออกซิเจนในเม็ดเลือดแดง ในทันทีที่เสร็จสิ้นการทดสอบ ในกลุ่มคนปกติและผู้ป่วยโรคปอดอุดกั้นเรื้อรังที่มีและไม่มีภาวะโลหิตจาง วิธีการทดลอง ผู้เข้าร่วมการศึกษามีทั้งหมดจำนวน 100 คน โดยแบ่งออกเป็นผู้ป่วยโรคปอดอุดกั้นเรื้อรัง ระดับปานกลางถึงรุนแรงจำนวน 75 คน ซึ่งแบ่งออกเป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มที่มีภาวะโลหิตจาง จำนวน 30 คน และไม่มีภาวะโลหิตจางจำนวน 35 คน และมีคนปกติจำนวน 35 คน เป็นกลุ่มควบคุม การทดสอบ ประกอบด้วย การเจาะเลือด การวัดสมรรถภาพปอด และการทดสอบด้วยการเดิน 6 นาที ผลการทดลองพบว่าผู้ป่วยโรคปอดอุดกั้นเรื้อรังที่มีภาวะโลหิตจาง มีระดับฮีโมโกลบินต่ำกว่ากลุ่มอื่น (11.58 ± 0.72 vs. 13.21 ± 1.00 vs. 13.08 ± 0.32 g/dL) กรัม/เดซิลิตร) พบว่า ผู้ป่วยโรคปอดอุดกั้นเรื้อรังที่มีภาวะโลหิตจาง มีค่าระยะทางที่เดินได้ภายใน 6 นาที น้อยที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (300.12 ± 88.55 vs. 390.12 ± 50.75 vs. 470.35 ± 43.10 เมตร; $p < 0.05$) และ พบว่าความอึดตัวของออกซิเจนในเม็ดเลือดแดง มีค่าต่ำที่สุดในผู้ป่วยโรคปอดอุดกั้นเรื้อรังที่มีภาวะโลหิตจาง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($84.82 \pm 6.69\%$ vs. $90.06 \pm 7.11\%$ vs. $96.65 \pm 2.62\%$; $p < 0.05$) แต่อัตราการเต้นของหัวใจหลังการทดสอบทันที ของทั้งสามกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สรุปได้ว่าภาวะโลหิตจางในผู้ป่วยโรคปอดอุดกั้นเรื้อรัง เป็นสาเหตุทำให้ผู้ป่วยโรคปอดอุดกั้นเรื้อรัง ระดับปานกลางถึงรุนแรงมีความสามารถในการเดิน 6 นาทีลดลง

วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2558; 48(1): 67-74. Doi: 10.14456/jams.2015.23

คำสำคัญ: โรคปอดอุดกั้นเรื้อรัง ภาวะโลหิตจาง การทดสอบด้วยการเดิน 6 นาที

Introduction

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is characterized by airflow limitation and inflammation of the airways and the lungs.¹ The clinical manifestations in COPD are chronic cough, sputum production, dyspnea, exercise intolerance, deconditioning, and decreased quality of life.² COPD has diverse effects, including respiratory and peripheral muscle weakness, weight loss, impaired cardiovascular system, and abnormalities of the autonomic nervous system.³

Anemia is a common condition associated with chronic diseases such as chronic heart failure (CHF), chronic kidney disease (CKD), cancer, rheumatoid arthritis (RA), and COPD.^{4,5} The clinical symptoms of anemia in chronic diseases are weakness, fatigue, cachexia, impaired nutrition, and exercise intolerance.⁶ Previous studies have shown that proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin 6 (IL-6), interleukin 8 (IL-8), and C-reactive protein (CRP) are increased in patients with COPD, similar to the mechanisms

of anemia.^{2,3} Other studies have suggested that anemia contributes to exercise intolerance and dyspnea in chronic diseases.^{7,8} Additionally, the anemia in COPD contributes to increased mortality, decreased gas exchange and hemodynamic, abnormal breathing, and skeletal muscle dysfunction.⁹ Therefore, the anemia associated with COPD may further reduce exercise capacity in COPD patients.

The six-minute walk test (6MWT) is a valid and reliable tool for the evaluation of the pulmonary, cardiovascular, and musculoskeletal systems during exercise in chronic diseases patients, including those with COPD.¹⁰ This test can indirectly determine the exercise capacity in moderate to severe COPD patients, and yields similar values of peak oxygen consumption (VO_2) to the incremental exercise test.¹¹ The six-minute walking distance (6MWD) was used to assess exercise capacity.¹⁰ The 6MWD, heart rate, and oxygen saturation immediately after 6MWT (HRim and SpO2im, respectively) have been used as predictors of the prognosis in moderate to severe COPD patients.^{10,12-13} A study with CHF and CKD

patients reported that anemia was the main factor that decreased exercise capacity as indicated by reduction in 6MWD.^{7,9,14} However, a study of exercise capacity in anemic COPD patients were limited and small sample size.¹⁵ Therefore, the present research was aimed to evaluate the exercise capacity in COPD patients with and without anemia, by using the 6MWT.

