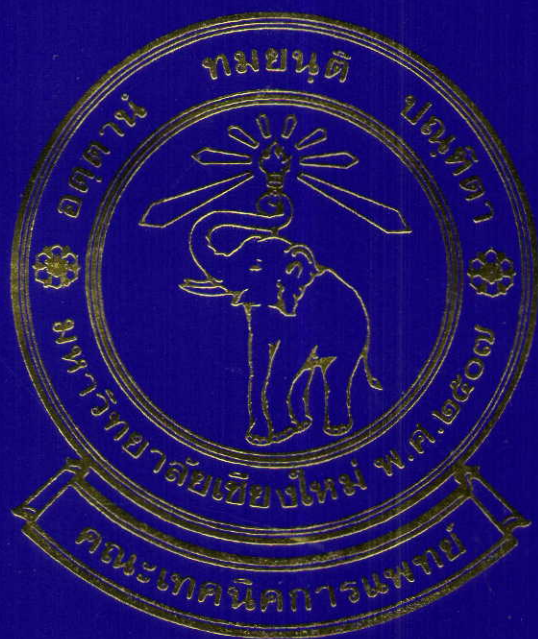


วารสาร เทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่



**BULLETIN OF
CHIANG MAI
ASSOCIATED MEDICAL SCIENCES**

ปีที่ 39 ฉบับที่ 1 มกราคม 2549

ISSN 0125-5347

เทคนิคการแพทย์ ภาพถ่ายบำบัด กิจกรรมบำบัด รังสีเทคนิค

วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่

วัตถุประสงค์	เพื่อเผยแพร่ผลงานทางวิชาการสาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ รังสีเทคนิค กิจกรรมบำบัด กายภาพบำบัด และสาขาอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับทางด้านวิทยาศาสตร์สุขภาพ			
เจ้าของ ที่ปรึกษากิตติมศักดิ์	คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่			
บรรณาธิการ	ปรียานาถ	วงศ์จันทร์	preyanat@chiangmai.ac.th	
รองบรรณาธิการ	วาสนา	ศิริรังษี	asmbio01@chiangmai.ac.th	
กองบรรณาธิการ	วารุณี	คุณาชีวะ	asiwknch@mail.chiangmai.ac.th	
	ระวีวรรณ	กันไพเราะ	raweewan@ams.cmu.ac.th	
	ธนศักดิ์	ดาตุ	asittt@chiangmai.ac.th	
	ทศพร	พิชัยยา	todd@chiangmai.ac.th	
	ศุสิพร	ชีวะพาณิษฐ์	asischwp@chiangmai.ac.th	
	วรรณนิภา	บุญระยอง	asiwbnry@chiangmai.ac.th	
	รัชดา	เกรสซี่	ratchadasuaeyun@hotmail.com	
ผู้จัดการ	จริยา	กาทอง	jariya.g@chiangmai.ac.th	
ฝ่ายจัดการและทะเบียน				
	วันเพ็ญ	ไวสืบขาว	พิมลมาส	ไทรเดช
	รุ่งระวี	ชุตินา	สนั่น	นันตะเสน
	อัมพร	จุ่มเขียว	อรพรรณ	สามคำ
เหรียญกิตติมศักดิ์	สุภาพร	นิลเกษ	s.nilkesh@ams.cmu.ac.th	
ศิลปกรรม	ธนัทพล	ศรีแสง	tanatpon@ams.cmu.ac.th	
กำหนดออก	ราย 4 เดือน (มกราคม, พฤษภาคม, กันยายน)			
พิมพ์ที่	หจก.ชนบรรณการพิมพ์ 319/1-2 ถนนเจริญเมือง ต.วัดเกต อ.เมือง จ.เชียงใหม่			
	โทร. 0-5324-4365 โทรสาร. 0-5324-4365			

เลขหมู่.....
 เลขทะเบียน AMS.....
 วัน เดือน ปี.....

BULLETIN OF CHIANG MAI ASSOCIATED MEDICAL SCIENCES

OBJECTIVE : Bull Chiang Mai Assoc Med Sci (ISSN 0125-5347) publishes the editorials, original research articles, general articles, short technical reports, notes, letters to editor, miscellany and abstracts. Manuscripts relevant to any of all aspects of medical technology, radiologic technology, occupational therapy and physical therapy are welcome.

OFFICIAL PUBLISHER : Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University. Chiang Mai, Thailand.

HONORED CONSULTANT : Chairaj Saeng-Udom

EDITOR IN CHIEF : Preeyanat Vongchan preyanat@chiangmai.ac.th

ASSOCIATED EDITOR : Wasna Sirirungsi asmbio01@chiangmai.ac.th

BOARD OF EDITORS : Warunee Kunachiwa asiwknch@mail.chiangmai.ac.th

Raweewan Gunphairoh raweewan@ams.cmu.ac.th

Thanusak Tatu asittt@chiangmai.ac.th

Todsaporn Pichaiya todd@chiangmai.ac.th

Sulibhorn Cheewapanich asischwp@chiangmai.ac.th

Wannipa Bunrayong asiwbny@chiangmai.ac.th

Rachada Cressey ratchadasuaeyun@hotmail.com

BUSINESS MANAGER : Jariya Karthong jariya.g@chiangmai.ac.th

MANAGER AND REGISTRA STAFF :

Wanpen Waiseubkaow Pimolmas traidej

Rungrawee Chutima Sanun Nuntasen

Amporn Jumkeow Orrapun Sam-com

TREASURER : Supaporn Nilakesh s.nilakesh@ams.cmu.ac.th

ILLUSTRATOR : Tanatpon Srisawaeng tanatpon@ams.cmu.ac.th

PUBLISHED : Tertially (January, May, September)

SUBSCRIPTION : Subscriptions are to be prepaid; and rates per year: \$US 15 for all outsides.

EDITORIAL OFFICE : All correspondence should be addressed to the editor

Preeyanat Vongchan

Faculty of Associated Medical Sciences,

Chiang Mai University, Thailand 50200



วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่
ปีที่ 39 ฉบับที่ 1 มกราคม 2549

สารบัญ

	หน้า
บทบรรณาธิการ	1
นิพนธ์ต้นฉบับ	
การตอบสนองภาวะออกซิเดทีฟสเตรสจากการออกกำลังกายหนักในปัสสาวะ และเลือดของคนปกติ: การศึกษานำร่อง	2
นันทกุล ลีลารุ่งระยับ, จิตตรัตน์ ตันเสนีย์, ประภาส โพธิ์ทองสุนันท์, นันทยา ชนะรัตน์ การตรวจเซลล์มะเร็งในน้ำช่องเยื่อหุ้มปอดและช่องท้องโดยวิธีเซลล์วิทยาวิจักษ์ใน โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างปี พ.ศ. 2540- 2541	10
ธานินทร์ การวัฒนาศิริกุล การเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ระดับ Alpha-fetoprotein (AFP) ในซีรัม ด้วยวิธี Microparticle Enzyme Immunoassay (MEIA) และวิธี Electrochemiluminescence Immunoassay (ECLIA)	19
อารีย์ ประสิทธิพยางค์, ผ่องพรรณ ร่มหิรัญ, สมมาตย์ จันทร การสร้างและผลิตโปรตีนเอนไซม์ Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase ของเชื้อ Plasmodium falciparum	27
ปนัดดา เทพอัคสร, อณิชา เลื่องชัยเชวง, พงษ์วิทย์ บัวล้อมใบ, เครือวัลย์ พลจันทร์, ปฐม สุวรรณปัญญาเลิศ ผลระยะยาวของการออกกำลังกายแบบ 12 Minute Walk Test ที่มีต่อสมรรถภาพร่างกาย ในเพศหญิงที่มีน้ำหนักตัวเกิน	36
กรกฎ เห็นแสงวิไล, สายนที ปรรณนาผล รูปแบบทางพันธุกรรมของเอนไซม์โคไลน์เอสเตอเรสในน้ำเลือดประชากรไทยภาคเหนือ	42
วราณี จิตอารี, ทิพวรรณ ประภามณฑล, ศักดิ์ระพี อินชีอาจ อุบัติการณ์การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ (Atypical pneumonia) ในผู้ป่วย โรงพยาบาลนครพิงค์ จังหวัดเชียงใหม่	52
เจียรนัย ชันติพงศ์, วีรยุทธ โฆษิตสกุลชัย The cytotoxic effect of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin purified from Turmeric powder on leukemic cell lines	60
Songyot Anuchapreeda, Wittawat Sadjapong, Chadarat Duangrat, Pornngarm Limtrakul	

การติดเชื้อ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ในจังหวัดน่าน	72
(1 ตุลาคม พ.ศ. 2540 - 30 กันยายน พ.ศ. 2548)	
เดช อมรทิพย์วงศ์, ไพบุลย์ ทนน์ไชย, เอนก คำฝั้น, พวงมณี จิตดวงศ์พันธ์	

บทความปริทรรศน์	
แนวปฏิบัติทางคลินิก : การรักษาด้วยการจัดท่าเพื่อระบายเสมหะ	82
Clinical Guideline: Postural Drainage Therapy (PDT)	
ศุสิทธิ์ ชีวะพาณิชย์	

คอลัมน์ถาม-ตอบ	
กรณีศึกษาทางธนาคารเลือด	93
ปริยานาถ วงศ์จันทร์	

บทอาลัย

สวัสดีปีใหม่ ๒๕๔๙ แต่ท่านผู้อ่านทุกท่านคะ ดิฉันขออำนาจสิ่งศักดิ์สิทธิ์ทั่วสากลโลกจงช่วยดลบันดาลความสุขสวัสดิ์บังเกิดแก่ทุกท่าน ขอให้มีความสุขกายสุขใจ ประสบความสำเร็จในหน้าที่การงานและครอบครัว ตลอดปีใหม่นี้และตลอดไปด้วยค่ะ

งานประชุมวิชาการคณะเทคนิคการแพทย์ประจำปี ๒๕๔๘ ซึ่งผ่านพ้นไปเมื่อเดือนธันวาคมที่ผ่านมาประสบความสำเร็จเป็นอย่างดี ดิฉันหมายถึงนอกจากด้านวิชาการแล้ว ยังเป็นช่วงเวลาแห่งความสุขของพวกเราชาวคณะเทคนิคการแพทย์ทุกสาขาวิชา ที่ได้มาพบกัน พูดคุยกันในเรื่องต่างๆ ตั้งแต่ความหลังครั้งโน้นจนถึงเรื่องปัจจุบัน ดิฉันในฐานะประธานจัดงานรู้สึกภาคภูมิใจ ยินดีและมีความสุขใจมากที่ได้เห็นหน้าเพื่อน พี่ๆ และน้องๆ และหวังว่าการประชุมวิชาการประจำปี นอกจากจะเป็นการจัดเพื่อการเผยแพร่และแลกเปลี่ยนความรู้แล้ว ยังเป็นเวลาที่เราจะได้พบกันด้วย ปีหน้าหวังว่าเราจะได้พบกันอีก ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะต่างๆ จากทุกท่านจะถูกนำมาปรับปรุงและแก้ไขเพื่อให้ทุกสิ่งทุกอย่างดีขึ้นตลอดเวลาค่ะ

ตลอดช่วงปี ๒๕๔๘ จะเป็นวาระแห่งการเฉลิมฉลองครบรอบ ๓๐ ปีของคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ซึ่งจะได้จัดให้มีกิจกรรมต่างๆ มากมาย สามารถติดตามได้จากเว็บไซต์ของคณะฯ หากมีโอกาสขอเชิญชวนศิษย์เก่าทุกท่านช่วยสนับสนุนคณะฯ ด้วยนะคะ และอย่าลืมว่าทางคณะฯ จะได้จัดทำมุมวิชาการสำหรับศิษย์เก่าทุกท่านทุกสาขาวิชาเพื่อการพัฒนาความรู้วิชาการ สนองนโยบาย “Life-long learning” ซึ่งประกอบด้วยบทความวิชาการที่น่าสนใจ การตอบคำถามต่างๆ โดยคณาจารย์ที่รับผิดชอบ ที่สำคัญจากงานประชุมวิชาการ ศิษย์เก่าทุกท่านได้สละเวลาเพิ่มเติมเปลี่ยนแปลงฐานข้อมูลของตนเองให้แก่ทางคณะฯ เพื่อจะได้นำไปปรับปรุงฐานข้อมูลบนเว็บไซต์ ทุกท่านสามารถติดตามได้นะคะ

วารสารฉบับนี้เช่นเคยค่ะ ประกอบด้วยความรู้ทางวิชาการ บทความปริทรรศน์และถามตอบทางวิชาการเลือกกองบรรณาธิการยังยินดีรับนิพนธ์ต้นฉบับจากทุกท่านอยู่ตลอดเวลาค่ะ ทำงานวิจัยในที่ทำงาน ข้อมูลที่ได้เผยแพร่ให้ผู้อื่นได้ทราบและนำไปปฏิบัติ จัดว่าเป็นสิ่งที่มีคุณค่าอย่างยิ่ง

แล้วพบกันฉบับหน้านะคะ

ผศ. ดร. ปรียานาถ วงศ์จันทร์
บรรณาธิการ

นิพนธ์ต้นฉบับ**การตอบสนองภาวะออกซิเดทีฟสเตรสจากการออกกำลังกายอย่างหนัก
ในปัสสาวะและเลือดของคนปกติ: การศึกษานำร่อง**

นัฏฐกาล อีลารุ่งระยับ*, จิตตรัตน์ ตันเสนีย์*, ประภาส โพธิ์ทองสุนันท์, นันทยา ชนะรัตน์**

บทคัดย่อ

การศึกษานี้สนใจถึงผลกระทบจากการออกกำลังกายอย่างหนักในคนปกติต่อการกระตุ้นการออกซิเดชันของเหล็กและกระบวนการออกซิเดชันของไขมันที่เกิดขึ้นในเลือดและในปัสสาวะ โดยให้อาสาสมัครที่มีสุขภาพดี จำนวน 15 คน ออกกำลังกายอย่างหนักตามโปรแกรมการออกกำลังกายที่ได้ประยุกต์จากโปรแกรมของ Bruce ทำการเจาะเลือดก่อนและหลังการออกกำลังกายทันที ปัสสาวะได้ถูกเก็บก่อนและหลังหยุดออกกำลังกายทันทีและนาที่ที่ 20 นำเลือดและปัสสาวะมาทำการตรวจวัดปริมาณของมาลอนไดออลดีไฮด์ และการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของเหล็กด้วยวิธี TBARS และ FOX. นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Wilcoxon Signed Rank Test และ Related Paired t-test ผลการศึกษาพบว่าการออกกำลังกายอย่างหนัก สามารถเพิ่มปฏิกิริยาการเกิดออกซิเดชันของเหล็กทั้งในเลือดและในปัสสาวะที่นาที่ที่ 20 อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนปริมาณของมาลอนไดออลดีไฮด์ในเลือดเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยและไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ในปัสสาวะพบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในนาที่ที่ 20 เมื่อเปรียบเทียบกับก่อนออกกำลังกาย การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการตรวจวัดภาวะออกซิเดทีฟสเตรสจากการออกกำลังกายอย่างหนักสามารถตรวจวัดได้ทั้งในเลือดและในปัสสาวะ สามารถนำมาใช้ในงานวิจัยด้านวิทยาศาสตร์การกีฬาในอนาคตได้ต่อไป วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2549; 39: 2-9.

คำสำคัญ: การออกกำลังกายอย่างหนัก ภาวะออกซิเดทีฟสเตรส มาลอนไดออลดีไฮด์ ปฏิกิริยาออกซิเดชันของเหล็ก

-
- * กลุ่มวิจัย Clinical Biochemistry and Movement Sciences Research Group. ภาควิชากายภาพบำบัด,
 - ** ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Abstract : Oxidative Stress Response to Exhaustive Exercise in Urine and Blood of Healthy Subjects : Preliminary Study

Nuttakaan leelarugnrayub^{*}, Jittarat Tansenee^{*}, Prapas Pothongsunun^{*}, Nantaya Chanarat^{**}

This study aimed to determine the effects of exhaustive exercise in sedentary subjects on the activation of the ferrous oxidation and lipid peroxidation in the blood and urine. Exhaustive exercise program was followed by a modified Bruce protocol in 15 healthy subjects. Blood and urine were collected at pre and post exercise immediately. Only urine was additionally collected at 20 minutes post exercise. Malondialdehyde and Ferrous oxidation were determined by Ferrous oxidation xynol-orange (FOX) and TBARs assays. Data were statistically analysed by using a Wilcoxon Signed Rank test and related paired t-test. The results showed that exhaustive exercise increased significantly the ferrous oxidation in blood and urine at 20 minutes after stop exercise immediately. Whereas lipid peroxidation slightly increased. In urine, the malondialdehyde increased significantly at 20 minutes after stop exercise. Therefore, this study showed the evaluation of the oxidative stress from exhaustive exercise would be analyzed from the blood and urine which could be applied to sport sciences researches in the future. *Bull Chiang Mai Assoc Med Sci* 2006; 39: 2-9.

Key words: Exhaustive exercise, Oxidative Stress, Malondialdehyde, Ferrous Oxidation.

^{*} Clinical Biochemistry and Movement Sciences Research Group. Departments of Physical Therapy and

^{**} Clinical Chemistry, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University.