Materials and methods

1. Subjects

The study tentatively included 35 normal subjects, 30 COPD patients with anemia, and 35 COPD patients without anemia from the internal medicine outpatient clinic, Maharajnakorn Chiang Mai Hospital, Chiang Mai University and Mae Jun Hospital, Chiang Rai. Both male and female COPD patients were recruited and all clinically stable, without any change in medication during the previous three weeks. They were classified as stage II-IV according to GOLD COPD guideline.¹ Anemia was defined as hemoglobin concentration below 12 g/dl in women and 13 g/dl in men. All subjects were matched in age, weight, height, and gender.

The patients were excluded from this study if they

- 1) required oxygen therapy,
- 2) used medication affecting exercise performance such as β -blocker,
- 3) had conditions that limited exercise: heart diseases, hypertension, diabetes mellitus, musculoskeletal disorder, and neurological diseases,
- 4) did not understand verbal communication,
- 5) had impaired vision and hearing after correction, or
- 6) had known vitamin B12 or folic acid deficiency.

2. Procedures

Prior to the study, written informed consents were obtained and questionnaires were filled out. Blood sample test, the spirometric maneuvers, and the 6MWT were performed on all subjects. All the tests were completed in one session. The data collection was begun in the morning and the subjects were asked to not to have alcohol, caffeine, or perform any vigorous exercise within 2 hours before the test.

The subjects came to the laboratory in the morning, and demographic data such as age, weight, and height were measured. After resting for 5 minutes, blood pressure and heart rate were recorded and the testing procedures were explained to the subjects.

Then, the 5 milliliter peripheral venous blood sample was collected. According to WHO guidelines, the standard hemoglobin test was performed.¹⁶ This result was used to identify individuals' anemic condition. Then, the FVC, FEV₁, and FEV₁/FVC were measured with the standard spirometry maneuvers according to the ATS guideline.¹⁷ The results of these tests were used to confirm the inclusion criteria.

Finally, the standardized 6MWT was performed.¹⁰ Subjects were asked to walk from the starting point to the end point. They were asked to cover as much as distance as possible in 6 minutes. The subjects walked as fast as possible but running was prohibited. All subjects were permitted to slow down, to stop, or to rest as needed during the test. The same verbal encouragement "do your best" at the start of each minute was provided to all subjects. If the subjects took a rest, the verbal encouragement "begin walking as soon as you feel able" was given. Before and immediately after the test, the heart rate, the blood pressure, the oxygen saturation, the dyspnea scale, and the fatigue perception were recorded. In addition, the total walking distance covered in 6 minutes was recorded after the test. The second trial of 6MWT was repeated after 30 minutes rest, or after the heart rate returned to baseline. The best results of the 6MWT were used for further analysis.

The test was terminated if the subjects experienced chest pain, intolerance dyspnea, leg cramps, staggering, diaphoresis, and pale or ashen appearance.

3. Statistical analysis

Data was reported as mean $\pm$ SD. The significant level at 0.05 was selected. The descriptive statistics were used for demographic data, spirometry results, heart rate, oxygen saturation, and 6MWD. One way ANOVA was used to compare the differences among the normal subjects, COPD patients with anemia, and without anemia.

Results

One hundred sedentary elderly subjects were recruited into this study. Sixty five subjects were diagnosed as COPD. According to their hemoglobin level, they were divided into two groups: the anemic group (n=30) and the non-anemic group (n=35) (11.58 ± 0.72 g/dL vs. 13.21

± 1.00 g/dL; $p < 0.05$). Thirty five apparently healthy subjects were used as the control group. Their demographic data were showed in Table 1. There were no statistically significant differences in age, weight, height, and BMI among the three groups. The smoking period was over 45 years in both the anemic and the non-anemic group (51.43 ± 5.56 yrs and 50.76 ± 4.65 yrs, respectively).

Table 1. The subject's demographic data.

Variables	Control group (n=35)	Pathologic group	
		Non anemic COPD (n=35)	Anemic COPD (n=30)
Age (yrs)	68.35 ± 4.36	70.25 ± 5.47	70.44 ± 5.57
Gender (M/F)	26/7	25/8	23/7
Weight (kg)	53.25 ± 3.30	49.83 ± 4.76	49.38 ± 6.13
Height (cm)	160.64 ± 4.53	159.45 ± 6.36	161.88 ± 4.66
BMI (kg/m ²)	21.77 ± 1.25	20.99 ± 3.14	20.35 ± 2.53
Hemoglobin (g/dL)	13.08 ± 0.32^a	13.21 ± 1.00	11.58 ± 0.72^c
FVC (L/s)	2.56 ± 0.55^b	2.04 ± 0.61	1.79 ± 0.53
% predicted FVC	95.88 ± 5.45^a	74.37 ± 15.24	69.35 ± 15.18
FEV1 (L/s)	2.05 ± 0.39^a	1.01 ± 0.29	0.92 ± 0.35
% predicted FEV1	$97.33 \pm 8.15^{a,b}$	47.82 ± 14.01	46.65 ± 13.22
FEV1/FVC	$83.66 \pm 2.56^{a,b}$	50.37 ± 7.71	52.28 ± 13.85

Data are presented as mean $\pm$ SD

Note; BMI = body mass index; FVC = forced vital capacity; FEV1 = forced vital capacity in 1 second

a = significant between normal and non-anemic group ($p < 0.05$)

b = significant between normal and anemic group ($p < 0.05$)

c = significant between anemic and non-anemic group ($p < 0.05$)

The FVC, the predicted FVC, the FEV1, the predicted FVE1, and the FEV1/FVC showed the significantly differences between the pathologic group and the control group ($p < 0.05$). The degree of the airway obstruction in the anemic group was comparable to the non-anemic group. They were classified as moderate to very severe degree of COPD based on GOLD guideline.¹ The FVC and the predicted FVC were not statistically significant differences between the anemic and the non-anemic group. However, the results showed that the anemic group was more likely having the restrictive lung disease.