Introduction

Nowadays, many reports show the exhaustive exercise-induced oxidative stress¹. The potential sources of free radical generation in exercising muscle are mainly from mitochondria, xanthine oxidase, prostanoid metabolism, catecholamines, NAD(P)H oxidase and secondary sources as phagocytosis or calcium accumulation in the cell². Physical exercise requires energy source as adenosine triphosphate (ATP) which is primary produced by mitochondrial oxidative phosphorylation. Re-oxygenation or

reperfusion with oxygenated blood results in local and systemic effects which may cause more tissue damage³. Free radicals are capable of independent existence and produced in all living cells. Reactive oxygen species (ROS) or reactive nitrogen species (RNS), e.g., superoxide (O₂⁻), hydroxyl (OH^{*}), alkoxyl (RO^{*}), peroxy (ROO^{*}), hydroperoxide (-OOH), and peroxy nitrite (NOO^{*}) are capable of readily oxidizing another biological molecules, including carbohydrates, amino acids, fatty acids, and nucleotides. Scavenging mechanism of all free

radical produced *in vivo* by both enzyme- and non-enzyme antioxidants are presented. Antioxidant enzymes include superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase, The main non-enzymic antioxidants include glutathione (GSH), vitamin E and vitamin C¹. Free radical induces many protein and lipid oxidation products in the blood circulation. Some reports showed the physical exercise lead to an increase in lipid peroxidation.⁴ Protein hydroperoxide (PrOOH) is a stable and propagation of radical reactions on other protein, lipid, and DNA⁵. Thus, this study aimed to determine the response of oxidative stress in sedentary subjects by evaluating the lipid peroxidation and ferrous oxidation status in

blood and urine from exhaustive exercise.

Methods and Materials

Materials, glass wares and chemicals

Glassware were cleaned with warm concentrated nitric acid and thoroughly rinsed with double distilled water before experiments. All other reagents were at least of reagent grade. Xylenol orange [o-cresolsulfonphthalein-3, 3-bis (sodium methylimino diacetate)], Guanidine hydrochloride, Perchloric acid (AR grade; 70-72%), Thiobarbituric acid (TBA), Malonaldehyde (bis) and ammonium ferrous sulfate were purchased from Aldrich (USA).



Subjects

This study was approved by Ethic Committee of Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand. A total of 15 subjects was studied in an exhaustive exercise by modified Bruce protocol with a Series 200 treadmill (Marquette medical systems, Inc. Milwaukee, USA).

The testing protocol composed of 10 steps and 3 minutes in each steps. The heart rate at 85% of maximum heart rate or rate perceived exertion (RPE) at 9 was a final target for stop testing. Blood at pre- and immediately post-exercise test from venous puncture (# 21) were collected in non-heparinized tube. Serum was separated by gentle

centrifuge at 1000 rpm shortly and kept in cool (4°C) for 2 hours. Urines at pre-, and post-exercise (immediately and 20 minutes) were collected and kept in cool (4°C).

The Exercise Protocol

The exhaustive exercise was followed from the Modified Bruce protocol and target heart rate (Target MHR) was performed from recommendation of American College Sport Medicine (ACSM)'s guidelines⁶.

Step I: 5 minutes for warm up with hip flexion/extension, stretching the quadriceps, hamstrings, and gastrocnemius under 35% of maximum heart rate, and score of rate perceived exertion (RPE) less than 10.

Step II: Protocol testing by following steps and each step performed for 3 minutes.

- I velocity 1.7 mph with 0% slope
- II velocity 1.7 mph with 5% slope
- III velocity 1.7 mph with 10 % slope
- IV velocity 2.5 mph with 12% slope
- V velocity 3.4 mph with 14% slope
- VI velocity 4.2 mph with 16% slope
- VII velocity 5.0 mph with 18% slope
- VIII velocity 5.5 mph with 20% slope

Step III: 5 minutes for cool down with slow walking on treadmill.

The target heart rate was at 85% of maximal heart rate and RPE at 14-15. Any symptoms as leg pain, muscle thigh, unwilling of subjects were criteria to stop exercise.

Serum and urine malondialdehyde analysis

Malondialdehyde (MDA), the lipid peroxidation product was determined with modified Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS)⁷. The 100 µl of sample (urine or serum) was precipitated with 100%

trichloroacetic acid (TCA) in 6 M HCl and mixed with 450 µl of normal saline solution (0.9% NSS), 200 µl of (4%) thiobarbituric acid (TBA) reagent. The whole mixture was incubated in 90°C water bath for 30 minutes then cooled in water. After centrifugation at 6,000 rpm for 5 minutes at 4°C, the absorbance was read at 532 nm. The concentration of malondialdehyde was calculated from the standard malondialdehyde (Sigma).

Ferrous oxidation analysis

The activity of blood and urine on activation the ferrous oxidation were evaluated by FOX method from Gay's protocol⁸. To perform modified FOX assay, 100 µl of serum was taken and precipitated the protein with 500 µl of 0.2 M perchloric acid (PCA) and centrifuged at 6500 rpm for 10 minutes (4°C). The pellet protein was dissolved in 1,000 µl of 6 M guanidine hydrochloride. The lipid was removed twice by 100 µl of absolute chloroform containing 2%BHT. The 700 µl of upper layer was mixed with 40 µl of 0.5 M PCA, 25 µl of 5 mM xylenol orange and 5 mM ferrous solution. For urine method, 700 µl of sample was incubated directly with 0.5 M PCA, 5 mM xylenol orange and 5 mM ferrous solution. After keeping at room temperature in the dark for 30 min, the mixture was centrifuged at 10,000 rpm for 3 min (4°C). The oxidative activity in blood and urine was calculated by compared with the absorbance at 560 nm of the standard t-butyl hydroperoxide (1-10 µM) (Sigma).

Statistical analysis

All data were presented as mean±standard error of mean (SEM). The levels of malondialdehyde and ferrous oxidation in blood before and after exercise were compared with paired t-test, whereas MDA and Ferrous oxidation in urine at various periods were statistically analyzed by a Wilcoxon

Signed Rank Test or repeated multiple variables test.

Results

This experiment was studied in 15 subjects

with mean±SD of age = 20.75±1.89, range = 19-24 years, and BMI = 19.75±1.71 kg/m². The mean±SD of RPE and a percentage of heart rate compared with maximal HR were 14.13±2.45 and 77.67±4.92.

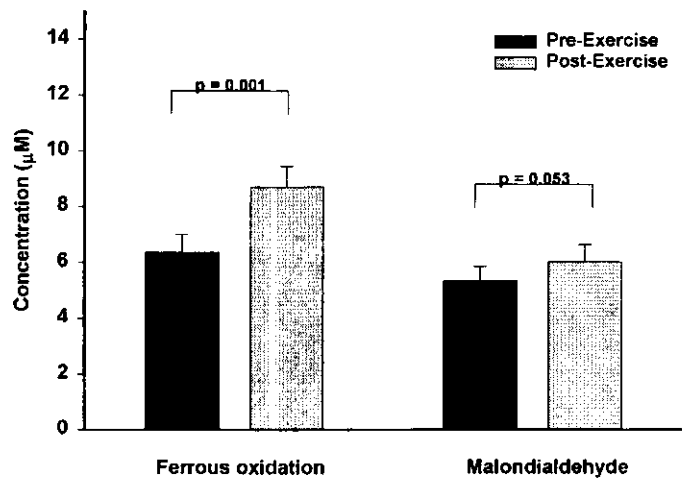


Figure 1. showed mean±SEM of serum malondialdehyde levels and ferrous oxidation relative to tert-butyl hydroperoxide levels before and post-immediately exercise). Note; p value was calculated by related paired t-test.

The levels of serum MDA were increase without significant difference: 5.32±0.54 vs 6.01±0.61 μM respectively before and after exercise. Whereas ferrous oxidation increased significantly (6.36±0.63 & 8.71±0.74 μM, p< 0.05).

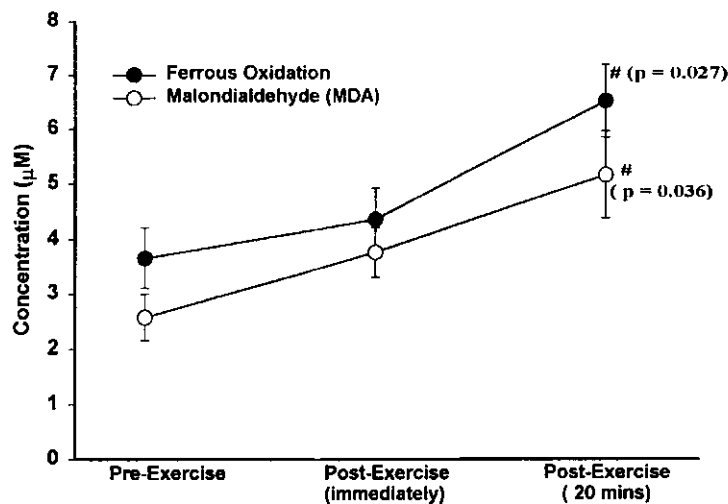


Figure 2. The levels of urine malondialdehyde and ferrous oxidation relative to tert-butyl hydroperoxide at pre-exercise, and post-exercise (immediately and at 20 min). Note; # represented different statistics compared with pre-exercise period and p was calculated with repeated variable measurement.

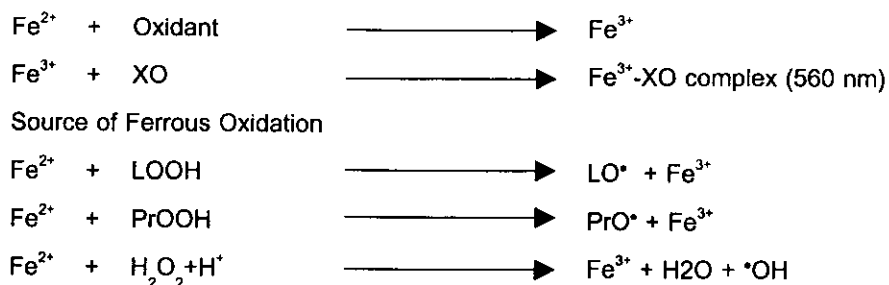
Urinary malondialdehyde and ferrous oxidation levels before and, immediately and at 20 minutes after stop exercise were shown in figure 2. The results showed increased tendency with time response in both MDA and ferrous oxidation; malondialdehyde was 2.58 ± 0.42 , 3.77 ± 0.72 , and $5.17 \pm 0.56 \mu\text{M}$ respectively, and ferrous oxidation was 3.66 ± 0.85 , 4.36 ± 0.7 , and $6.52 \pm 0.8 \mu\text{M}$ respectively. Both levels significantly by increased at 20 minutes after exercise termination compared with before exercise, whereas immediately post exercise termination showed no any difference.

Discussion

Oxidative stress from exhaustive exercise from

this study showed that two biochemical parameters MDA and ferrous oxidation product were increased. The malondialdehyde is the end product of lipid oxidation is formed after oxidation of lipid due to peroxy radicals, and hydrogen peroxide, or non-radical species^{9,10}. This results was similar to the previous reports that represented higher lipid peroxidation on low density lipoprotein (LDL) and very low density lipoprotein (VLDL) fraction in plasma of marathon runner 42 kilometers (male=21, female=25)¹¹.

The activity of blood and urine on oxidation the ferrous as determined by FOX method which is an evaluation a Fe^{3+} -XO complex and detectable at 560 nm.



Various oxidant molecules that can motivate this system in the body, for example; protein hydroperoxide (PrOOH), lipid hydroperoxide (LOOH), H_2O_2 , or excessive ferrous ion (Fe^{2+}) in the fluid¹².

In this study, the method presumed the ferrous oxidation from protein hydroperoxide (PrOOH) only by extraction the lipid out and precipitate the

protein. Generally the activating protein (PrH) with various oxidants H_2O_2 or $\bullet\text{OH}$ occurs in biological system. The carbon-centered free radical (Pr $^\bullet$) produced will be oxidized to form protein peroxy radical (PrOO $^\bullet$) and finally to protein hydroperoxide (PrOOH)¹².



Interesting in the results represented the oxidative stress in the urine. Normally, urine contains with various substances, mainly urea and many metabolites that possible give a false positive result. However, the determination of these aldehydes from measurements of thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) adducts clearly lacks specificity. It may contaminate with proteins, oxidized lipids, amino acids or sialic acid. As same as the ferrous oxidation, this method is widely used to detect the hydroperoxide. But this situation used this protocol to detect the oxidative stress situation whether, hydroperoxide, hydrogen peroxide, ferrous or ferric ions, although there may be any molecules that gives the positive results in this test. Nevertheless, we found the responsive results after exhaustive exercise with time dependent that reflects to the body response to exercise. It means that detection the lipid peroxidation and ferrous oxidation products in urine can be applied to investigate the oxidative stress in sport researches in the future, especially to evaluate the body injury from some special training program, nutrition supplement, or medical treatment.

Acknowledgement

This study was granted by Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand.

References

1. Cooper CE, Vollaard NBJ, Choueiri T, Wilson MT. Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem. Soc. Transac.* 2002; 30: 280-384.
2. Jackson MJ. Exercise and oxygen radical production by muscle. In Sen, C.K., Packer, L., Hanninen, O (eds). *Handbook of oxidants and antioxidant in exercise.* Marcel Dekker, Inc. New York. 2000: 57-66.
3. Tisi PV, Shearman CP. Claudication exercise and antioxidant. In. Sen LCK, Hanninen PO (eds). *Handbook of Oxidants and Antioxidant in Exercise.* Marcel Dekker, Inc. New York.; 2000: p1973.
4. Dillard CJ, Litov RE, Savin WM, Dumelin EE, Tappel AL. *Appl. Physiol* 1978; 45: 927-932.
5. Hawkins CL, Davies MJ. Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochem. Biophys. Acta* 2001; 1504: 196-219.
6. ACSM's guidelines for exercise testing and prescription. 6th ed. Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, 2000.
7. Hensagvilai K, Leelarungrayub N, Chanarat N. The relationship between gross motor function measurement score (GMFMS) and glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) levels in children with cerebral palsy. 14th International WPCT congress, Barcelona, Spain 2003.
8. Gay CA, Gebicki JM. Measurement of protein and lipid hydroperoxides in biological systems by the ferrixylenol orange method. *Anal Biochem* 2003; 315: 29-35.
9. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J. Lipid Res.* 1998; 39: 1529-1542.
10. Aslan R, Sekeroglu MR, Tarakcioglu M, Bayiroglu F, Meral I. Effect of acute and regular exercise on antioxidative enzymes, tissue damage markers and membrane lipid peroxidation of erythrocytes in sedentary students. *Trop. J. Med. Sci.* 1998; 28: 411-414.
11. Kaikkonen J, Porkkala-Sarataho E, Tuomainen TP, Nyyssonen K, Kosonen L, Ristomaa U, Lakka HM, Salonen R, Korpela H, Salonen JT. Exhaustive exercise increases plasma/serum total oxidation resistance in moderately trained

men and women, whereas their VLDL + LDL lipoprotein fraction is more susceptible to oxidation. Scand J. Clin. Lab. Invest. 2002; 62: 599-607.

12. Gebicki JM. Protein hydroperoxide as new reactive oxygen species. Redox Rep. 1997; 3: 99-110.

นิพนธ์ต้นฉบับ**การตรวจเซลล์มะเร็งในน้ำช่องเยื่อหุ้มปอดและช่องท้องโดยวิธีเซลล์วิทยาวินิจฉัยใน
โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ ระหว่างปี พ.ศ. 2540- 2541****ธานินทร์ การวัฒนาศิริกุล*****บทคัดย่อ**

วัตถุประสงค์ : เพื่อหาอายุเฉลี่ยของผู้ป่วยที่มีน้ำช่องเยื่อหุ้มปอดและช่องท้องที่มีผลบวกและผลลบของมะเร็งและหาความสัมพันธ์ของการมีเลือดปนในน้ำช่องเยื่อหุ้มปอดและช่องท้องกับการเป็นมะเร็ง

วิธีการ : น้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดและช่องท้องจากโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ระหว่างปีพ.ศ. 2540- 2541 ทำการเตรียมสเมียร์ในห้องปฏิบัติการเซลล์วิทยาของภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และย้อมสีโดยทางเทคนิคของห้องปฏิบัติการเซลล์วิทยา

ผลการศึกษา : ตัวอย่างทั้งหมด 956 ราย พบว่าผลตรวจ pleural effusion ที่เป็น positive จำนวน 151 ราย (25.2 %) และ ascites effusion ที่เป็น positive จำนวน 88 ราย (24.6 %) ช่วงอายุของผู้ป่วยที่พบเซลล์มะเร็งมากคือช่วงอายุระหว่าง 51 ปีถึง 70 ปี อายุเฉลี่ยเพศชายที่ผลตรวจ pleural effusion เป็น positive เท่ากับ 60.5 ปี หญิงเท่ากับ 54.8 ปี อายุเฉลี่ยเพศชายที่ผลตรวจ ascites effusion เป็น positive เท่ากับ 57.7 ปี หญิงเท่ากับ 50.4 ปี การศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้ตรวจเซลล์ใน pleural และ ascites ที่เป็นชนิด serosanguinous effusion ผล positive จำนวน 153 ราย (64.0 %) ซึ่งแปลว่า serosanguinous effusion มีความสัมพันธ์กับการพบเซลล์มะเร็ง

สรุป : อายุเฉลี่ยที่เกิดเป็นมะเร็งในน้ำช่องเยื่อหุ้มปอดและช่องท้องคือ 60.5 และ 57.7 ปีในเพศชายและ 54.8 และ 50.4 ปีในเพศหญิง ตามลำดับ และ serosanguinous effusion มีความสัมพันธ์กับการพบเซลล์มะเร็ง วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2549; 39: 10-18.

คำรหัส : เซลล์มะเร็ง, น้ำช่องเยื่อหุ้มปอด, น้ำช่องท้อง, เซลล์วิทยา

*ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Abstract : The Cytologic Diagnosis of Malignant Neoplasm in Pleural and Ascites effusion of Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital during 1997 – 1998.

Tanin Kanwattanasirikul*

Objective : To investigate the average age of positive or negative for cancer in pleural and ascites effusions and the relation between serosanguinous effusion with positive cancer in pleural and ascites effusions.