All subjects completed the 6MWT. The physiological responses during the 6MWT showed in Table 2. The lowest walking distance was found in the anemic group compared with the non-anemic and the control group.

Table 2. Physiological responses during 6MWT.

Variables	Control group (n=35)	Pathologic group	
		Non anemic COPD (n=35)	Anemic COPD (n=30)
6MWD	470.35 ± 43.10 ^a	390.12 ± 50.75	300.12 ± 88.55 ^b
RestingHR (beats/min)	73.73 ± 8.12 ^a	84.65 ± 9.01	87.94 ± 9.09
HRim (beats/min)	97.00 ± 12.07	105.06 ± 10.42	111.35 ± 11.61
Resting SpO ₂ (%)	97.35 ± 0.99	95.35 ± 2.42	94.65 ± 2.57
SpO ₂ im (%)	96.65 ± 2.62 ^a	90.06 ± 7.11	84.82 ± 6.69 ^b
Resting DBP (mmHg)	70.94 ± 5.88	72.76 ± 6.28	72.12 ± 6.63
DBPim (mmHg)	75.47 ± 7.92	77.94 ± 7.85	77.12 ± 8.70
Resting SBP (mmHg)	115.78 ± 13.15	116.08 ± 10.43	119.24 ± 10.86
SBPim (mmHg)	127.65 ± 10.33	129.41 ± 9.66	130.08 ± 9.05

Data are presented as mean ± SD

Note; HR = heart rate; HRim = heart rate immediately after the test; SpO₂ = oxygen saturation;

SpO₂im = oxygen saturation immediately after the test; DBP = Diastolic blood pressure; DBPim = diastolic blood

pressureimmediately after the test; SBP = Systolic blood pressure; SBPim = Systolic blood pressure immediately after the test

a = significant between control and pathologic group ($p < 0.05$)

b= significant between anemic and non-anemic group ($p < 0.05$)

All subjects completed the 6MWT. The physiological responses during the 6MWT showed in Table 2. The lowest walking distance was found in the anemic group compared with the non-anemic and the control group.

At rest, all the groups had the SpO₂ above 95% and there was no statistical difference on resting SpO₂ among the three groups. However, immediately after the test, the lower SpO₂im was found in the pathologic group when it was compared with the control group ($p < 0.05$). Furthermore, the anemic group showed the lowest SpO₂im among the three groups. There were no differences on blood pressure at rest and immediately after exercise among the groups.

Discussion

The control group had the highest walking distances among the groups. Additionally, the walking distances in the anemic group was lower than the non-anemic group. This result is comparable to the previous study (265 ± 122 m. for the anemic group vs. 325 ± 124 m. for the non-anemic group; $p < 0.05$).¹⁸

This implies that the functional capacity is reduced in the anemic group via the reduction in oxygen carrying capacity. Additionally, the difference of walking distance between the anemic and non-anemic group is about 90 meters in our study. The evidence suggested that changing of the walking distances greater than 70 meters could alter the patient's clinical perception.¹⁰ Additionally, this result was similar to the previous study about the six-minute walk distance and reaction time in anemia and non-anemia COPD.¹⁵ Also anemia is the factor may be reduce exercise capacity in COPD.

In this study, the highest resting heart rate was found in the anemic group compared with the others. Physical inactivity can increase resting heart rate.¹⁹ Also, dominant sympathetic outflow can increase heart rate and stroke volume in patients with anemia.⁶ Thus, the anemic condition and the sedentary lifestyle, may affect their resting heart rate.

In this study, the HRim was higher in the pathologic group than the control group, though, it was not statistically significant difference among the three groups. This may be due to the effect of increase weak of breathing

primarily from the airway obstruction in the pathologic group.¹ Furthermore, the highest HR_{im} was found in the anemic group. The anemic condition can increase plasma volume of the blood.^{6,8} This consequently results in congestive heart failure leading to pulmonary hypertension and pulmonary edema, respectively.²⁰ Low lung compliance is occurred. Thus, the restrictive lung in the anemic group is possibly due to the low compliance. This restrictive type can increase the WOB and the heart rate, respectively.

The resting SpO₂ was over 95% in all groups. At rest, the oxygen availability can meet the basal metabolic rate. However, during the 6MWT the oxygen supply does not meet the oxygen demand due to high exercise intensity and gas exchange impairment.

It is known that the intensity of the 6MWT is comparable to the maximal exercise stress test in moderate to severe COPD patients.¹¹ The range of exercise intensity in that study between 67 to 105 percent predicted maximal heart rate.¹¹ In this study, the exercise intensity of the non-anemic and the anemic group was approximately 69.95 and 75.5 percent predicted maximal heart rate, respectively. Thus, the test can elicit the oxygen supply deprivation and is sufficient to stress the cardiopulmonary system in this study.