Materials and Methods : Pleural and ascites effusions were sent from Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital to Department of Pathology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University during 1997 – 1998. On arrival, the smears were prepared on clean glass slides by cytology laboratory method.

Results : A total of 956 cases were collected. It was found that 151 cases (25.2%) had pleural effusion positive for cancer and 88 cases (24.6%) had ascites effusion positive for cancer. Incidence of finding cancer cells was highest in cases aged 51 – 70 years old. Average age of cases "positive" in pleural effusion was 60.5 years for males and 54.8 years for females and that "positive" in ascites effusion was 57.7 years for males and 50.4 years for females. In this study, cytologic diagnosis was positive for serosanguinous effusion in 153 cases (64.0%) which suggested that serosanguinous effusion was associated with cancer cells finding.

Conclusion : Average age of positive for cancer in pleural and ascites effusion was 60.5 and 57.7 years for males and 54.8 and 50.4 years for females, respectively. Serosanguinous effusion was associated with cancer cells finding. Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2006; 39: 10-18.

Key words : Cancer cell, Pleural effusion, Ascites effusion, Cytology.

*Department of Pathology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University.

บทนำ

การตรวจ effusion โดยวิธีเซลล์วิทยาวินิจฉัยเพื่อหาเซลล์มะเร็ง ได้มีมานานกว่า 110 ปี มาแล้ว ในปี ค.ศ. 1867 Lucke และ Klebs⁽¹⁾ ได้สาธิตเซลล์มะเร็งที่พบใน effusion ก่อนสงครามโลกครั้งที่ 2 นักเซลล์วิทยา Bahrenberg⁽²⁾ และ Mandlebaum⁽³⁾ ได้พัฒนาเทคนิควิธีการตรวจหาเซลล์มะเร็งใน effusion โดยการทำบล็อกพาราฟินจากตะกอน (sediment) ของ effusion หลังจาก

สงครามโลกครั้งที่ 2 ได้มีนักเซลล์วิทยาหลายท่านได้ย้อมเซลล์ในเสมียร์ของ effusion โดยวิธี Papanicolaou ในการสเมียร์ effusion^(5,6) ได้มีเทคนิคเพิ่มเติมขึ้นหลายวิธีเช่น มีการใช้ Millipore filter⁽⁷⁾ และการย้อมสีโดยการย้อมสี Giemsa ยังสเมียร์จาก effusion โดยการฝังให้แห้งในอากาศ (air-dried)⁽⁸⁾ และในปัจจุบันได้มีวิธีการที่ทันสมัยขึ้นมาก มีเครื่อง Cytospin⁽⁹⁾ เพื่อช่วยในการรวบรวมเซลล์จาก fluid ที่มีจำนวนน้อยให้ไปเป็นสเมียร์บนสไลด์

ได้เป็นอย่างดี ทำให้การวินิจฉัยตรวจพบเซลล์มะเร็ง ผิดพลาดน้อยลงมาก

วัตถุประสงค์ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาอัตราการเป็นมะเร็งและหาความถี่ตามอายุของผู้ป่วยที่เป็นมะเร็ง ในการตรวจ pleural และ ascites โดยการตรวจทางเซลล์วิทยาวินิจฉัย และหาอายุเฉลี่ยของผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งจากผู้ป่วยที่มะเร็งและไม่เป็นมะเร็งจากผู้ป่วยที่ตรวจเซลล์จาก pleural และ ascites effusion และหาความสัมพันธ์กับลักษณะ effusion ที่เป็น serous และ serosanguinous ว่ามีความสัมพันธ์กับการพบเซลล์มะเร็งใน effusion อย่างไรในการตรวจเซลล์วิทยาวินิจฉัยของ pleural และ ascites effusion และประการสำคัญ ตัวเลขสถิติของงานวิจัยนี้ จะได้เปรียบเทียบกับผลการวิจัยของผู้อื่นด้วย เพื่อเป็นประโยชน์กับผู้ป่วยในการรักษาและป้องกันการเป็นมะเร็งเยื่อหุ้มปอดและช่องท้อง และเป็นแนวทางของการวิจัยของนักวิจัยอื่นในอนาคตต่อไป

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างส่งตรวจระหว่าง พ.ศ. 2540 ถึงปี พ.ศ. 2541 โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ได้ให้บริการตรวจ pleural และ ascites ของผู้ป่วยที่มาจากจังหวัดต่างๆ ในภาคเหนือของประเทศไทยมีจำนวนผู้ป่วยทั้งสิ้น 956 ราย เป็น pleural effusion 599 ราย และ ascites effusion 357 ราย สิ่งส่งตรวจทั้งหมดส่งมาที่ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในการทำวิจัยครั้งนี้สิ่งส่งตรวจทั้งหมดถูกตรวจนับดูเม็ดเลือดแดงใน pleural effusion และ ascites effusion ว่ามีจำนวนเม็ดเลือดแดง 10,000 เซลล์/ลบ.ซม. หรือไม่⁽¹⁰⁾ โดยวิธีทางโลหิตวิทยา⁽¹¹⁾ คือ ใช้ปิเปตต์สำหรับนับเม็ดเลือดแดงดูด effusion มาถึงขีด 0.5 จากนั้นดูดน้ำยา Gower's solution จนถึงขีด 101 (อัตราเจือจางเป็น 1:200) หยดลงบน Hemacytometer ทำการนับเม็ดเลือดแดง ถ้าเกินจะจัด effusion นั้นเป็น serosanguinous effusion ถ้าไม่ถึงหรือไม่พบเซลล์เม็ดเลือดแดง effusion ทั้งหมดจะถูกปั่นและสมียร์บนสไลด์โดยวิธีการทางห้องปฏิบัติการเซลล์วิทยา⁽⁹⁾ ย้อมสีเซลล์โดยวิธีของ Papanicolaou⁽⁹⁾ ถ้าปริมาตรของสิ่งส่งตรวจมีน้อยหรือคาดว่าจะมีเซลล์จำนวนน้อย สิ่งส่งตรวจเหล่านั้นจะนำไปปั่นในเครื่อง

Cytospin ตามวิธีการทางห้องปฏิบัติการเซลล์วิทยาต่อไป

การวินิจฉัยเซลล์ (ดัชนี)

การแบ่งลำดับการแยกความรุนแรงของการตรวจ effusion มีดังนี้⁽¹²⁻¹⁵⁾ – negative, suggestive, positive และ unsatisfactory smear “negative” หมายถึงไม่พบเซลล์มะเร็ง “positive” หมายถึงพบเซลล์มะเร็ง “suggestive” หมายถึง สงสัยว่าจะเป็นเซลล์มะเร็ง เป็นภาวะกำกวมที่สามารถเป็น negative หรือ positive ได้

ผลการศึกษา

(1) ผลการตรวจวินิจฉัย pleural effusion จากผู้ป่วยที่ตรวจระหว่างปีพ.ศ. 2540 ถึง พ.ศ. 2541 จำนวน 599 ราย ผลวินิจฉัยเป็น negative พบร้อยละ 70.9 ผล positive พบร้อยละ 25.3 และผลการวินิจฉัยเป็น suggestive พบร้อยละ 3.8 (ตารางที่ 1) การสำรวจการกระจายความถี่ตามอายุของผู้ป่วยที่ตรวจ pleural effusion โดยวิธีเซลล์วิทยาวินิจฉัยพบว่าผู้ป่วยที่รับการตรวจส่วนมากอยู่ในช่วงอายุ 51-71 ปี มีจำนวน 269 ราย ผลการวินิจฉัยที่เป็น positive ในเพศชายในช่วงอายุ 51-60 ปี พบร้อยละ 16.0 และ 61-70 ปี พบร้อยละ 24.7 ผู้ป่วยเพศหญิงที่ผลวินิจฉัยเป็น positive ในช่วงอายุ 51-60 ปี พบร้อยละ 40.0 และช่วงอายุ 61-70 ปี พบร้อยละ 40.8 ส่วนผลการวินิจฉัยเป็น suggestive ในผู้ป่วยเพศชายช่วงอายุ 61-70 ปี พบร้อยละ 2.2 (ตารางที่ 2) อายุเฉลี่ยของผู้ป่วยที่เข้ารับ การตรวจ pleural effusion เท่ากับ 53.1 ปี ทั้งเพศชายและเพศหญิงอายุเฉลี่ยของเพศชายที่ผลการวินิจฉัยเป็น positive เท่ากับ 60.5 ปี ในเพศหญิงเท่ากับ 54.8 ปี อายุเฉลี่ยของ เพศชายที่ผลการวินิจฉัยเป็น suggestive เท่ากับ 53.0 ปี ในเพศหญิงเท่ากับ 53.3 ปี (ตารางที่ 3)

(2) จำนวนผู้ป่วยที่ตรวจ ascites effusion โดยวิธีเซลล์วิทยาวินิจฉัยระหว่างปีพ.ศ. 2540 ถึง พ.ศ. 2541 มีจำนวน 357 ราย ผลวินิจฉัยแยกเป็น negative ร้อยละ 70.9 ผล positive ร้อยละ 24.6 และผลเป็น suggestive ร้อยละ 4.5 (ตารางที่ 4) จำนวนผู้ป่วยที่มีการตรวจมาจากอยู่ในช่วงอายุ 31-70 ปี มีจำนวน 269 ราย ผลการตรวจทางเซลล์วิทยาเป็น positive ในเพศชายช่วงอายุ 51-

60 ปี พบร้อยละ 20.8 และช่วงอายุ 61-70 ปี พบร้อยละ 13.3 ผู้ป่วยเพศหญิงผลเป็น positive ช่วงอายุ 51-60 ปี พบร้อยละ 40.7 และช่วงอายุ 61-70 ปี พบร้อยละ 39.7 (ตารางที่ 5) อายุเฉลี่ยของผู้ป่วยที่เข้า รับการตรวจ ascites effusion ในเพศชายเท่ากับ 52.7 ปี เพศหญิงเท่ากับ 50.1 ปี อายุเฉลี่ยของเพศชายที่ผลตรวจ เป็น positive เท่ากับ 57.7 เพศหญิงเท่ากับ 50.4 ปี อายุเฉลี่ยของเพศชายที่ผลการวินิจฉัยเป็น suggestive เท่ากับ 56.5 ปี ในเพศหญิงเท่ากับ 55.6 ปี (ตารางที่ 6)

(3) จากผู้ป่วยที่เข้ารับการตรวจ 956 ราย แยก effusion เป็นชนิด serous จำนวน 526 (55.0%) ราย เป็นชนิด serosanguinous จำนวน 430 (45.0%) ราย ผลการวินิจฉัย effusion ชนิด serous ผลเป็น positive พบร้อยละ 36 ผลเป็น suggestive พบร้อยละ 45 ผลการวินิจฉัย effusion ชนิด serosanguinous ผลเป็น positive พบร้อยละ 64 ผลเป็น suggestive พบร้อยละ 55 (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 1 ผลตรวจ pleural effusion ทางเซลล์วิทยาและการวินิจฉัย

ปี พ.ศ.	จำนวน (ราย)	Negative		Positive		Suggestive	
		ชาย	หญิง	ชาย	หญิง	ชาย	หญิง
2540	309	128	101	20	45	3	12
2541	290	126	70	30	56	2	6
รวม	599	254	171	50	101	5	18
%	100	42.4	28.5	8.4	16.9	0.8	3.0

ตารางที่ 2 การกระจายความถี่ตามอายุผู้ป่วยที่ตรวจ pleural effusion ทางเซลล์วิทยาการวินิจฉัย

		Negative		Positive		Suggestive	
อายุ (ปี)	จำนวน ราย	ชาย (%)	หญิง (%)	ชาย (%)	หญิง (%)	ชาย (%)	หญิง (%)
<10	11	8 (3.2)	2 (1.2)	-	-	-	-
11-20	19	9 (3.5)	7 (4.1)	-	2 (2.0)	1 (20.0)	-
21-30	31	14 (5.5)	12 (7.0)	-	4 (3.9)	-	1 (5.6)
31-40	73	36 (14.2)	22 (12.8)	2 (4.0)	9 (9.0)	-	4 (22.2)
41-50	98	41 (16.1)	27 (15.8)	7 (14.0)	22 (21.8)	-	1 (5.6)
51-60	104	41 (16.1)	27 (15.8)	8 (16.0)	22 (21.8)	1 (20.0)	6 (33.3)
61-70	165	65 (25.6)	40 (23.4)	22 (44.0)	31 (30.7)	2 (40.0)	5 (27.7)
71-80	53	24 (9.5)	11 (6.4)	9 (18.0)	7 (6.9)	1 (20.0)	1 (5.6)
>81	21	11 (4.3)	9 (5.3)	-	1 (1.0)	-	-
ไม่ทราบอายุ	24	5 (2.0)	14 (8.2)	2 (4.0)	3 (2.9)	-	-
รวม	599	254 (100)	171 (100)	50 (100)	101 (100)	5 (100)	18 (100)

ตารางที่ 3 อายุเฉลี่ยผู้ป่วยที่ตรวจ pleural effusion ทางเซลล์วิทยาวิจฉัย

ผลตรวจ	เพศ	จำนวน (ราย)	อายุเฉลี่ย (ปี)
Negative	ชาย	249	51.6 ± 18.9
	หญิง	157	52.1 ± 18.2
Positive	ชาย	48	60.5 ± 12.4
	หญิง	98	54.8 ± 15.8
Suggestive	ชาย	5	53.0 ± 21.1
	หญิง	18	53.3 ± 13.5
รวม	ชาย	302	53.1 ± 11.13
	หญิง	273	53.1 ± 15.83

ตารางที่ 4 ผลการตรวจ ascites effusion ทางเซลล์วิทยาและการวิจฉัย

ปี พ.ศ.	จำนวน (ราย)	Negative		Positive		Suggestive	
		ชาย	หญิง	ชาย	หญิง	ชาย	หญิง
2540	179	61	70	8	32	4	4
2541	178	51	71	5	43	3	5
รวม	357	112	141	13	75	7	9
%	100	31.4	39.5	3.6	21.0	2.0	2.5

ตารางที่ 5 การกระจายความถี่ตามอายุผู้ป่วยที่ตรวจ ascites effusion ทางเซลล์วิทยาวิจฉัย

อายุ (ปี)	จำนวน (ราย)	Negative		Positive		Suggestive	
		ชาย (%)	หญิง (%)	ชาย (%)	หญิง (%)	ชาย (%)	หญิง (%)
<10	2	1 (0.8)	1 (0.7)	-	-	-	-
11-20	10	3 (2.7)	6 (4.3)	-	-	-	1 (11.1)
21-30	24	4 (3.6)	13 (9.2)	-	7 (9.3)	-	-
31-40	54	17 (15.2)	22 (15.6)	3 (23.1)	11 (14.7)	1 (14.3)	-
41-50	71	28 (25.0)	24 (17.0)	1 (7.7)	13 (17.3)	3 (42.8)	2 (22.2)
51-60	51	18 (16.1)	15 (10.6)	5 (38.4)	11 (14.7)	1 (14.3)	1 (11.1)
61-70	93	25 (22.3)	34 (24.1)	4 (30.8)	25 (33.3)	1 (14.3)	4 (44.5)
71-80	26	7 (6.3)	13 (9.2)	-	5 (6.7)	-	1 (11.1)
>81	8	2 (1.8)	5 (3.6)	-	-	1 (14.3)	-
ไม่ทราบอายุ	18	7 (6.3)	8 (5.7)	-	3 (4.0)	-	-
รวม	357	112 (100)	141 (100)	13 (100)	75 (100)	7 (100)	9 (100)

ตารางที่ 6 อายุเฉลี่ยผู้ป่วยที่ตรวจ ascites effusion ทางเซลล์วิทยาวินิจฉัย

ผลตรวจ	เพศ	จำนวน (ราย)	อายุเฉลี่ย (ปี)
Negative	ชาย	106	51.7 ± 15.9
	หญิง	134	49.5 ± 18.3
Positive	ชาย	15	57.7 ± 11.9
	หญิง	70	50.4 ± 14.5
Suggestive	ชาย	8	56.5 ± 13.5
	หญิง	9	55.6 ± 18.5
รวม	ชาย	129	52.7 ± 13.8
	หญิง	213	50.1 ± 17.3

ตารางที่ 7 จำนวนและอัตราร้อยละของ pleural และ ascites effusion ที่แยกเป็น serous และ serosanguinous

ชนิด Effusion	จำนวน Effusion (%)	ผลการตรวจทางเซลล์วิทยา		
		Negative (%)	Positive (%)	Suggestive (%)
Serous	526 (55.0)	423 (62.4)	86 (36.0)	17 (45.0)
Serosanguinous	430 (45.0)	255 (37.6)	153 (64.0)	22 (55.0)
รวม	956 (100)	678 (100)	239 (100)	39 (100)

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบผลการวิจัยครั้งนี้กับของผู้อื่น

ผลการวิจัย	ครั้งนี้	Walter et al. ⁽¹⁰⁾	Sear ⁽¹⁶⁾	Johnson ⁽¹⁷⁾	Cardozo ⁽¹⁸⁾	Johnson ⁽¹⁹⁾
1. อุบัติการณ์ของเซลล์มะเร็งใน pleural effusion	151 ราย (25.2%)	-	812 ราย (44%)	-	727 ราย (29%)	584 ราย (9%)
2. อุบัติการณ์ของเซลล์มะเร็งใน ascites effusion	88 ราย (24.6%)	-	423 ราย (36%)	-	226 ราย (52%)	-
3. อุบัติการณ์ของเซลล์มะเร็งใน pleural และ ascites effusion	239 ราย (25.6%)	-	1,235 ราย (41%)	302 ราย (26%)	-	-
4. อายุเฉลี่ยผู้ป่วยที่พบเซลล์มะเร็งใน pleural effusion	57.7 ปี	-	56 ปี	-	-	-

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบผลการวิจัยครั้งนี้กับของผู้อื่น (ต่อ)

ผลการวิจัย	ครั้งนี้	Walter et al. ⁽¹⁰⁾	Sear ⁽¹⁶⁾	Johnson ⁽¹⁷⁾	Cardozo ⁽¹⁸⁾	Johnson ⁽¹⁹⁾
5. อายุเฉลี่ยผู้ป่วยที่พบเซลล์มะเร็งใน ascites effusion	54.1 ปี	-	55 ปี	-	-	-
6. อุบัติการณ์ของเซลล์มะเร็งใน serous effusion	86 ราย (36%)	27 ราย (29%)	-	-	-	-
7. อุบัติการณ์ของเซลล์มะเร็งใน serosanguinous effusion	153 ราย (64%)	66 ราย (71%)	-	-	-	-

วิจารณ์ผล

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้ป่วยที่ได้รับการตรวจ pleural และ ascites effusion โดยวิธีทางเซลล์วิทยาวิจักษ์มีจำนวน 956 ราย เป็นผู้ป่วยที่ตรวจ pleural 599 (62.7%) ราย เป็นผู้ป่วยที่ตรวจ ascites effusion 357 (37.7%) ราย เห็นได้ว่าจำนวนผู้ป่วยที่ตรวจ effusion ทั้ง 2 ชนิดมีจำนวนแตกต่างกันคล้ายกับที่รายงานโดย Sears⁽¹⁶⁾ ว่า สิ่งส่งตรวจที่เป็น pleural effusions มีจำนวน 1,846 (61%) ราย ส่วน ascites effusion มีจำนวน 1,165 (39%) ราย ทำให้ pleural effusions มีจำนวนมากในการตรวจ effusion การตรวจ ascites effusion มีผู้ป่วยเพศชายจำนวน 132 (37.0%) ราย เพศหญิงจำนวน 225 (63.0%) ราย จะเห็นว่ามีเพศหญิงรับการตรวจมากกว่าเพราะว่าเพศหญิงมีโรคทางสูติศาสตร์และ นรีเวชวิทยาเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย และอีกประการหนึ่งคือในช่องท้องมีการกระจายเซลล์มะเร็งจากอวัยวะต่างๆ ที่ใกล้เคียงหลุดอยู่ใน ascites effusion ได้ง่ายและกระจายได้ดี⁽¹³⁾

จะเห็นได้ว่าผลการตรวจเซลล์มะเร็งใน effusion ชนิด serosanguinous ของการวิจัยครั้งนี้และของ Walter et al.⁽¹⁰⁾ พบสูงถึง 63% และ 71% ตามลำดับ ดูเหมือนว่าลักษณะของ effusion ชนิด serosanguinous น่าจะมีความสัมพันธ์กับการตรวจพบเซลล์มะเร็ง การตรวจเซลล์

มะเร็งใน pleural และ ascites effusion โดยวิธีเซลล์วิทยาวิจักษ์ ไม่ว่าจะมีการตรวจ ณ ที่ใด การตรวจเซลล์วิทยาวิจักษ์จะพบเซลล์มะเร็งเสมอ ดังนั้นการตรวจเซลล์มะเร็งโดยวิธีเซลล์วิทยาวิจักษ์จึงมีประโยชน์ต่อผู้ป่วยมาก ในด้านการป้องกันและรักษาโรคมะเร็ง^(13,14)

เซลล์มะเร็งที่พบใน pleural และ ascites effusion ส่วนมากจะพบเซลล์มะเร็งที่แพร่กระจายมาจากอวัยวะอื่น^(13,14) เช่น เต้านม รังไข่ ตับอ่อน กระเพาะอาหาร เป็นต้น เมื่อเปรียบเทียบอายุเฉลี่ยของผู้ป่วยที่ตรวจพบเซลล์มะเร็งใน pleural และ ascites effusion ในการวิจัยครั้งนี้กับของ Sears⁽¹⁶⁾ พบว่ามีอายุเฉลี่ยใกล้เคียงกัน คือมีอายุเฉลี่ยมากกว่า 50 ปีขึ้นไป ซึ่งให้เห็นว่าผู้ป่วยมิได้เข้ารับการตรวจรักษาในระยะเริ่มแรกของการเป็นมะเร็ง เช่น มะเร็งเต้านม ผู้ป่วยเพศหญิงที่มีปัญหาเต้านม มีการอักเสบเรื้อรัง มีแผลหรือก้อนที่เต้านมมานาน แต่มิได้รับการตรวจรักษาแต่เริ่มแรก ต่อมา มีน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด ผลการตรวจเซลล์วิทยาวิจักษ์พบเซลล์มะเร็งใน pleural effusion จึงเป็นการยากที่จะรักษาให้หายได้เพราะเซลล์มะเร็งได้แพร่กระจายไปแล้ว

รัฐบาลไทยควรมีนโยบายให้กระทรวงและสถาบันต่างๆ ทั้งภาครัฐและเอกชนที่เกี่ยวข้องกับงานสาธารณสุข ออกให้ความรู้แก่ประชาชน และควรมาตรวจสุขภาพเพื่อ

ค้นหาความผิดปกติของร่างกายอย่างน้อยปีละ 2 ครั้ง เพื่อเป็นแนวทางป้องกันการเกิดโรคและได้รับการรักษา ที่ถูกต้องตั้งแต่ระยะเริ่มแรก

สรุปผล

อายุเฉลี่ยที่เกิดเป็นมะเร็งในน้ำช่องเยื่อหุ้มปอด และช่องท้องในเพศชายคือ 60.5 และ 57.7 ปีและ 54.8 และ 50.4 ปีในเพศหญิง ตามลำดับ และ serosanguinous effusion มีความสัมพันธ์กับการพบเซลล์มะเร็ง

ดัชนี : การแยกชนิดเซลล์มะเร็ง⁽¹²⁻¹⁵⁾

1. เซลล์ที่เป็นมะเร็งหรือเซลล์ปกติ ให้ดูลักษณะ โครงสร้างของนิวเคลียส (nuclear structure)
2. ชนิดของเซลล์มะเร็งหรือเซลล์ปกติ ให้ดูที่ ไซโทพลาสซึมของเซลล์
3. การดูนิวเคลียสให้ดูการจัดเรียงตัวของ โครมาตินว่าอนุภาคของโครมาตินมีความเท่าๆ กันหรือไม่ นิวเคลียสถ้าแบ่งเป็น 2 ส่วนตามเส้นผ่าศูนย์กลาง จะมีส่วนเท่ากันหรือไม่ ถ้าได้คำตอบว่า ใช่ (yes,) แสดงว่าเซลล์นั้นมีนิวเคลียสปกติแต่ถ้าได้คำตอบว่า “ไม่ใช่” (no,) ต้องพิจารณาในข้อต่อไป
4. เมื่อคำตอบบอกมาว่า “ไม่ใช่ (no,)” ต้อง พิจารณาละเอียดว่าโครมาตินมีการผันแปรตามขนาด ดูโครมาตินที่กระจัดกระจายอย่างไม่เป็นระเบียบ มีช่องว่างในนิวเคลียส และมีโครมาตินเกาะตามขอบ นิวเคลียสขรุขระ เมื่อแบ่งนิวเคลียสออกเป็น 2 ส่วน ตามเส้นผ่าศูนย์กลางของนิวเคลียสก็ได้ส่วนไม่เท่ากัน ถ้าได้ข้อมูลเช่นนี้แล้วจึงแน่ใจว่าเซลล์เหล่านั้นมีนิวเคลียส เป็นมะเร็ง
5. การดูชนิดเซลล์มะเร็ง คำถามแรกที่เราจะต้อง คำนึงถึง คือ ตำแหน่งของนิวเคลียสวางอยู่ตรงส่วนไหน ของเซลล์ ถ้าอยู่ตรงกลางมีไซโทพลาสซึมล้อมรอบ ทุกด้านน่าจะเป็นเซลล์ชนิด squamous ถ้าตำแหน่งของ นิวเคลียสอยู่ด้านข้างใดด้านหนึ่ง น่าจะเป็นเซลล์ชนิด columnar เป็นต้น
6. เมื่อพิจารณาลักษณะนิวเคลียสและ ไซโทพลาสซึมได้แล้วว่าเป็นเซลล์มะเร็งหรือไม่ก็ทำให้เรา สามารถแยกชนิดเซลล์ได้เช่น- ถ้าเป็นเซลล์ squamous

และมีนิวเคลียสเป็นมะเร็ง ชนิดของมะเร็งก็เป็น squamous cell carcinoma ถ้าเป็นเซลล์ columnar และนิวเคลียสเป็นมะเร็ง ชนิดของมะเร็งก็เป็น adenocarcinoma ถ้าเป็นเซลล์รวมระหว่าง squamous และ columnar และนิวเคลียสเป็นมะเร็ง ชนิดของมะเร็งก็เป็น adenoacanthoma เป็นต้น

7. ถ้าไซโทพลาสซึมของเซลล์หายไปหรือ มีน้อยจนไม่สามารถบอกชนิดของเซลล์มะเร็งได้ โดยที่มีนิวเคลียสเป็นลักษณะมะเร็ง เรียกเซลล์มะเร็ง เหล่านี้ว่า “undifferentiated malignant cell”

เอกสารอ้างอิง

1. Lucke A, Klebs E. Beitrag Zurovariometrie und zur kenntnis der abdominal-geschwulste. Virchows Arch (Pathol Anat) 1867; 41: 1-14.
2. Bahrenberg LDH. On the diagnostic results of the microscopical examination of the ascitic fluid in two cases of carcinoma involving the peritoneum. Cleve Med Gas 1895; 11: 274.
3. Mandelbaum FS. The diagnosis of malignant tumors by paraffin sections of centrifuged exudates. J Lab Clin Med 1917; 2: 580.
4. Papanicolaou GN. A new pracedure for staining vaginal smears. Science 1942; 95: 438-9.
5. Foot NC. Identification of neoplastic cells in serous effusions. Am J Pathol 1956; 32: 961-77.
6. Saphir O. Cytologic diagnosis of cancer from pleural and peritoneal fluids. Acta Cytol 1949; 19: 309-14.
7. Del Vecchio PR, DeWit SH, Borelli JK, Ward JB, Wood TA, Malgrem RA. Application of Millipore filtration technique to cytological material. Acta Cytol 1959; 22: 427-31.
8. Grunze H. The comparative diagnostic accuracy, efficiency, and specificity of cytologic techniques used in the diagnosis of malignant neoplasm in

- serous effusions of the pleural and peritoneal cavities. *Acta Cytol* 1964; 8: 150-63.
9. ธานีรินทร์ การพัฒนาศิริกุล. วิธีการทางห้องปฏิบัติการเซลล์วิทยาและจุลกายวิภาคศาสตร์. เชียงใหม่: คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2538.
 10. Water L, Mark E, Sharon E. Malignancy-associated serosanguinous pleural effusions. *Acta Cytol* 1984; 28: 46-50.
 11. ธานีรินทร์ การพัฒนาศิริกุล. เอกสารคำสอนพยาธิวิทยา 303. เชียงใหม่: หน่วยวารสารวิชาการ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2538: 15-21.
 12. Graham M. The cytologic diagnosis of cancer. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders; 1972.
 13. Riotton G, Christopherson WM. Cytology of non-gynecological sites. Geneva: Word Health Organization; 1977.
 14. สรรพ์ศรี เปียจุฬ. เซลล์วิทยาคลินิกของอวัยวะสืบพันธุ์สตรี. กรุงเทพมหานคร: บริษัทอมรินทร์พริ้นติ้งกรุ๊ป จำกัด; 2532.
 15. Naib AM. Exfoliative cytopathology. 3rd ed. Boston: Little Brown; 1985.
 16. Donald S, Steven I. The cytologic diagnosis of malignant neoplasms in pleural and peritoneal effusions. *Acta Cytol* 1987; 31: 85-97.
 17. Johnson WD. The cytologic diagnosis of cancer in serous effusion. *Acta Cytol* 1966; 10: 161-72.
 18. Cardozo PL. A critical evaluation of 3,000 cytologic analyses of pleural fluid, ascitic fluid, and peritoneal fluid. *Acta Cytol* 1966; 10: 455-60.
 19. Johnston WW. The malignant pleural effusion. A review of cytopathologic diagnoses of 584 specimens from 472 consecutive patients. *Cancer* 1985; 56: 905-9.

นิพนธ์ต้นฉบับ

การเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ระดับ Alpha-fetoprotein (AFP) ในซีรัมด้วยวิธี Microparticle Enzyme Immunoassay (MEIA) และวิธี Electrochemiluminescence Immunoassay (ECLIA)

อารีย์ ประสิทธิ์พยงค์*, ผ่องพรรณ ร่มหิรัญ*, สมมาตรย์ จันทร*

บทคัดย่อ

ในการศึกษานี้คณะผู้วิจัยได้ศึกษาเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ระดับ Alpha fetoprotein (AFP) ระหว่างวิธี Microparticle Enzyme Immunoassay (MEIA) และวิธี Electrochemiluminescence Immunoassay (ECLIA) ในซีรัมของผู้มารับบริการที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ จำนวน 300 ราย ซึ่งผลการศึกษาที่ได้พบว่าระดับ AFP ที่ตรวจวิเคราะห์ได้จากทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยการทดสอบด้วย paired t-test ($p>0.05$) และเมื่อทำการทดสอบโดยใช้สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) มีค่า r เท่ากับ 0.996 ซึ่งแสดงถึงความสัมพันธ์ที่ดีระหว่างการตรวจวิเคราะห์ทั้งสองวิธี ดังนั้นจึงสามารถนำวิธี MEIA และวิธี ECLIA มาใช้แทนกันในการตรวจวิเคราะห์ระดับ AFP ในห้องปฏิบัติการได้ วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2549; 39: 19-26.

คำรหัส: Alpha-fetoprotein (AFP), Microparticle Enzyme Immunoassay (MEIA), Electrochemiluminescence Immunoassay (ECLIA)

* งานอิมมูโนวิทยา กลุ่มงานพยาธิวิทยา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรุงเทพฯ

Abstract : Comparison in Determination of Alpha-fetoprotein by Microparticle Enzyme Immunoassay (MEIA) and Electrochemiluminescence Immunoassay (ECLIA)

Aree Prasitthipayong*, Phongphan Romhirun *, Sommart Jantorn*

In this study we compared serum level of alpha-fetoprotein (AFP) determined by Microparticle Enzyme Immunoassay (MEIA) and Electrochemiluminescence Immunoassay (ECLIA) in 300 serum samples obtained from routine check up and other clinics at the National Cancer Institute, Bangkok. Our findings showed no statistically significant difference between these two methods ($p > 0.05$, $r = 0.996$). Therefore, either MEIA or ECLIA could be used for determination of serum AFP level in routine laboratory since they provided similar results. Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2006; 39: 19-26.

Key words : Alpha-fetoprotein (AFP), Microparticle Enzyme Immunoassay (MEIA), Electrochemiluminescence Immunoassay (ECLIA)

*Immunology Section, Pathology Department, National Cancer Institute, Bangkok

บทนำ

Alpha-fetoprotein (AFP) เป็น glycoprotein มีน้ำหนักโมเลกุล 7,000 daltons ค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ.1956 โดย Bergstrand และ Czar สร้างจาก Yolk sac ตับ และทางเดินอาหารของทารกตั้งแต่อายุครรภ์ 4 สัปดาห์ ระดับของ AFP จะเพิ่มสูงสุดระหว่างสัปดาห์ที่ 12 และ 16 แล้วค่อยๆ ลดลงจนถึงคลอด หลังคลอดระดับ AFP จะลดลงอย่างรวดเร็วจนทารกอายุ 1 ปีระดับของ AFP ในซีรัมทารกจึงเท่ากับผู้ใหญ่^{1,2,3}

AFP เป็นสารบ่งชี้มะเร็ง (Tumor marker) ที่สำคัญ และมีประโยชน์มากที่สุดในการตรวจวินิจฉัยมะเร็งของ เซลล์ตับ (Hepatocellular carcinoma, HCC) ซึ่งเป็น มะเร็งที่พบเป็นลำดับต้นๆ โดยเฉพาะในประเทศแถบ

เอเชีย ซึ่งพบผู้ป่วยตับอักเสบเรื้อรังจำนวนสูงกว่าและมี อายุเฉลี่ยที่พบเป็นมะเร็งตับน้อยกว่าประเทศสหรัฐอเมริกาและประเทศแถบยุโรป^{4,5} ตลอดจนเป็นสาเหตุ การตายที่พบมากเป็นอันดับหนึ่งในบรรดาผู้ป่วยมะเร็ง ทุกชนิด จากรายงานการศึกษาพบว่า 80% ของผู้ป่วย มะเร็งของเซลล์ตับมีระดับ AFP สูงกว่าในคนปกติ⁶

AFP นอกจากจะใช้ประโยชน์ในการวินิจฉัยมะเร็ง ของเซลล์ตับแล้ว ยังใช้ในการตรวจกรองมะเร็งของเซลล์ ตับในประชากรกลุ่มเสี่ยงด้วย ซึ่งได้แก่ผู้ป่วยตับอักเสบ เฉียบพลัน ตับอักเสบเรื้อรัง ไวรัสตับอักเสบบี ไวรัส ตับอักเสบบี ตับแข็ง ผู้ที่เป็นพาหะของไวรัสตับอักเสบบี เป็นต้น โดยในผู้ป่วยกลุ่มนี้ระดับ AFP ในซีรัมอาจสูงกว่า ค่าปกติได้แต่จะไม่สูงกว่า 100 ng/ml⁷ และระดับ AFP

ยังสามารถใช้ร่วมกับระดับ human chorionic gonadotropin (hCG) ในการวินิจฉัย germ cell tumors ได้ด้วย^{๑๘}