A previous study reported that the SpO_{2im} was significant lower in the COPD patients than the healthy individuals.²¹ This result is repeated in this study. However, the SpO_{2im} comparison between the anemic and the non-anemic COPD patients has been made. This study is the first study demonstrated that the SpO_{2im} in the anemic group was statistically significant lower than the non-anemic group. Additionally, the greater deoxygenating and the greater reduction of the SpO_{2im} was found in the anemic group (from 94.65 ± 2.57% to 84.82 ± 6.69%) when it was compared to the non-anemic group (from 95.35 ± 2.42% to 90.06 ± 7.11%). This is because the higher the heart rate is the greater reduction of transit time at the pulmonary capillary. Thus, the severity of the gas exchange in the anemic group is greater than the non-anemic group.

Ozalevi et al²¹ reported that the SBP and the DBP were not statistically significant differences between the COPD and the healthy group during at rest and

immediately after the 6MWT. However, the SBP and the DBP during at rest and immediately after exercise was slightly higher than the healthy group. These are reproducible in this study. The comparison of the SBP and the DBP before and after the 6MWT between the anemic and the non-anemic group had been made in this study. The sympathetic activity was greater in the anemic group than the non-anemic group, even though this group tried to reduce the walking speed.

Pervious study showed that the dyspnea after the 6MWT in the anemic group was greater than the non-anemic group.¹⁸ In this study, the fatigue and the dyspnea before and after the test were obtained. The pathology group had greater the fatigue and dyspnea than the control group before and after the 6MWT. Specific consideration between the anemic and the non-anemic group was made. The fatigue and the dyspnea were greater in the anemic group than in the counterpart before and after the test.

Hypoxemia in patients with severe COPD stimulate the EPO production in kidney and resulting in the increase of RBC production.⁵ Thus, polycythemia should be frequently seen in the patients with COPD. In fact, it is not always the case. Form the epidemiologic study, the anemic prevalence in COPD was 23.1%.⁵ Additionally, the EPO resistance was found in the anemic group.²²

Both of COPD and CHF are considered as the systemic inflammatory disease.^{2,3} The anemic mechanisms in CHF have been already proposed. Firstly, the increase level of inflammatory cytokines may reduce red blood cell survival. Secondly, there is the inhibition of erythropoietin production in bone marrow. Lastly, iron utilization is inhibited. Currently, the mechanisms of anemia in COPD are unknown. These mechanisms may cause anemia in COPD patients. Thus, further study needs to be clarified on these issues.

Some limitations were found in this study. Firstly, there was no physical examination on gastrointestinal (GI) bleeding and laboratory test on iron deficiency in all subjects. Since, GI bleeding and iron deficiency are commonly caused the anemia in elderly population.²³

Secondly, pulmonary artery and capillary pressure were not directly measured. Lastly, objective physical examinations on the heart issues need to be done. This is because the cardiac disease is one of the most common co-morbidities in patients with COPD.²² In conclusion, this study showed that the lowest 6MWD was found in the

anemic group compared with the non-anemic group and the control group. However, the HRim was not statistically significant difference among three groups. Immediately after the 6MWT, the anemic group showed the lowest SpO₂ among the three groups.

References

1. National Heart Lung Blood Institute. Global Initiative for chronic obstructive lung disease; Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: NHLBI/WHO Workshop; 2009.
2. Wouters EFM, Creutzberg EC, Schols AMWJ. Systemic effects in COPD. *Chest*. 2005; 121: 127-30.
3. Agustí AGN, Noguera A, Sauleda J, Sala E, Pons J, Busquets X. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2003; 21: 347-60.
4. Erschler WB, Chen K, Reyee EB, Dubois R. Economic burden of patients with anemia in selected disease. *Value in health*. 2005; 8: 629-38.
5. John M, Lange A, Hoernig S, Witt C, Anker SD. Prevalence of anemia in chronic obstructive pulmonary disease: Comparison to other chronic diseases. *Inter J Cardio*. 2006; 111: 36570
6. Silverberg DS, Iaina A, Wexler D, Blum M. The pathological consequences of anaemia. *Clin Lab Haem*. 2001; 23: 1-6.
7. Calbet JAL, Lundby C, Koskolou M, Boushel R. Importance of hemoglobin concentration to exercise: Acute manipulation. *Respir Physiol & Neuro*. 2006; 51: 132-40.
8. Gabrilove J. Anemia and the elderly: clinical considerations. *Best Prac & Research Clin Haem*. 2005; 18: 417-22.
9. Similowski T, Agustí A, MacNee W, Schonhofer B. The potential impact of anemia of chronic disease in COPD. *Eur Respir J*. 2006; 27: 390-6.
10. American Thoracic Society. ATS Statement: Guidelines for the six minute walk test. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 166: 111-7.
11. Turner SE, Eastwood PR, Cecins NM, Hillman DR, Jerkins SC. Physiologic responses to incremental and self-paced exercise in COPD; a comparison of three tests. *Chest*. 2004; 126: 766-73.
12. Honeyman P, Barr P, Stubbing DG. Effect of a walking aid on disability, oxygenation, and breathlessness in patients with chronic airflow limitation. *J Cardiopulm Rehabil*. 1996; 16: 63-7.
13. Solway S, Brooks D, Lau L, Goldstein R. The short term effect of a rollator on functional exercise capacity among individual severe COPD. *Chest*. 2002; 122: 56-65.
14. Roul G, Germain P, Bareiss P. Does the 6-minute walk test predict the prognosis in patients with NYHA class II or III chronic heart failure? *Am Heart J*. 1998; 136: 449-57.