ปัจจุบันการตรวจวิเคราะห์ระดับ AFP ในซีรัมสามารถทำได้หลายวิธี เช่น วิธี radioimmunoassay (RIA), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นต้น สำหรับการศึกษาค้างนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการศึกษเปรียบเทียบวิธีการตรวจวิเคราะห์ระดับ AFP ในซีรัมโดยวิธี Microparticle Enzyme Immunoassay (MEIA) และวิธี Electrochemiluminescence Immunoassay (ECLIA)

วัสดุและวิธีการ

กลุ่มตัวอย่าง

ซีรัมได้จากผู้ที่มารับบริการตรวจสุขภาพประจำปี ที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติจำนวน 140 ราย และจากผู้ป่วยคลินิกอื่นๆ เช่น คลินิกโรคตับ คลินิกระบบส่งต่อ ผู้ป่วยรังสีเคมีบำบัด ฯลฯ ที่มารับบริการตรวจทางห้องปฏิบัติการอิมมูโนวิทยาของสถาบันมะเร็งแห่งชาติอีกจำนวน 160 ราย ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2547 จนถึงเดือนกุมภาพันธ์ 2548 รวมจำนวนทั้งหมด 300 ราย

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมซีรัมควบคุม

วิธี MEIA (เครื่อง AxSYM, Abbott Laboratories, สหรัฐอเมริกา) : ซีรัมควบคุมอยู่ในรูปสารละลาย สามารถนำมาใช้ได้เลย

วิธี ECLIA (เครื่อง Elecsys2010, Roche Diagnostics, เยอรมนี) : ละลายซีรัมควบคุมด้วยน้ำกลั่นตามปริมาตรที่กำหนด ตั้งทิ้งไว้ให้ละลาย แบ่งใส่ cup แล้วเก็บที่ -30°C

2. การเก็บตัวอย่างและการเปรียบเทียบการตรวจวิเคราะห์ระดับ AFP ด้วยวิธี MEIA และวิธี ECLIA

เก็บซีรัมของผู้มาตรวจสุขภาพประจำปีและผู้ป่วยคลินิกอื่นๆ ที่มารับการตรวจทางห้องปฏิบัติการอิมมูโนวิทยา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ โดยแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งนำไปตรวจหาระดับ AFP ด้วยวิธี MEIA และอีกส่วนหนึ่งนำไปตรวจหาระดับ AFP ด้วยวิธี ECLIA

โดยใช้เครื่อง AxSYM และ Elecsys 2010 ตามลำดับ

ตรวจหาระดับ AFP โดยทำตามขั้นตอนรายละเอียดที่ระบุไว้ในคู่มือของบริษัท

3. การคำนวณผลการตรวจ

เครื่องตรวจวิเคราะห์จะคำนวณค่า AFP ให้อัตโนมัติโดยที่เครื่อง AxSYM มี measuring range และ analytical sensitivity (lower detection limit) เท่ากับ 0.4-350 ng/ml และ 0.40 ng/ml ตามลำดับ และเครื่อง Elecsys 2010 เท่ากับ 0.605-1210 ng/ml และ 0.61 ng/ml ตามลำดับ

4. การทดสอบความแม่นยำ (precision)

การทดสอบความแม่นยำทำตามข้อกำหนดของ European Committee for Clinical Laboratory Standards (ECCLS)^{๑๙} ดังนี้

ก. การทดสอบ within-run precision

วิธี MEIA: ทำการตรวจวัดระดับ AFP ใน control low concentration และ high concentration จำนวน 21 ตัวอย่างภายใน 1 วัน คำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) และสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation, CV)

วิธี ECLIA: ทำการตรวจวัดระดับ AFP ใน PreciControl TM1 และ PreciControl TM2 จำนวน 21 ตัวอย่างภายใน 1 วัน คำนวณหาค่าเฉลี่ย, ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน

ข. การทดสอบ between-run precision

วิธี MEIA: ทำการตรวจวัดระดับ AFP ใน control low concentration และ high concentration วันละ 1 ตัวอย่างจำนวน 21 วัน คำนวณหาค่าเฉลี่ย, ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน

วิธี ECLIA: ทำการตรวจวัดระดับ AFP ใน PreciControl TM1 และ PreciControl TM2 วันละ 1 ตัวอย่างจำนวน 21 วัน คำนวณหาค่าเฉลี่ย, ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน

หลักการทดสอบ

วิธี MEIA: ใช้หลักการ enzyme immunoassay โดยมีขั้นตอนการทำปฏิกิริยาตามเอกสารที่แนบมากับน้ำยาของบริษัท

วิธี ECLIA: ใช้หลักการ sandwich immunoassay โดยมีขั้นตอนการทำปฏิกิริยาตามเอกสารที่แนบมากับน้ำยาของบริษัท

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ใช้โปรแกรม Excel 2003 ในการบันทึกผลการทดสอบและคำนวณข้อมูลทางสถิติ ได้แก่ ค่าเฉลี่ย, ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน, สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r), สมการถดถอยเชิงเส้นตรง และ paired t-test

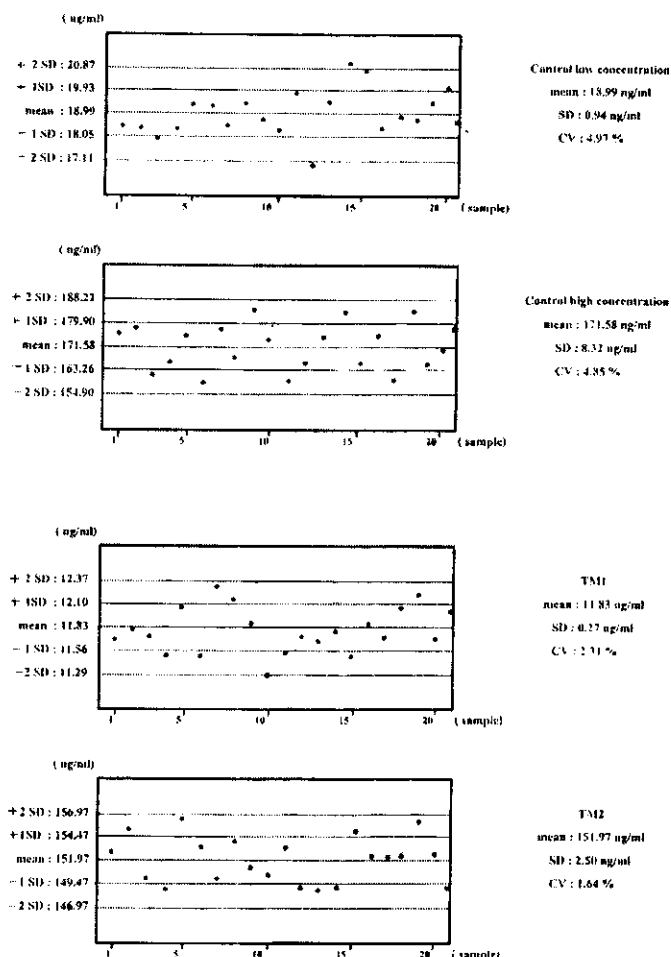
ผลการศึกษา

1. การทดสอบความแม่นยำ

ก. ผลการทดสอบ within-run precision

ผลการตรวจหาระดับ AFP ใน control low concentration มีค่าเฉลี่ย 18.99 ng/ml, ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.94 ng/ml สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน 4.97% และใน control high concentration มีค่าเฉลี่ย 171.58 ng/ml ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 8.32 ng/ml สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน 4.85% (รูปที่ 1)

ผลการตรวจหาระดับ AFP ใน TM1 พบว่ามีค่าเฉลี่ย 11.83 ng/ml ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.27 ng/ml สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน 2.31% และ TM2 มีค่าเฉลี่ย 151.97 ng/ml ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 2.50 ng/ml สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน 1.64 % (รูปที่ 1)



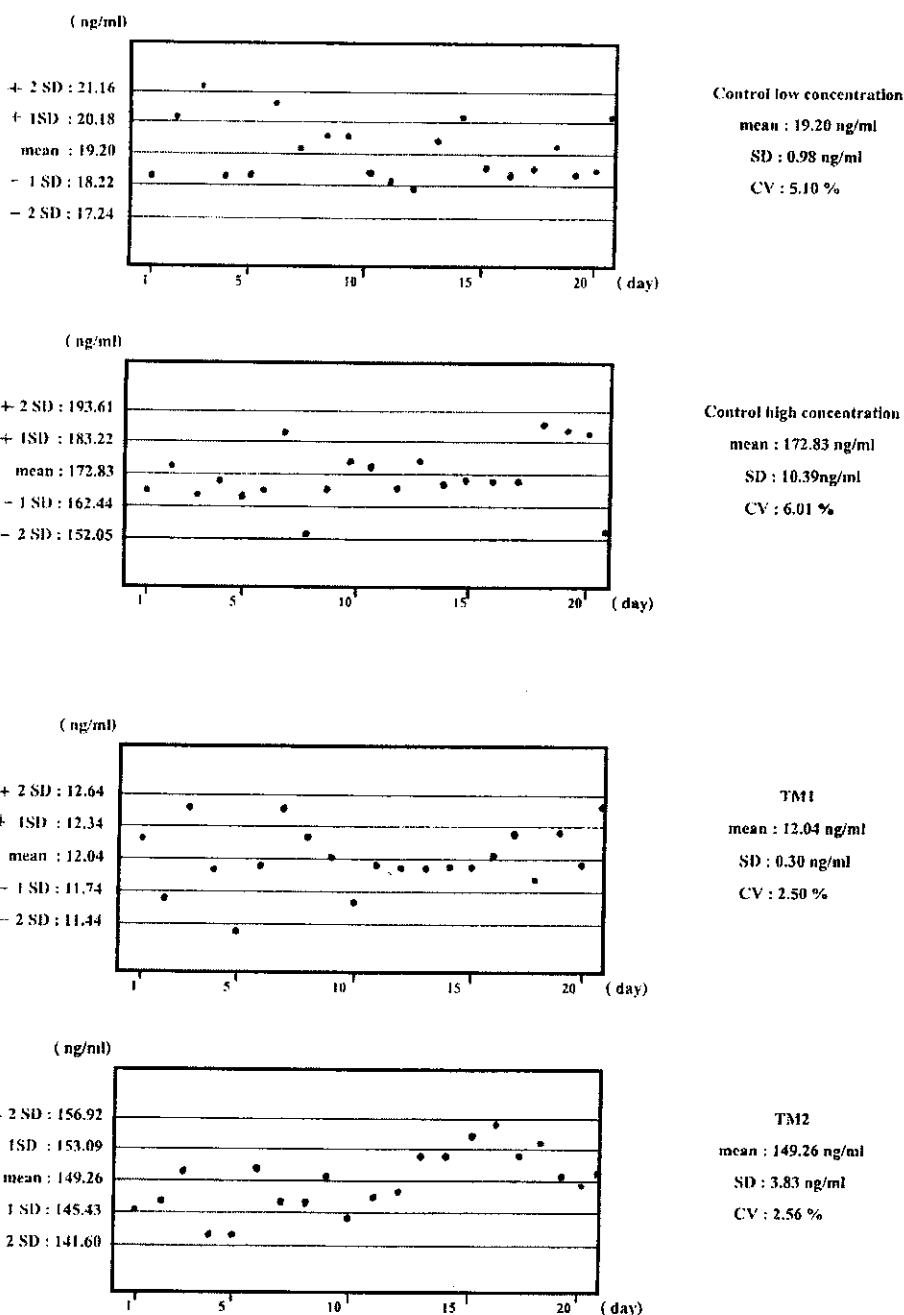
รูปที่ 1 ผลการทดสอบ within-run precision ของเครื่อง AxSYM และ Elecsys 2010

ข. ผลการทดสอบ between-run precision

ผลการตรวจหาระดับ AFP ใน control low concentration มีค่าเฉลี่ย 19.20 ng/ml ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.98 ng/ml, สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน 5.10% และใน control high concentration มีค่าเฉลี่ย 172.83 ng/ml ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 10.39 ng/ml, สัมประสิทธิ์ความ

แปรปรวน 6.01% (รูปที่ 2)

ผลการตรวจหาระดับ AFP ใน TM1 มีค่าเฉลี่ย 12.04 ng/ml ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.30 ng/ml สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน 2.50% และ TM2 มีค่าเฉลี่ย 149.26 ng/ml, ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 3.83 ng/ml สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน 2.56 % (รูปที่ 2)

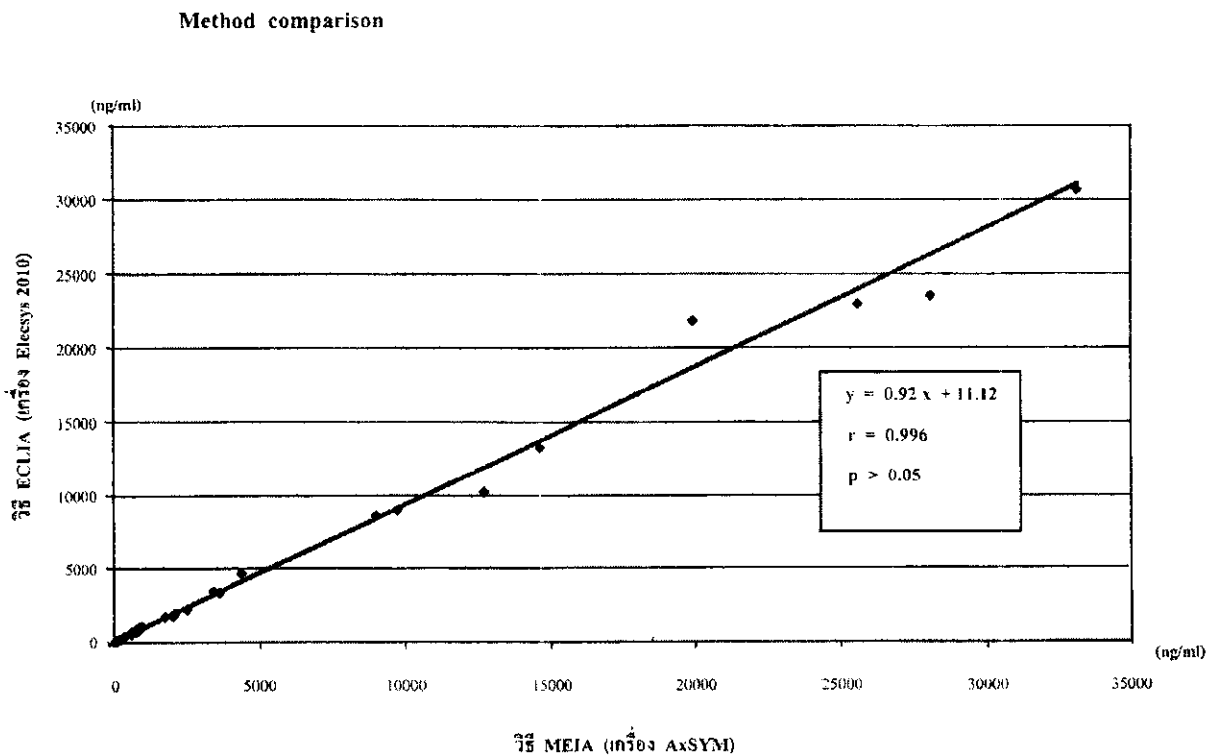


รูปที่ 2 ผลการทดสอบ between-run precision ของเครื่อง AxSYM และ Elecsys 2010

2. การเปรียบเทียบระดับ AFP ที่ตรวจวิเคราะห์ได้จากวิธี MEIA และวิธี ECLIA

จากการศึกษาเปรียบเทียบผลการตรวจหาระดับ AFP ด้วยวิธี MEIA โดยใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ AxSYM และ วิธี ECLIA โดยใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Elecsys 2010 จากตัวอย่างเลือดทั้งหมดจำนวน 300 ราย พบว่าวิธี MEIA ให้ผลการตรวจ AFP อยู่ระหว่าง 1.07-33135.31 ng/ml และค่าเฉลี่ย 638.90 ng/ml ส่วนวิธี

ECLIA พบค่าอยู่ระหว่าง 0.69-30670.00 ng/ml และค่าเฉลี่ย 596.08 ng/ml เมื่อทดสอบด้วย paired t-test พบว่าระดับ AFP ที่ตรวจได้จากทั้งสองวิธีนี้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.87$) และเมื่อนำมาทดสอบโดยใช้สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์พบว่ามีค่า $r = 0.996$ และสมการถดถอยเชิงเส้นตรงคือ $y = 0.92x + 11.12$ (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 การศึกษาเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ระดับ AFP ด้วยวิธี MEIA และวิธี ECLIA โดยการใช้สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r)

วิจารณ์และสรุป

ผลการทดสอบทางสถิติด้วย paired t-test ของวิธี MEIA และ ECLIA พบว่าระดับ AFP ทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) โดยมีสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.996 และสมการถดถอยเชิงเส้นตรงคือ $y = 0.92x + 11.12$ ซึ่งแสดงถึงความสัมพันธ์ที่ดีระหว่างการตรวจวิเคราะห์ทั้งสองวิธี

ดังนั้นจึงสามารถนำวิธี MEIA และวิธี ECLIA มาใช้แทนกันได้ในการตรวจวิเคราะห์ระดับ AFP ในห้องปฏิบัติการ ปัจจุบันการตรวจหา AFP ในเลือดสามารถทำได้หลายวิธี ห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งสามารถเลือกใช้ได้ตามความเหมาะสมของห้องปฏิบัติการนั้นๆ โดยมีปัจจัยอื่นๆ หลายประการในการประกอบการตัดสินใจซึ่งได้แก่วิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์ ไมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ใช้ใน