15. Mongkol S, Chaypech C, Pattanawong F, Thaithanee P, Suthasuwan A, Wongkokum P, et.al. Comparison of six minute walk distance and reaction time between anemic COPD and non-anemic COPD. Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2013; 46: 207-14
16. World Health Organization. Nutritional anemia: report of a WHO Scientific Group. Geneva: Switzerland; 1968.
17. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, et al. Standardizations of spirometry. Eur Respir J. 2005; 26: 316-38.
18. Cote C, Zilberberg MD, Mody SH, Dordelly LJ, Celli B. Haemoglobin level and its clinical impact in a cohort of patients with COPD. Eur Respir J. 2007; 29: 923-9
19. Topp R, Ditnyer M, King K. Doheyty K. Hornyak J. The effect of bed rest and potential of rehabilitation on patients in the intensive care unit. AACN Clinical Issues. 2002.; 13: 263-76
20. Siverberg DS, Wexler D, Iaina A, Steinbruch S, Wollman Y. Schwartz D. Anemia, chronic renal disease and congestive heart failure the cardio renal anemia syndrome: the need for cooperation between cardiologist and nephrologists. Int Erol Nephrol. 2006; 38: 295-310
21. Ozalevli S, Ozden A, Itil O, Akkoclu A. Comparison of the Sit-to-Stand Test with 6 min walk test in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Respir Med. 2006; 101: 286-93.
22. John M, Hoernig S, Doehner W, Okonko DD, Witt C, Anker SD. Anemia and Inflammation in COPD. Chest. 2005; 127: 825-9..
23. Mayhew M. Anemia of chronic disease in the elderly. JNP. 2006; 2: 261-7.

การส่งบทความต้นฉบับ

นิพนธ์ต้นฉบับสามารถส่งผ่านระบบออนไลน์เว็บไซต์ <http://www.ams.cmu.ac.th/journal> หรือ ส่งต้นฉบับจำนวน 2 ชุด พร้อมแผ่นบันทึกข้อมูล (CD) ที่ระบุโปรแกรมที่ใช้พิมพ์มายัง

บรรณาธิการวารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่

คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เลขที่ 110 ถนนอินทวโรสุ ต่าบลสุเทพ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่

โทรศัพท์ : (053) 945080 ต่อ 17

โทรสาร : (053) 946042

E-mail : preeyanat.v@cmu.ac.th

ข้อมูลทั่วไป

วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ เป็นวารสารทางวิชาการของคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ยินดีพิจารณาบทความที่มีคุณภาพด้านเทคนิคการแพทย์ รังสีเทคนิค กิจกรรมบำบัด กายภาพบำบัด และด้านอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับวิทยาศาสตร์สุขภาพ โดยผ่านระบบการตรวจประเมินและได้รับการยอมรับจากผู้ทรงคุณวุฒิภายในหรือภายนอก ผู้เชี่ยวชาญในสาขาวิชานั้นๆ อย่างน้อย 2 ท่าน บทความที่เสนอขอรับการพิจารณาต้องไม่เคยตีพิมพ์ หรืออยู่ในระหว่างการเสนอต่อวารสารอื่นใด บทความที่ตีพิมพ์ในวารสารนี้แล้ว ถือเป็นลิขสิทธิ์ของวารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ประเภทของบทความที่ส่งตีพิมพ์

1. **นิพนธ์ต้นฉบับ** (Research article) เป็นรายงานผลงานวิจัยในด้านที่เกี่ยวข้องโดยที่บทความนั้นยังไม่เคยตีพิมพ์ หรืออยู่ในระหว่างการตีพิมพ์ในวารสารอื่นใด
2. **รายงานเทคนิคทางห้องปฏิบัติการ กายภาพบำบัด กิจกรรมบำบัด และรังสีเทคนิค** (Short technical report) เป็นรายงานการประยุกต์ใช้เทคนิคการตรวจในห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ กายภาพบำบัด กิจกรรมบำบัด และรังสีเทคนิค โดยแสดงรายละเอียดทั้งวิธีการและผลการใช้เทคนิคนั้น เปรียบเทียบกับวิธีเดิม รวมถึงการวิจารณ์และสรุปผล
3. **นิพนธ์ปริทัศน์** (Review article) เป็นบทความที่รวบรวมเอาผลงานในเรื่องใดเรื่องหนึ่งโดยเฉพาะ ซึ่งเคยลงตีพิมพ์แล้วนำมาวิเคราะห์วิจารณ์เปรียบเทียบเพื่อให้เกิดความกระจ่างในเรื่องนั้นยิ่งขึ้น
4. **บทความทั่วไป** (General article) เป็นบทความที่มีวิชาการเฉพาะด้านรวมอยู่ด้วยค่อนข้างน้อย เขียนเพื่อให้บุคคลทั่วไปสามารถอ่านเข้าใจตลอด
5. **บันทึก** (Note) เป็นบทความหรือรายงานผลการวิจัยคล้ายข้อ 1 และข้อ 2 แต่มีความกะทัดรัดกว่าทั้งในเนื้อหาและรายละเอียด
6. **ปกิณกะ** (Miscellany) เป็นบทความทั่วไปที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมทางด้านวิทยาศาสตร์สุขภาพ เช่น การวิจารณ์ผลเวชศาสตร์ชั้นสูง การตอบปัญหาทางด้านเวชศาสตร์ชั้นสูง เป็นต้น
7. **จดหมายถึงบรรณาธิการ** (Letter to editor) เป็นบทความทางวิชาการหรืออื่นๆ ที่เป็นบันทึกสั้นๆ ในรูปของจดหมายถึงบรรณาธิการ เพื่อแสดงความคิดเห็นและประสบการณ์ในทางวิชาการ
8. **การออกความเห็น** (Commentaries) และ **รายงานการประชุม** (Meeting report) การแสดงออกความเห็นสามารถแสดงความสนใจ ความสำคัญและความถูกต้องแท้จริง อย่างไรก็ตามยังสามารถแสดงความไม่เห็นด้วยได้เช่นกัน ในส่วนของรายงานการประชุมจะถูกพิจารณาในลักษณะเดียวกับการแสดงออกความเห็น

คำแนะนำสำหรับการเตรียมต้นฉบับ

1. **ภาษาที่ใช้** มี 2 ภาษาคือ ภาษาไทย และ/หรือภาษาอังกฤษ ใช้อักษร Browallia New 14 สำหรับตัวอักษรและขนาด 12 สำหรับสัญลักษณ์ ต้นฉบับภาษาไทย ควรใช้ถ้อยคำและศัพท์ภาษาไทยให้มากที่สุด โดยใช้พจนานุกรมศัพท์แพทย์อังกฤษ-ไทยฉบับราชบัณฑิตยสถานเป็นบรรทัดฐาน คำศัพท์ภาษาอังกฤษที่บัญญัติเป็นภาษาไทยแล้วแต่ยังไม่เป็นที่ทราบกันอย่างแพร่หลายหรือแปลแล้วเข้าใจยาก ให้ใส่ภาษาเดิมกำกับไว้ในวงเล็บหรืออนุโลมให้ใช้ภาษาอังกฤษได้
2. **ต้นฉบับ** ใช้กระดาษสีขาวขนาด 8.5x11 นิ้ว พิมพ์หน้าเดียว ชิดซ้าย เว้นระยะระหว่างบรรทัด 2 ช่วง (2 spaces) ใช้โปรแกรม และตัวพิมพ์มาตรฐาน มีเลขที่หน้ากำกับทุกหน้า
3. **ชื่อเรื่อง** ให้มีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษเป็นข้อความสั้นๆ และสื่อความหมาย บ่งชี้ให้เห็นสาระสำคัญของเนื้อหาในบทความไม่ควรใช้คำย่อนอกจากคำย่อนั้นเป็นที่ทราบกันโดยทั่วไป
4. **ชื่อผู้แต่ง** ให้ใส่ชื่อตัวและชื่อสกุลเต็มทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ กรณีที่ผู้แต่งหลายคนให้เรียงตามลำดับความสำคัญในงานนั้นๆ และให้ระบุชื่อและสถานที่ติดต่อพร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร หรือ E-mail address ของผู้รับผิดชอบบทความเพื่อการติดต่อได้สะดวก กรณีที่มีผู้วิจัยมากกว่าหนึ่งคน ให้ลำดับด้วยตัวอักษรจาก A ถึง Z และเครื่องหมายดอกจันทน์สำหรับผู้รับผิดชอบบทความ
5. **บทคัดย่อ** ให้มีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ (Abstract) ความยาวไม่เกิน 400 คำ โดยแบ่งเป็น 5 หัวข้อเรียงตามลำดับ ดังนี้ บทนำ ที่มาของปัญหาวิจัย วัตถุประสงค์ วัสดุและวิธีการ ผลการศึกษา และสรุป ผลการศึกษา ทั้งนี้ให้มีคำรหัส (Keyword) จำนวน 3-5 คำ

6. โครงสร้างของบทความ สำหรับนิพนธ์ต้นฉบับให้เรียงลำดับตามหัวข้อ ดังนี้:-

- บทนำ (Introduction) ซึ่งรวมถึงวัตถุประสงค์หรือสมมติฐานในการศึกษา เนื้อหาที่สำคัญสั้นๆ ความสำคัญของงานปัจจุบันที่กำลังทำ พร้อมอ้างอิงงานที่มีการพิมพ์เผยแพร่มาก่อนหน้าและแสดงความคิดเห็นประกอบ
- วัสดุและวิธีการ (Materials and methods) การทดลองสั้นๆ พอที่ผู้อ่านเข้าใจในรายละเอียดของการศึกษา และผู้อ่านอาจสามารถนำไปทดลองต่อได้
- ผลการศึกษา (Results) ผลการศึกษารายละเอียดเฉพาะผลการศึกษาที่ได้รับจากการศึกษานี้ เช่น ข้อมูลจากรูปภาพ ตารางข้อมูล สามารถอธิบายเหตุผลที่เกินกว่าข้อมูลได้ในส่วนของวิจารณ์ผลการศึกษา
- วิจารณ์ผลการศึกษา (Discussion)
- สรุปผลการศึกษา (Conclusion)
- กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement) กรณีที่งานวิจัยนั้นได้รับทุนวิจัยให้ระบุแหล่งที่มาของทุนวิจัยนั้นด้วย
- เอกสารอ้างอิง (References) การอ้างอิงเอกสารในเรื่องให้อ้างอิงเรียงตามลำดับเลขที่ของเอกสารอ้างอิงซึ่งอยู่ท้ายเรื่อง โดยใส่ตัวเลขแบบยกต่อท้ายข้อความนั้นๆ