การทำปฏิกิริยา ความไว ความถูกต้อง ความแม่นยำของการตรวจวิเคราะห์ ช่วงการตรวจวิเคราะห์ที่เครื่องสามารถตรวจวัดได้ตลอดจนข้อจำกัดอื่นๆ ในการตรวจวิเคราะห์ รวมถึงค่าใช้จ่ายต่างๆ ในการทดสอบซึ่งได้แก่ค่าน้ำยา และอุปกรณ์ประกอบอื่นๆ

เป็นที่ทราบกันดีว่าประโยชน์ของ AFP ตลอดจนสารบ่งชี้มะเร็ง (tumor markers) ชนิดอื่นๆ ที่สำคัญที่สุดคือการใช้ประเมินและติดตามผลการรักษาผู้ป่วยของแพทย์ ดังนั้นจึงควรใช้วิธีเดียวกันในการติดตามผลการรักษาผู้ป่วยเนื่องจากแต่ละวิธีมีความแตกต่างกันตามปัจจัยต่างๆ ที่ได้กล่าวมาข้างต้น และหากห้องปฏิบัติการใดต้องการเปลี่ยนวิธีการตรวจหรือเครื่องมือในการตรวจวิเคราะห์ ควรแจ้งให้แพทย์ทราบและรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ของทั้งสองวิธีเพื่อให้แพทย์ใช้เปรียบเทียบกับวิธีการเดิมในการประเมินผลและติดตามผลการรักษาผู้ป่วยครั้งต่อไป นอกจากนี้การที่จะใช้สารบ่งชี้มะเร็งใดก็ตามให้เกิดประโยชน์สูงสุด แพทย์จะต้องคำนึงถึงสภาวะของผู้ป่วยด้วย เช่น ผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยาที่เตรียมจาก mouse monoclonal antibodies ซึ่งอาจทำให้ในเลือดของผู้ป่วยมี human anti-mouse antibodies (HAMA) และรบกวนต่อการตรวจวิเคราะห์ AFP ได้^{10,11} ตลอดจนเวลาในการตรวจติดตามครั้งต่อไปก็เป็นสิ่งสำคัญที่จะต้องคำนึงถึง ตัวอย่างเช่น ระดับ CEA ซึ่งใช้ในการติดตามการรักษา มะเร็งลำไส้ใหญ่จะลดลงสู่ระดับปกติหลังจากผู้ป่วยผ่าตัดแล้วประมาณ 1-2 เดือนถ้าการผ่าตัดได้ผล แต่จะคงอยู่ระดับเดิมหรือสูงขึ้นหากการผ่าตัดไม่ได้ผล^{1,7}

อย่างไรก็ตามพึงตระหนักเสมอว่ายังไม่มีสารบ่งชี้มะเร็งใดที่มีความจำเพาะ 100% คือตรวจไม่พบในคนสุขภาพปกติหรือในโรคที่ไม่ใช่โรคมะเร็งและความไว 100% คือตรวจพบได้เสมอแม้ในระยะเริ่มต้นของมะเร็ง ดังนั้นการเลือกตรวจสารบ่งชี้มะเร็งที่เหมาะสมและการแปลผลอย่างระมัดระวังประกอบกับอาการทางคลินิกอื่นๆ ของผู้ป่วยจะมีประโยชน์ต่อแพทย์มาก ปัจจุบันการศึกษาวิจัยทางด้านสารบ่งชี้มะเร็งมุ่งเน้นไปในระดับยีนและพันธุกรรม (gene markers) มากขึ้น ซึ่งเป็นที่คาดหวังว่าในอนาคตอันใกล้จะมีสารบ่งชี้มะเร็งที่มีความจำเพาะและความไวมากขึ้นกว่าที่มีอยู่ในปัจจุบัน ดังนั้นในฐานะของนักเทคนิคการแพทย์ซึ่งมีหน้าที่รับผิดชอบในด้านการ

ตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการจะต้องพร้อมรับวิทยาการใหม่ๆ ในด้านการตรวจวิเคราะห์และชั้นสูตรตลอดจนหมั่นศึกษาหาความรู้ทางวิชาการและเทคโนโลยีใหม่ๆ ด้านการแพทย์เพิ่มเติมอย่างสม่ำเสมอเพื่อประโยชน์สูงสุดของผู้ป่วย

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

ขอขอบคุณ ดร.สุนันทา จริยาเลิศศักดิ์ หัวหน้ากลุ่มงานวิจัย กลุ่มภารกิจวิชาการ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ที่ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Cancer facts. "Tumor markers". (online). Available <http://cis.nci.nih.gov/> (27 April 1998).
2. บริษัท โรช ไดแอกโนสติกส์ (ประเทศไทย) จำกัด. การเลือกตรวจ Tumor markers อย่างเหมาะสม
3. Waldman TA, McIntire KR. The Use of Radioimmunoassay for Alpha-Fetoprotein in the Diagnosis of Malignancy. *Cancer* 1974; 34: 1510-515.
4. Stuart C, Anand AJ, Jenkins RL. Hepatocellular Carcinoma in the United States. *Cancer* 1996; 77, 11:1151-159.
5. Trape Jaume, Botargues JM, Porta F, *et al.* Reference Change Value for α -Fetoprotein and its Application in Early Detection of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Hepatic Disease. *Clin Chem* 2003; 49:1209-211.
6. American Family Physician. "Serum Tumor Markers". (online). Available <http://www.aafp.org/> (15 September 2003).
7. Tumor Markers. (online). Available <http://www.cancer.gov/> (10 February 2002).
8. Sturgeon C. Practice Guidelines for Tumor Marker Use in the Clinic. *Clin Chem* 2002; 48, 8:1151-59.
9. Haeckel R, Busch EW, Jennings RD, Kokholm G, Truchard A. Guidelines for the evaluation of

- analysers in clinical chemistry. European Committee for Clinical Laboratory Standards Documents, Vol.3, No.2 1986:7-8 Beuth Verlag GmbH Berlin.
10. Primus FJ, Kelly EA, Hansen HJ, Goldernberg DM. "Sandwich"-Type Immunoassay of Carcinoembryonic Antigen in Patients Receiving Murine Monoclonal Antibodies for Diagnosis and Therapy. Clin Chem 1998; 34: 261.
 11. Schroff RW, Foon KA, Beatty SM, Oldham RK, Morgan AC. Human Anti-Murine Immunoglobulin Responses in Patients Receiving Monoclonal Antibody Therapy. Cancer Res 1985; 45: 879-85.

นิพนธ์ต้นฉบับ

การสร้างและผลิตโปรตีนเอนไซม์ Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase ของเชื้อ *Plasmodium falciparum*

ปนัดดา เทพอักษร¹, อณิชา เลื่องชัยเขวง¹, พงษ์วิทย์ บัวล้อมใบ¹, เครือวัลย์ พลจันทร์¹, ปฐม สวรรค์ปัญญาเลิศ¹

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ของเชื้อ *Plasmodium falciparum* (pfGAPDH) เป็นเอนไซม์ใน glycolytic pathway มีความเหมือนกับเอนไซม์ GAPDH ของมนุษย์ 63.5% แต่ซีรัมที่ได้จากการฉีดกระตุ้นไม่ทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงของมนุษย์ และพบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่แตกต่างกันระหว่างเชื้อที่ทำการแยกได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน pfGAPDH เพื่อใช้เป็นอิมมูโนเจนในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

วิธีการ: ทำการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pfGAPDH-pET 15 b และนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน คือ *E. coli* BL21(DE3) และตรวจสอบการสร้างโปรตีน โดย SDS-PAGE และ western blot analysis จากนั้นทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography

ผลการทดลอง: รีคอมบิแนนท์ plasmid ที่ได้ เมื่อนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านสามารถสร้าง รีคอมบิแนนท์โปรตีน pfGAPDH ได้ในปริมาณสูง และเมื่อผ่านการ purify จะได้โปรตีนมีความบริสุทธิ์สูง และโปรตีนดังกล่าวสามารถใช้เป็นอิมมูโนเจนในการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองได้เป็นอย่างดี

สรุป: จากผลการทดลองพบว่า สามารถสร้างและผลิตโปรตีน pfGAPDH เพื่อใช้เป็นอิมมูโนเจน ในการฉีดกระตุ้นเพื่อผลิต monoclonal antibody ได้ โดยการศึกษาต่อไปจะเป็นการศึกษาคุณลักษณะของ monoclonal antibody ที่ได้ และนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยมาลาเรียต่อไป วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2549; 39: 27-35.

คำรหัส : *Plasmodium falciparum*, Glyceraldehyde- 3- phosphate dehydrogenase, *Escherichia coli* expression

-
1. ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพด้านการแพทย์และสาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
 2. กองมาลาเรีย กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข

Abstract: Cloning and Expression of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase from *Plasmodium Falciparum*.

Panadda Dhepakson¹, Anicha Luengchaichaweng¹, Pongwit Bualombai², Kruavon Balachandra¹,
Pathom Sawanpunyalert¹

Objective : Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Plasmodium falciparum* (pfGAPDH) is the key enzyme in glycolytic pathway. Its gene has 63.5% identity to human GAPDH but the immune serum against this enzyme has no cross-reactivity with human erythrocyte and also conserved among various isolates. This study aims to clone the pfGAPDH gene for expression of pfGAPDH protein in *Escherichia coli* for using as immunogen to obtain monoclonal antibody.

Methods : Plasmid pfGAPDH-pET15b was constructed and transformed into *E. coli* BL21(DE3) for expression of pfGAPDH protein. The expressed His-pfGAPDH fusion protein was characterized by SDS-PAGE and western blot analysis. Then the purified protein was obtained by affinity chromatography.

Results : The pfGAPDH protein was expressed in *E. coli* at high level .By SDS-PAGE and western blot analysis, the protein band of 36.6 kDa was detected. Furthermore, the high purity protein was obtained and used as immunogen for immunization in BALB/c mice.

Conclusion : The pfGAPDH gene was cloned and expressed protein at high level in *E. coli*. The purified protein was successfully used as immunogen. Further study will carry on characterization of the obtained monoclonal antibody and applied for development of malarial diagnostic kit. Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2006; 39: 27-35.

Key words : *Plasmodium falciparum*, Glyceraldehyde- 3- phosphate dehydrogenase, *Escherichia coli* expression

1. Medical Biotechnology Center, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health

2. Malaria Division, Department of Disease Control, Ministry of Public Health

Introduction

The malaria situation is still endemic and minor epidemic especially in the border line of Thailand.¹ The prompt and accurate diagnosis is the key of effective disease management in malaria patients. The two diagnosis approaches are clinical

diagnosis and microscopic diagnosis, however these do not allow satisfactory diagnosis of malaria.²⁻³ Using microscopic examination for routine malaria diagnosis has many practical problems since it is labor-intensive and requires skilled operators.⁴ Recently, rapid immunochromatography format is the

most prominent alternatives. However, its sensitivity still varies in the field study.⁵⁻⁷ The other parasitic enzyme based antigen detection has been mentioned to supplement the available dipstick.

The glycolytic pathway is regarded as particularly important for the blood stage malaria parasite to grow and multiply. Utilization of glucose by parasitized red blood cells was reported to be increased 50 to 100 times more than that by non-parasitized ones.⁸ Almost the increasing in utilization is the result of glycolytic enzymes expressed at high level by the parasite in anaerobic Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) pathway.⁹

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Plasmodium falciparum* (pfGAPDH) is a key enzyme in glycolysis and catalyzes the oxidative phosphorylation of glyceraldehydes 3 phosphate into 1,3 bisphosphoglycerate in the presence of NAD⁺ and inorganic phosphate. Its gene has 63.5% identity to human GAPDH but the immune serum against this enzyme has no cross-reactivity with human erythrocyte and also conserve among various isolates.¹⁰ By the way, the detection of pfGAPDH for malarial diagnosis has not yet been conducted. Therefore, this study aims to clone pfGAPDH gene for expression of pfGAPDH protein from *Escherichia coli* for using as immunogen to obtain monoclonal antibody by hybridoma technology. Furthermore, it was demonstrated that the obtained monoclonal antibody could react with blood stage parasite by western blot analysis and immunofluorescence staining. The successful production of antigen and monoclonal antibody lead to the new developed test for malaria diagnosis.

Materials and methods

Parasites

Plasmodium falciparum strain K1 were main-

tained *in vitro* in RPMI 1640 medium to which was added human type O red blood cell and 10% heat-inactivated human serum. All cultures were placed in a humidified incubator at 37°C with gas controlled environment of 5% O₂, 5%CO₂, and 90% N₂ and fed according to the established procedures.¹¹

Detection of parasites

Parasites was determined by light microscopy using Giemsa-stained thin smears and with fluorescent microscopy using immunostaining with monoclonal antibody.

Cloning of pGAPDH gene into plasmid *E. coli*

Total RNA was isolated from mixed stage saponin (0.1%) lysed *P. falciparum* (K1 strain) infected erythrocytes. The pfGAPDH gene was amplified from cDNA of *P. falciparum* that reverse transcribed from total RNA using specific primers of ORF of pfGAPDH containing *Nde* I and *Xho* I sites. The amplification was achieved by incubating the reaction mixture (50 µl) for 5 mins at 95 °C, 30 cycles of 1 min at 95 °C, 1 min at 55 °C, and 1 min at 72 °C and a final extension for 10 mins at 72 °C. The PCR products had a single deoxyadenosine (A) of the 3' end that were ligated with pCR 2.1 vector of TA Cloning Kit (Invitrogen) and transformed into *E. coli* (TOP 10 F'). The transformed colonies were selected by colony PCR. The plasmid of positive colony were extracted by QIAprep® spin miniprep kit (QIAGEN) and double digested with *Xho* I and *Nde* I, gel purification and cloned inframe into the bacterial expression vector pET 15b (Novagen). The transformants were pick up and selected by colony PCR.

Expression and Characterization of pGAPDH

The recombinant pfGAPDH was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) with six histidine residues at the

N-terminal portion. The cells were cultured in 3 ml of LB broth containing 100 µg/ml of ampicillin at 30 °C, 2 hours. The expression was induced by the addition of 1 mM isopropyl thiogalactoside (IPTG) (Sigma) and cultured for additional 4 hours. The pellet was collected and lysed in SDS-PAGE sample buffer then lysate and debris were separated and applied to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis using 10% gels then stained with coomassie blue R-250, and immunoblotting using anti-His antibody.

Western blot analysis

Total cell lysates were run onto 10% gels. As molecular weight marker (Prestained SDS-PAGE standards, broad Range Bio-Rad) was used. Separated proteins were transferred electroelectrically to nitrocellulose filter (Schleicher & Schuell). Blots were blocked and then incubated with anti-His antibody (1:500) (QIAGEN). After several washing steps, blots were incubate with 1:1000 dilution of a rabbit anti-mouse IgG Horseradish peroxidase conjugated IgG (DAKO) for 30 min, blots were developed using 3, 3-Diaminobenzidine (Sigma) to visualize bands.

Purification of pGAPDH from recombinant *E. coli*

Large scale culture of pfGAPDH expressed clones in *E.coli* BL21 (DE3) and induced with IPTG was prepared. Then crude extract was produced by sonication pellet of cultured *E.coli* in lysis buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl and 2.5 mM imidazole, pH 8.0). After centrifugation at 10,000xg, the supernate (containing soluble protein of interest) was loaded onto Ni-NTA resin (QIAGEN) and washed three times with wash buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl and 20 mM imidazole, pH 8.0). The recombinant protein was recovered by using elution buffer (50

mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl and 250 mM imidazole, pH 8.0). After analysis by SDS-PAGE the purified protein was pooled and store at -20 °C. Protein concentration was determined using BSA standard.

Generation of monoclonal antibodies

Monoclonal antibodies against pfGAPDH was establish by Pongwit *et al.* Briefly, BALB/c mice were immunized and boosted with purified pfGAPDH protein. Then splenocytes were fused to the myeloma cells and selected in hypoxanthin aminopterin thymidine(HAT) media. Antibody from secreting cell line were screen for their activity by ELISA. Clones secreting anti-pfGAPDH mAb were expanded and cloned by limiting dilutions. Ascetic fluids with high antibody titers were then accumulated by injecting cloned hybrid cells intraperitoneally into mice treated with Pristane (Sigma) and purified according to published procedures.

Results

Cloning, Expression and Characterization of pfGAPDH

The ORF of pfGAPDH gene was amplify from cDNA of K1 strain. The PCR product of 1,013 bps was maintained in cloning vector pCR 2.1 and then subcloned into pET 15b expression vector to produce plasmid pfGAPDH-pET 15b. The plasmid was transformed into *E.coli* BL21 (DE3) host cell for expression. The positive clones were checked by PCR and double digestion (Fig. 1A and 1B). The recombinant pfGAPDH protein was expressed in *E. coli* BL21(DE3) with molecular weight of 36.6 kDa and no specific band was observed from lysates of *E. coli* alone and *E. coli* with plasmid pET-15b contained no insert (Fig. 2).

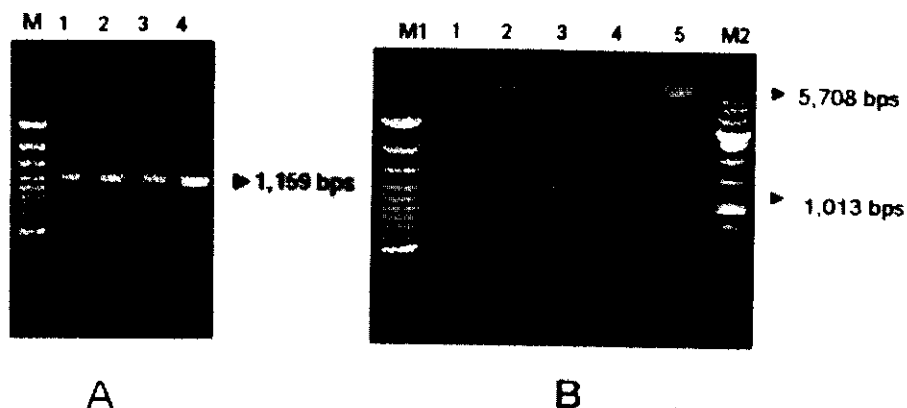


Figure 1. Agarose gel electrophoresis analysis of transformants that contained plasmid pfGAPDH –pET 15b. (A) By PCR (lane M: marker, lane 1-4 : positive clones). (B) The positives clones were confirmed by double digestion with restriction enzymes *NdeI* and *XhoI* (lane M1, M2 : marker, lane1-4 : positive clones, lane 5 : uncut).

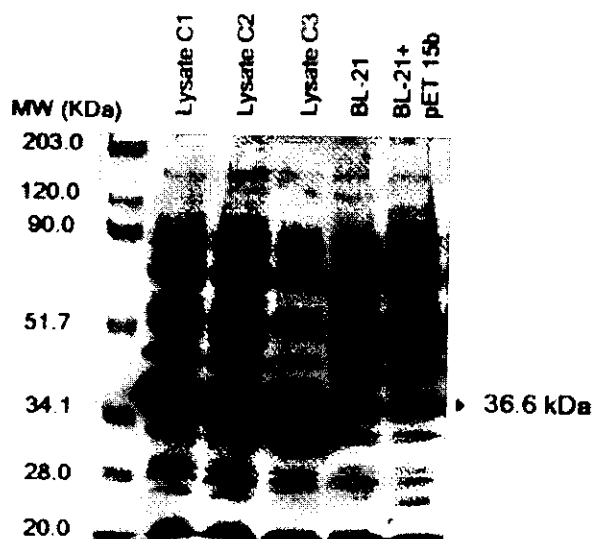


Figure 2. SDS-PAGE analysis of pfGAPDH expression. The lysate of *E. coli* BL21(DE3) transformed with plasmid pfGAPDH-pET15b clone 1-3(LysateC1-C3), lysate of *E. coli* BL21 (DE3) (BL-21) and lysate of *E. coli* BL21(DE3) transformed with pET-15b (BL-21+pET 15b) were applied to 10% SDS-PAGE then stained with coomassie blue R-250.

Purification of pfGAPDH protein

In order to use pfGAPDH protein as immunogen and screening for monoclonal antibodies against pfGAPDH, large scale culture and purification of the protein was conducted. The 6xHis tagged at N-terminus of vector pET-15b was advantage for purification of fusion protein by affinity chromatography using

Ni-NTA resin. As shown in Fig 3A, the obtained protein had high purity of about 90% and yield of 5 mg per one litre of culture medium, as judged by SDS-PAGE analysis. The purified protein was also analyzed by western blot analysis using anti-His antibody. Fig. 3B shows that the anti-His antibody recognized specific band of 36.6 kDa protein.

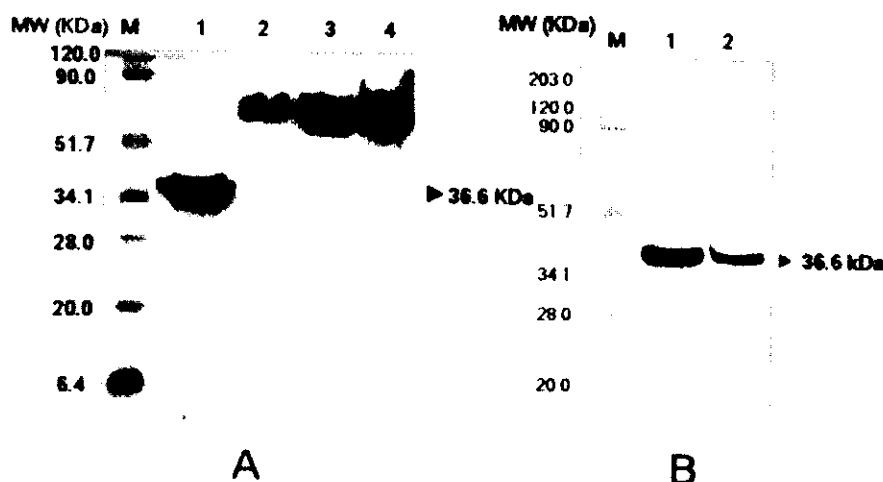


Figure 3. SDS-PAGE and western blot analysis of purified pfGAPDH protein. (A) SDS-PAGE to determine the purity and concentration of purified pfGAPDH protein compared with BSA standard protein. (M : protein marker, lane 1: purified pfGAPDH, lane 2-4 : BSA standard at concentration 5mg/ml, 10mg/ml and 15mg/ml respectively). (B) Western blot analysis of purified pfGAPDH protein eluted from Ni-NTA resin using anti-His antibody (lane M : protein marker, lane 1-2: purified protein from first elution and second elution, respectively).

Detection of pfGAPDH in parasites using anti-pfGAPDH mAb

In order to characterize the activity of the mAb against pfGAPDH (anti- pfGAPDH mAb), an immunoblotting and IFA were performed using the mAb. As shown in Fig. 4A, by western blot analysis, the anti- pfGAPDH mAb could recognize pfGAPDH protein in both the cultured parasites and recombi-

nant protein from *E. coli* specifically. Furthermore, after purification of ascetic fluid, the mAb could recognize pfGAPDH of *P. falciparum* from clinical samples with no specific band was observed from human red blood cell (Fig. 4B). By IFA pfGAPDH was also detected at very high levels in cytosol of parasites in parasitized red blood cells as shown in Fig. 5A and 5B.

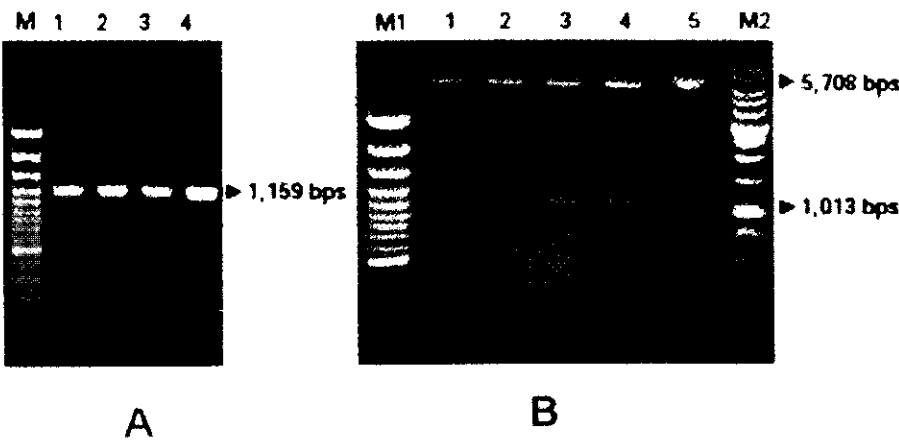


Figure 4. Determination of anti-pfGAPDH mAb activity. (A) Western blot analysis using ascetic fluid (1:5000) (M : protein marker, lane1-2: lysate of human red blood cells, lane 3-4: lysate of *P. falciparum* parasitized RBC in sample, lane 5-6: lysate of *P. falciparum* parasitized RBC in culture, lane 7-8: lysate of *E. coli* BL21(DE3), lane 9 : recombinant pfGAPDH protein). (B) Western blot analysis using purified mAb (1:5000)(lane 1 : lysate of *E. coli* BL21(DE3), lane2 : lysate of *P. falciparum* parasitized RBC in sample, lane 3 : lysate of human red blood cells, lane 4 : lysate of *P. falciparum* parasitized RBC in culture, lane 5 : recombinant pfGAPDH protein,). The arrows indicated protein bands of about 36.6 kDa that was recognized by anti-pfGAPDH mAb.

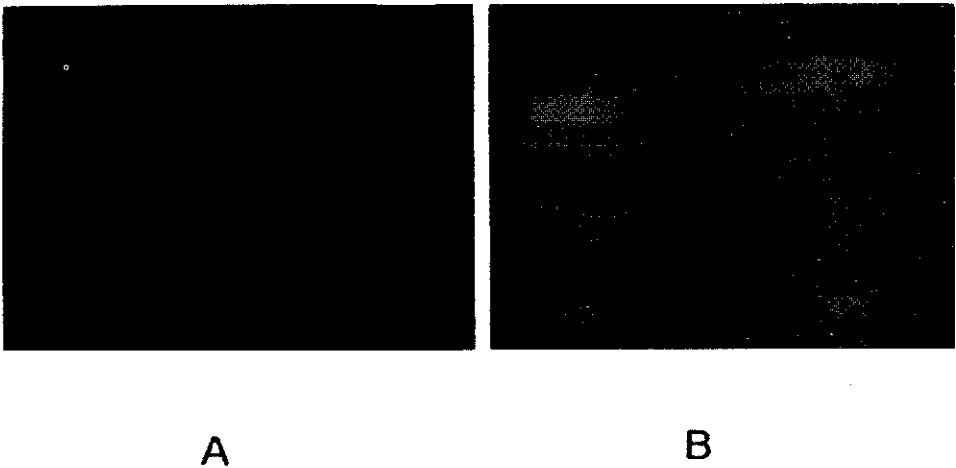


Figure 5. Detection of pfGAPDH in the parasite by immunofluorescent staining. (A) The thin film of blood stage *P. falciparum* was fixed and permeabilized and incubated in anti-pfGAPDH mAb followed by incubate in FITC-conjugated goat anti-mouse IgG and visualized by fluorescent microscopy. (B) The same area was visualized in bright field to positioned the parasites in red blood cells.

Discussion

Recently, rapid test or dipstick based on the detection of antigen(s) released from parasitized red blood cells for malarial diagnosis have been developed.¹²⁻¹³ In the case of *P. falciparum*, rapid test based on detection of *P. falciparum* histidine-rich protein 2 (HRP-2)¹⁴ or *Plasmodium*-specific lactate dehydrogenase (pLDH)^{7,15} have been conducted and the sensitivity, specificity of these tests have been assessed compared with microscopy examination.^{7,13,16} Although the specificity for detection are high (>90%), the sensitivity falls off at low levels of parasitemia. Therefore, further development appears necessary to improve the performance of the test.

The gene coding for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; EC 1.2.1.12) was first isolated from *Plasmodium falciparum* by Daubenberger *et al.* in 2000. Study in subcellular fractionation demonstrated that pfGAPDH was found in both the membrane-containing pellet and the supernatant fraction of parasite lysates.¹⁷ The pfGAPDH could appropriately be antigen for detection in immunodiagnosis of malaria by establishment of monoclonal antibody for development of dipstick. Using protein from *in vitro* culture, purified pfGAPDH antigen was obtained very low yield and highly time consume for continuous culture parasites and process in purification. The large amount of pfGAPDH was also needed to screen the monoclonal antibodies against pfGAPDH. More practical and easier way to obtain in amount and stable quality of pfGAPDH in each lot was producing recombinant pfGAPDH from *E. coli*. Our results demonstrated that the recombinant protein could be produced in *E. coli* employed pET 15b vector system, the expressed protein was recovered in the soluble fraction of the total extract then purified in native form and successfully used for immunization

in BALB/c mice to produce monoclonal antibody. The obtained mAb could recognize parasite GAPDH protein at specific band of 36.6 kDa by western blot analysis. By IFA, the protein was stained specifically and localized in cytosol of parasites, note that this mAb has no cross-reactivity to human red blood cells that correlated well with previous report using rabbit polyclonal antibody.¹⁰ This study suggested that it is a high potential for using this obtained anti-pfGAPDH mAb for further development of dipstick to improve capacity of detection.

Acknowledgement

This work was granted by Kenan Foundation Asia (KFAsia) as a part of project entitled "Cloning and expression of Lactate dehydrogenase (LDH) and Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) enzyme from *Plasmodium falciparum* by genetic engineering method"

References

1. Kondrashin AV. Malaria in the WHO Southeast Asia region. *Indian J Malariol* 1992 Sep; 29 (3):129-60.
2. Yacoub S, Mohammed MJ, Ramsan M, Albonico M. Clinical predictors of malaria and other febrile illnesses in children under five on Pemba Island, Tanzania. *Trop Doct* 2005 Apr; 35(2): 78-81.
3. Suh KN, Kain KC, Keystone JS. Malaria. *CMAJ* 2004 May 25; 170(11): 1693-702.
4. Kain KC, Harrington MA, Tennyson S, Keystone JS. Imported malaria: prospective analysis of problems in diagnosis and management. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 142-9.
5. Moody A, Hunt-Cooke A, Gabbett E, Chiodini P. Performance of the OptiMAL malaria antigen capture dipstick for malaria diagnosis and

- treatment monitoring at the Hospital for Tropical Disease, London. *Br J Haemato* 2000; 109: 891-94.
6. Moody A. Rapid diagnosis test for malaria parasite. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 66-78
 7. Palmer CJ, Lindo JF, Klaskala WI, Quesada JA, Kaminsky R, Baum MK, Ager AL. Evaluation of the OptiMAL test for rapid diagnosis of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 203-6
 8. Roth EF Jr, Raventos-Suarez C, Perkins M, Nagel RL. Glutathione stability and oxidative stress in *P. falciparum* infection *in vitro*: responses of normal and G6PD deficient cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1982 Nov 30; 109(2): 355-62.
 9. Roth EF Jr, Calvin MC, Max-Audit I, Rosa J, Rosa R. The enzymes of the glycolytic pathway in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *Blood* 1988 Dec; 72(6): 1922-25.
 10. Deubenerger AC, Poltl –Frank F, Jiang G, Lipp J, Certa U and Pluschke G. Identification and recombinant expression of glyceraldehyde –3-phosphate dehydrogenase of *Plasmodium falciparum*. *GENE* 2000; 246: 255-56
 11. Michael T. Makler and David J. Hinrichs. Measurement of the lactae dehydrogenase activity of *Plasmodium falciparum* as an assessment of parasitemia. *J Trop Med Hyg* 1993; 48(2): 205-10.
 12. Cho-Min-Naing, Gatton ML. Performance appraisal of rapid on-site malaria diagnosis (ICT malaria Pf/Pv test) in relation to human resources at village level in Myanmar. *Acta Trop* 2002 Jan; 81(1): 13-19.
 13. Iqbal J, Khalid N, Hira PR. Comparison of two commercial assays with expert microscopy for confirmation of symptomatically diagnosed malaria. *J. Clin Microbiol* 2002 Dec; 40(12): 4675-678.
 14. Proux S, Hkirijareon L, Ngamngonkiri C, McConnell S, Nosten F. Paracheck-Pf: a new, inexpensive and reliable rapid test for *P. falciparum* malaria. *Trop Med Int Health* 2001 Feb; 6(2): 99-101.
 15. Moody AH, Chiodini PL. Non-microscopic method for malaria diagnosis using OptiMAL IT, a second-generation dipstick for malaria pLDH antigen detection. *Br J Biomed Sci* 2002; 59(4): 228-31.
 16. Gogtay NJ, Dalvi SS, Rajgor D et. al. Diagnostic and prognostic utility of rapid strip (OptiMal and Paracheck) versus conventional smear microscopy in adult patients of acute, uncomplicated *P. falciparum* malaria in Mumbai, India. *J Assoc Physicians India* 2003 Aug; 51: 762-65.
 17. Daubenberger CA, Tisdale EJ, Curcic M, et. al. The N'-terminal domain of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of the apicomplexan *Plasmodium falciparum* mediates GTPase Rab2-dependent recruitment to membranes. *Biol Chem* 2003 Aug; 384(8): 1227-237.

นิพนธ์ต้นฉบับ

ผลระยะยาวของการออกกำลังกายแบบ 12 Minute Walk Test ที่มีต่อสมรรถภาพร่างกายในเพศหญิงที่มีน้ำหนักตัวเกิน

กรกฎ เห็นแสงวิไล*, สายนที ปรารณาผล*

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: เพื่อประเมินผลระยะยาวของการออกกำลังกายด้วยการเดิน 12 นาทีที่มีต่อสมรรถภาพร่างกายในเพศหญิงที่มีน้ำหนักตัวเกิน

วิธีการ: ผู้เข้าร่วมการศึกษาคืออาสาสมัครเพศหญิงอายุ 20-40 ปี ที่ไม่ค่อยมีการเคลื่อนไหวและมีค่าดัชนีมวลกายมากกว่าหรือเท่ากับ 25 กิโลกรัมต่อตารางเมตรและมีสัดส่วนเส้นรอบวงของเอวต่อเส้นรอบวงของสะโพกมากกว่า 0.8 ทำการออกกำลังกายโดยเดินให้เร็วที่สุดเท่าที่จะทำได้บนทางราบวันละ 2 ครั้ง ๆ ละ 12 นาที สัปดาห์ละ 5 วัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ มีการแนะนำในเรื่องอาหารเพื่อควบคุมน้ำหนักตลอดการศึกษา ทำการประเมินระยะทางที่เดินได้ ความเร็วในการเดิน น้ำหนักตัว ค่าดัชนีมวลกาย สัดส่วนเส้นรอบวงของเอวต่อเส้นรอบวงของสะโพก อัตราการเต้นของหัวใจขณะพัก และความดันโลหิตขณะหัวใจคลายและบีบตัว จากนั้นเปรียบเทียบผลการเปลี่ยนแปลงของค่าดังกล่าวก่อนและหลังการฝึกตามโปรแกรมโดยใช้สถิติ Paired t-test

ผลการศึกษา: หลังออกกำลังกายตามโปรแกรม ผู้เข้าร่วมการศึกษามีความเร็วในการเดินเพิ่มขึ้นมีน้ำหนักตัว สัดส่วนเส้นรอบวงของเอวต่อเส้นรอบวงของสะโพก อัตราการเต้นของหัวใจขณะพัก และความดันโลหิตขณะหัวใจบีบและคลายตัวของผู้เข้ารับการทดสอบมีค่าลดลง อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงค่าดัชนีมวลกาย

สรุป: การออกกำลังกายด้วยการเดินเร็ววันละ 2 ครั้ง ๆ ละ 12 นาที เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ส่งผลให้เพศหญิงที่มีน้ำหนักตัวเกินมีสมรรถภาพของร่างกายดีขึ้น ในขณะที่ไม่มีผลในการเปลี่ยนแปลงค่าดัชนีมวลกาย วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2549;

39: 36-41.