7. ตาราง แผนภูมิ รูปภาพประกอบ

- ตาราง แผนภูมิ รูปภาพประกอบ ให้แยกไว้ต่างหาก หนึ่งไฟล์ ต่อ 1 ตาราง หรือ 1 แผนภูมิ หรือ 1 รูปภาพ บันทึกโดยใช้นามสกุล .jpg หรือ .tif ให้มีความละเอียดเพียงพอ
- คำอธิบายรูป (Figure legend) ให้พิมพ์แยกไว้ต่างหาก คำอธิบายภายในรูปให้ใช้ภาษาอังกฤษ
- ชื่อตารางและคำอธิบายในตารางให้ใช้ภาษาอังกฤษ

การตรวจทาน (Proof)

บทความที่ได้รับการยอมรับให้พิมพ์จะส่งกลับไปยังผู้วิจัยเพื่อตรวจทานผ่าน E-mail ของผู้วิจัยก่อนการตีพิมพ์

ค่าใช้จ่ายในการพิมพ์ (Page charge)

ไม่มี

การเขียนเอกสารอ้างอิง

1. การเขียนเอกสารอ้างอิง ให้ใช้ระบบแวนคูเวอร์ (Vancouver) เท่านั้น
2. เอกสารอ้างอิง ที่เป็นภาษาไทยให้แปลเป็นภาษาอังกฤษ และต่อท้ายด้วย (in Thai)

ตัวอย่างการเขียนเอกสารอ้างอิง

- Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. N Engl J Med 2002 Jul 25; 347(4): 284-7
- Rose ME, Huerbin MB, Melick J, Marion DW, Palmer AM, Schiding JK, et al. Regulation of interstitial excitatory amino acid concentrations after cortical contusion injury. Brain Res 2002; 935(1-2): 40-6
- Geraud G, Spierings EL, Keywood C. Tolerability and safety of frovatriptan with short- and long-term use for treatment of migraine and in comparison with sumatriptan. Headache 2002; 42 Suppl 2: S93-9
- Abood S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. Am J Nurs 2002 Jun [cited 2002Aug 12];102(6):[about 1 p.]. Available from: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm> Article
- Forooghian F, Yeh S, Faia LJ, Nussenblatt RB. Uveitic foveal atrophy: clinical features and associations. Arch Ophthalmol. 2009 Feb; 127(2): 179-86. PubMed PMID: 19204236; PubMed Central PMCID: PMC2653214 Who's Certified [Internet]. Evanston (IL): The American Board of Medical Specialists. c2000 - [cited 2001 Mar 8]. Available from: <http://www.abms.org/newsearch.asp> Cancer-Pain.org [Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [updated 2002 May 16; cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.cancer-pain.org/>.
- Borkowski MM. Infant sleep and feeding: a telephone survey of Hispanic Americans [dissertation]. Mount Pleasant (MI): Central Michigan University; 2002
- Chanungklang P, Vongchan P. Screening and identification of alloantibodies in blood samples from Community Medical Service Project, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University [Term paper]. Faculty of Associated Medical Sciences: Chiang Mai University; 2012 (in Thai).
- Harnden P, Joffe JK, Jones WG, editors. Germ cell tumours V. Proceedings of the 5th Germ Cell Tumour Conference; 2001 Sep 13-15 ; Leeds, UK. New York: Springer, 2002.
- Portney JG, Watkins MP. Foundation of clinical research applications to practice. 2nd United States of America. Julie Alexandar; 2000.

Instructions for Authors

How to send original article/thesis

Original article/thesis can be submitted through the on-line system via website <http://www.ams.cmu.ac.th/journal> or by sending 2 original hard copies and CD (please specify the program used to print) to the editorial office at

The Office of Editor of Bulletin of Chiang Mai Associated Medical Sciences
Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University
110 Inthawaroros Rd., T.Sriphum, A.Muang,
Chiang Mai Thailand 50200
Telephone: (053) 945080 Ext. 17 Fax: (053) 946042
E-mail: preeyanat.v@cmu.ac.th

General Principles

Bulletin of Chiang Mai Associated Medical Sciences is a scientific journal of the Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University. The articles submitted to the bulletin that are relevant to any of all aspects of Medical Technology, Radiologic Technology, Occupational Therapy, Physical Therapy and other aspects related to the health sciences are welcome. Before publication, the articles will go through a system of assessment and acceptance by at least two experts who are specialized in the relevant discipline. All manuscripts submitted to Bulletin of Chiang Mai Associated Medical Sciences should not have been previously published or under consideration for publication elsewhere. All publications are protected by the Bulletin of Chiang Mai Associated Medical Sciences' copyright.

Manuscript categories

1. Research article is a research paper that is relevant to any of all aspects described above and must not have been previously published or be under consideration for publication elsewhere.
2. Short technical report is a formal report of a technology innovation in a field of Medical laboratory, Physical Therapy, Occupational Therapy and Radiologic Technology which details method, results, discussion and conclusion.
3. Review article is an article that provides a comprehensive review of a topic having direct relevance to research on the specific topics. It analyzes or discusses research previously published by others.
4. General article is an article that is less technical and permits access by the people in general, compared to a research article.
5. Note is an article or research report similar to a research article but short and limited in scope.
6. Miscellany is an article relating to an article published in the health sciences such as a discussion of the result of laboratory medicine or to answer a research question on laboratory medicine.
7. Letters to the Editor is a technical article or notes or letter sent to a publication about issues of opinions and experiences from authors.
8. Commentaries and Meeting report are a series of comments or annotations of the meeting.

Manuscript Format

1. **Language.** Thai and/or English, Browsers New 14 for text and 12 for all symbols. For an original Thai article, the manuscript should use as many Thai words as possible. Author should use the Royal Institute English-Thai Medical Dictionary as a guideline for translation. For English words that have been formally translated into Thai, but not widely recognized or too difficult to understand, the English words can be placed in parenthesis for those original words.
2. **Format.** Print the original hard copy in A4 paper, size 8.5x11 inch, one-side printing, double spacing. Use standard program and fonts and, add page and line number for all pages.
3. **Title of the article.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
4. **Author names and affiliation.** Where the family name may be ambiguous (e.g. a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with superscript number immediately after author's name and in front of appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the province, country and, if available, the e-mail address of each author.
5. **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication, ensure that telephone and fax numbers (with postal area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author
6. **Abstract.** In Thai and English not exceeding 400 words. The abstract must include background, objectives, methods, results and conclusion, and 3-5 keywords should be included. The manuscripts should be arranged in the following headings: Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, and Conclusion, Acknowledgement and Reference.

7. **Article structure.** Prepare according to following contents;
 - Introduction: State the objectives of work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results..
 - Materials and Methods: Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference. Only relevant modifications should be described.
 - Results: Results should be clear and concise. Present the new results of the study such as tables and figures mentioned in the main body of the article, and numbered in the order in which they appear in the text or discussion.
 - Discussion: This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.
 - Conclusions: The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a "Discussion" or "Results and Discussion".
 - Acknowledgement: Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g. providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.)
 - References: Numbering with superscript is in required.
8. **Artworks**
 - Each table, graph and figure should be self-explanatory one page per each. Save the figures as high resolution i.e., .jpg or .tiff files.
 - Separate and self-explanatory of figure legend and using English for figure description.
 - Title and description of the tables and figures should be in English.

Proof correction

The Proofs of final paper approved for publication are to be returned by e-mail to the corresponding author before publication publication.

Page charge

No page charge

References Format

1. In details of content of the article; using a superscript number after the text or paragraph to refer to the references.
2. References using the Vancouver reference system.
3. In case of references source from non-English language, translate the title to English and retain "in Thai" in the parentheses.

Examples of References list

- Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. *N Engl J Med* 2002 Jul 25; 347(4): 284-7
- Rose ME, Huerbin MB, Melick J, Marion DW, Palmer AM, Schiding JK, et al. Regulation of interstitial excitatory amino acid concentrations after cortical contusion injury. *Brain Res* 2002; 935(1-2): 40-6
- Geraud G, Spierings EL, Keywood C. Tolerability and safety of frovatriptan with short- and long-term use for treatment of migraine and in comparison with sumatriptan. *Headache* 2002; 42 Suppl 2: S93-9
- Abood S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs* 2002 Jun [cited 2002Aug 12];102(6):[about 1 p.]. Available from: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm> Article
- Forooghian F, Yeh S, Faia LJ, Nussenblatt RB. Uveiticfoveal atrophy: clinical features and associations. *Arch Ophthalmol.* 2009 Feb; 127(2): 179-86. PubMed PMID: 19204236; PubMed Central PMCID: PMC2653214 Who's Certified [Internet]. Evanston (IL): The American Board of Medical Specialists. c2000 - [cited 2001 Mar 8]. Available from: <http://www.abms.org/newsearch.asp> Cancer-Pain.org [Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [updated 2002 May 16; cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.cancer-pain.org/>.
- Borkowski MM. Infant sleep and feeding: a telephone survey of Hispanic Americans [dissertation]. Mount Pleasant (MI):Central Michigan University; 2002
- Chanungklang P, Vongchan P. Screening and identification of alloantibodies in blood samples from Community Medical Service Project, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University [Term paper]. Faculty of Associated Medical Sciences: Chiang Mai University; 2012 (in Thai).
- Harnden P, Joffe JK, Jones WG, editors. Germ cell tumours V. Proceedings of the 5th Germ Cell Tumour Conference; 2001 Sep 13-15; Leeds, UK. New York: Springer, 2002.
- Portney JG, Watkins MP. Foundation of clinical research applications to practice. 2nd United States of America. Julie Alexandar; 2000.