คำรหัส: การเดิน 12 นาที ความเร็วในการเดิน ค่าดัชนีมวลกาย อัตราการเต้นของหัวใจขณะพัก น้ำหนักตัวเกิน

* ภาควิชากายภาพบำบัด คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Abstract: The Prolonged Effects of 12 Minute Walk Test Exercise Program on Physical Fitness in Overweight Women

Korakot Hensangvilai*, Sainatee Pratanaphon*

Objective: To assess the prolonged effects of 12 Minute walk test (12-MWT) exercise program on physical fitness in overweight women.

Methods: Thirty sedentary women (age 20-40 years) being classified as overweight ($BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$ and $WHR > 0.8$) were participated in this study. Subjects were asked to walk continuously through the plain ground and speed up as much as they could for 12 minutes. This exercise program was done twice a day, five days a week for 8-weeks. Weight control via diet was recommended throughout the experiment. Walking distances, walking speed, body weight (BW), body mass index (BMI), waist to hip ratio (WHR), resting heart rate (RHR) and blood pressure (BP) were measured at baseline and after 8 weeks of the intervention. Comparisons in those parameters between pre- and post-intervention were determined using paired t-test.

Results: The intervention was associated with a significant improvement in walking distances, walking speed, BW, WHR, RHR, and BP except BMI.

Conclusion: In overweight women, eight weeks of 12-MWT exercise program could enhance physical fitness, except BMI. *Bull Chiang Mai Assoc Med Sci* 2006; 39: 36-41.

Key words: 12 MWT, walking speed, BMI, RHR, overweight

* Department of Physical Therapy, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, 50200 Thailand.

บทนำ

ความอ้วนเกิดจากการที่ร่างกายมีไขมันส่วนเกิน อันเป็นผลมาจากการรับพลังงานเข้ามาในร่างกายมากกว่าการใช้พลังงาน ส่งผลให้เกิดปัญหาสุขภาพทั้งร่างกายและจิตใจ เช่น ความดันโลหิตสูง เบาหวาน โรคหัวใจและหลอดเลือด นิ้วในถุงน้ำดี มะเร็ง ประจำเดือนผิดปกติ ข้ออักเสบ ปวดหลังและเครียด เป็นต้น อุตการณ์ของความอ้วนมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในประชากรทั่วโลกทุกเพศทุกวัย การสำรวจในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2538 พบว่าความชุกของโรคอ้วนเพิ่มขึ้นในทุกกลุ่มอายุ กลุ่มที่มีอัตรา

สูงสุดคือช่วงอายุ 40-49 ปี เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 19.1 เป็นร้อยละ 40.2 รองลงมาคือช่วงอายุ 20-29 ปี เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 2.9 เป็นร้อยละ 20.4 (1) วิธีการแก้ปัญหาโรคอ้วนที่นิยมใช้คือ การออกกำลังกายควบคู่กับการควบคุมอาหารเนื่องจากให้ผลดีในการลดไขมัน และรักษาสุขภาพของมวลกล้ามเนื้อให้แข็งแรงสมบูรณ์ อีกทั้งยังป้องกันการที่น้ำหนักตัวกลับมาเพิ่มขึ้น หลังจากทีลดน้ำหนักตัวได้แล้ว (2) และเนื่องจากคนอ้วนมีความเสี่ยงสูงต่อการบาดเจ็บของระบบกระดูกและกล้ามเนื้อ จึงมีการแนะนำให้เริ่มจากการทำกิจกรรมทางกายที่มีระดับความหนักที่ต่ำ

กว่าระดับที่จะไปเพิ่มความทนทานของระบบหัวใจและไหลเวียนเลือด (submaximal exercise) (3) ปัจจุบันการเดินเป็นกิจกรรมทางกายที่ได้รับความนิยมเนื่องจากสะดวก ประยุกต์ใช้ในชีวิตประจำวันได้ โดยเฉพาะบริบทของคนที่มีงานทำตลอดวัน ไม่สามารถจัดเวลาไปเล่นกีฬา หรือออกกำลังกายเป็นเวลายาวนานได้ การเดินมีความเหมาะสมกับคนอ้วนในการควบคุมน้ำหนักตัวให้ได้ผลในระยะยาว (4) เนื่องจากไม่มีการกระแทกกระแทกหรือมีแรงกระทำต่อข้อเข่ามาก และสามารถลดน้ำหนักและไขมันในคนอ้วนเพศหญิงได้ (5) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดถึงผลของการเดินเร็วที่มีผลต่อสมรรถภาพทางกาย ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเดินเร็ว 12 นาที ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงระยะทางที่เดินได้ ความเร็วในการเดิน น้ำหนักตัว สัดส่วนของเส้นรอบวงของเอวต่อเส้นรอบวงของสะโพก อัตราการเต้นของหัวใจขณะพักและความดันโลหิตของผู้ที่มีน้ำหนักตัวเกินเพศหญิง

กลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างเป็นอาสาสมัครเพศหญิงอายุ 20-40 ปี ไม่ค่อยมีการเคลื่อนไหว มีค่าดัชนีมวลกายมากกว่าหรือเท่ากับ 25 กิโลกรัมต่อตารางเมตร และมีสัดส่วนเส้นรอบวงของเอวต่อเส้นรอบวงของสะโพกมากกว่า 0.8 ไม่ได้ใช้ยาลดน้ำหนัก และไม่มีโรคประจำตัวที่เป็นอุปสรรคต่อการออกกำลังกาย

วัสดุและวิธีการ

- อธิบายวิธีการทดสอบพอสังเขปให้ผู้เข้าร่วมการศึกษารับรู้ พร้อมทั้งแนะนำในเรื่องอาหารเพื่อควบคุมน้ำหนัก
- ชั่งน้ำหนัก วัดส่วนสูงโดยใช้เครื่องชั่งน้ำหนักระบบดิจิทัลและเครื่องวัดส่วนสูงเพื่อนำมาหาค่าดัชนีมวลกาย
- วัดเส้นรอบวงของเอวตรงกึ่งกลางระหว่างกึ่งกลางของซี่โครงชั้นที่ 12 กับ top of iliac crest ทำการวัดในขณะที่หายใจออกจนสุด และวัดเส้นรอบวงของสะโพกในส่วนที่กว้างที่สุดโดยใช้สายวัด (6) เพื่อนำไปหาค่าสัดส่วนเส้นรอบวงของเอวต่อเส้นรอบวงของสะโพก
- นั่งพักในห้องที่เงียบสงบประมาณ 5 นาทีแล้ว

วัดอัตราการเต้นของหัวใจขณะพักโดยใช้เครื่องวัดอัตราการเต้นของหัวใจ (polar watch) และวัดความดันโลหิตในขณะที่หัวใจบีบและคลายตัวโดยใช้ mercury sphygmomanometer

5. ให้ผู้เข้าร่วมการศึกษานอนอุ่นร่างกายโดยยืดกล้ามเนื้อเป็นเวลา 15 นาทีแล้วเดินตามพื้นราบ โดยเดินไปกลับที่จุดเริ่มต้นและจุดสิ้นสุดของกรวยอย่างต่อเนื่อง และเร็วที่สุดเท่าที่จะทำได้ (7) เป็นเวลา 12 นาที ใช้นาฬิกาจับเวลาและบันทึกระยะทางที่เดินได้ ห้ามวิ่งและหยุดพักเมื่อเดินครบ 12 นาทีผู้ทำการทดสอบจะบอกให้ลดความเร็วการเดิน และเดินต่อเนื่องสักพัก

6. ออกกำลังกายตามโปรแกรมดังกล่าววันละ 2 ครั้ง เช้าและเย็น สัปดาห์ละ 5 วัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์

7. เมื่อสิ้นสุดโปรแกรมออกกำลังกาย ชั่งน้ำหนัก วัดส่วนสูง เส้นรอบวงของเอว เส้นรอบวงของสะโพก อัตราการเต้นของหัวใจขณะพักและความดันโลหิตขณะหัวใจบีบและคลายตัว ซ้ำอีกครั้ง

8. เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าดังกล่าวก่อนและหลังการออกกำลังกายโดยใช้สถิติ paired t-test

ผลการศึกษา

- ข้อมูลทั่วไปของผู้ที่ได้รับการทดสอบ
ผู้ได้รับการทดสอบจำนวน 30 คน มีอายุเฉลี่ย 21.80 ± 4.07 ปี น้ำหนักตัวเฉลี่ย 68.22 ± 1.53 กิโลกรัม และส่วนสูงเฉลี่ย 1.56 ± 0.05 เมตร
- หลังการเดิน 12 MWT เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ระยะทางที่เดินได้ใน 12 นาที (จาก 439.13 ± 56.94 เมตร เป็น 483.35 ± 65.50 เมตร) และความเร็วในการเดินเพิ่มขึ้น (จาก 0.61 ± 0.08 เมตร/นาที เป็น 0.67 ± 0.09 เมตร/นาที) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) ส่วนน้ำหนักตัว (จาก 68.22 ± 11.53 กิโลกรัม เป็น 66.09 ± 11.24 กิโลกรัม) สัดส่วนเส้นรอบวงของเอวต่อเส้นรอบวงของสะโพก (จาก 0.82 ± 0.03 เป็น 0.80 ± 0.03) อัตราการเต้นของหัวใจขณะพัก (จาก 79.33 ± 3.72 ครั้ง/นาที เป็น 72.87 ± 5.12 ครั้ง/นาที) และความดันโลหิตขณะหัวใจบีบ (จาก 114.83 ± 7.93 มิลลิเมตรปรอท เป็น 100.17 ± 7.01 มิลลิเมตรปรอท) และคลายตัว (จาก 73.50 ± 7.09 มิลลิเมตรปรอท เป็น

66.17±5.03 มิลลิเมตรปรอท) ของผู้เข้ารับการทดสอบ มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.001$) ในขณะที่ค่าดัชนีมวลกายไม่มีการเปลี่ยนแปลง (จาก 27.78±3.46

กิโลกรัม/ตารางเมตรเป็น 26.92±3.40 กิโลกรัม/ตารางเมตร) ($p>0.05$) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงความเร็วในการเดิน น้ำหนักตัว ค่าดัชนีมวลกาย สัดส่วนเส้นรอบวงของเอวต่อเส้นรอบวงของสะโพก (WHR) อัตราการเต้นของหัวใจขณะพัก และความดันโลหิตของผู้ที่มีน้ำหนักตัวเกินเกณฑ์ ก่อนและหลังออกกำลังกายตามโปรแกรมโดยการเดิน 12 นาที สัปดาห์ละ 5 วัน ๆ ละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ปัจจัยที่ศึกษา	ออกกำลังกายโดยการเดิน 12 นาที	
	ก่อน	หลัง
ระยะทางที่เดินได้ใน 12 นาที (เมตร)	439.13±56.94	483.35±65.50*
ความเร็วในการเดิน (เมตร/วินาที)	0.61±0.08	0.67±0.09*
น้ำหนักตัว (กิโลกรัม)	68.22±11.53	66.09±11.24**
ค่าดัชนีมวลกาย (กิโลกรัม/ตารางเมตร)	27.78±3.46	26.92±3.40
สัดส่วนเส้นรอบวงของเอวต่อเส้นรอบวงของสะโพก	0.82±0.03	0.80±0.03**
อัตราการเต้นของหัวใจขณะพัก (ครั้ง/นาที)	79.33±3.72	72.87±5.12**
ความดันโลหิตขณะหัวใจบีบตัว (มิลลิเมตรปรอท)	114.83±7.93	100.17±7.01**
ความดันโลหิตขณะหัวใจคลายตัว (มิลลิเมตรปรอท)	73.50±7.09	66.17±5.03**

* หมายถึงมีความแตกต่างกับก่อนออกกำลังกายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$)

** หมายถึงมีความแตกต่างกับก่อนออกกำลังกายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.001$)

วิจารณ์ผล

การเดินเป็นรูปแบบการออกกำลังกายที่เหมาะสมในคนอ้วน เนื่องจากสามารถทำได้โดยไม่จำกัดสถานที่ ไม่ต้องอาศัย ทักษะใดเป็นพิเศษ มีแรงกระทำที่ข้อต่อไม่มาก เสี่ยงต่อการบาดเจ็บของระบบโครงร่างและกล้ามเนื้อน้อย ตลอดจนติดตามผลจากการฝึกได้ (3) การศึกษานี้จึงนำการทดสอบด้วยการเดิน 12 นาที (12-MWT) ซึ่งเป็นการออกกำลังกายในระดับ submaximal และเป็นตัวประเมินศักยภาพในการทำงาน (functional capacity) โดยเฉพาะอย่างยิ่งกิจกรรมทางกายที่เกี่ยวข้องกับการดำเนินชีวิตประจำวัน ตามขีดความสามารถของแต่ละคน (7) มาประยุกต์ใช้เป็นโปรแกรมการออกกำลังกายสำหรับผู้ใหญ่เพศหญิงที่มีน้ำหนักตัวเกินอายุเฉลี่ย 21.8±4.07 ปี (ช่วงอายุ 20-40 ปี) โดยเดิน

ให้เร็วที่สุดเท่าที่จะทำได้วันละ 2 เวลา คือเช้าและเย็นเป็นเวลา 5 วันต่อสัปดาห์ (วันละ 24 นาที ระยะเวลาโดยรวมในการเดิน 120 นาทีต่อสัปดาห์) ผลการศึกษาพบว่าผู้เข้าร่วมการศึกษามีการเดินได้ระยะทางที่ไกลขึ้น มีความเร็วในการเดินเพิ่มขึ้น มีน้ำหนักตัว สัดส่วนเส้นรอบวงของเอวต่อเส้นรอบวงของสะโพก อัตราการเต้นของหัวใจขณะพัก และความดันโลหิตขณะหัวใจบีบและคลายตัวลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงค่าดัชนีมวลกาย ซึ่งการลดลงของน้ำหนักตัว (2.13 กิโลกรัม หรือ 3.12 %) และอัตราการเต้นของหัวใจในขณะพัก จากการศึกษานี้จะเป็นผลดีต่อสุขภาพในแง่ของระบบหัวใจและหลอดเลือด เพราะการลดน้ำหนักตัวนั้นสามารถลดความดันโลหิต และระดับไขมันในเลือดได้ (8) โดยน้ำหนักตัวที่ลดลงทุก 1 %

สามารถลดความดันโลหิตในขณะหัวใจบีบตัว 1 มิลลิเมตรปรอท และลดความดันโลหิตในขณะหัวใจคลายตัว 2 มิลลิเมตรปรอท ในผู้ที่มีน้ำหนักตัวเกินร่วมกับความดันโลหิตสูง (9) และน้ำหนักตัวที่ลดลงทุก 1 กิโลกรัม สามารถลดโคเลสเตอรอลชนิด LDL ได้ 1 % (10) ซึ่งจากการศึกษานี้ เมื่อพิจารณาถึงการลดลงของความดันโลหิตขณะหัวใจบีบ (14.67 มิลลิเมตรปรอท) และคลายตัว (7.33 มิลลิเมตรปรอท) พบว่ามีค่ามากกว่าที่ระบุไว้จากการศึกษาของ Reisin et al (9) และเนื่องจากเหตุหนึ่งนั้น มักมีการสะสมไขมันในส่วนของระยางค์ส่วนล่างมากกว่าระยางค์ส่วนบน (gynoid fat type) การศึกษานี้จึงเลือกประเมินองค์ประกอบของร่างกายโดยใช้ค่าสัดส่วนเส้นรอบวงของเอวต่อเส้นรอบวงของสะโพก ซึ่งหากค่า WHR มีค่ามากกว่า 0.82 จะถือว่ามีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดหลอดเลือดหัวใจโคโรนารี (11) และจากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า การเดิน 12 MWT เป็นเวลา 8 สัปดาห์นั้น ส่งผลให้ค่า WHR ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) จาก 0.82 ± 0.03 เป็น 0.80 ± 0.03 ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Murphy และ Hardman (12) ที่พบว่า การเดินอย่างกระฉับกระเฉง (brisk walking) ในหญิงวัยกลางคนที่ไม่ได้ออกกำลังกายสม่ำเสมอ วันละ 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที สัปดาห์ละ 5 วัน ที่ความหนัก 70-80% ของอัตราการเต้นของหัวใจสูงสุด โดยมีความเร็วอยู่ในช่วง 1.6-1.8 เมตร/นาที เป็นเวลา 10 สัปดาห์นั้น สามารถลดน้ำหนักตัว และเส้นรอบวงของเอวได้ (12) ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากการออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอ นั้นช่วยลดการสะสมไขมันในร่างกายส่วนบน ซึ่งส่งผลให้สัดส่วนของ WHR ลดลงตามไปด้วย เป็นผลดีต่อสุขภาพโดยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคต่าง ๆ ที่จะตามมา เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด (11) แต่หากพิจารณาถึงค่าดัชนีมวลกาย ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ทางอ้อมถึงปริมาณไขมันในร่างกาย พบว่าการเดินเร็วครั้งนี้ไม่สามารถลดค่าดัชนีมวลกายได้ ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากการที่น้ำหนักตัวไม่ได้ลดลงมากนัก และส่วนสูงเองก็ไม่ได้มีการเปลี่ยนแปลง ดังนั้น ค่าดัชนีมวลกายก่อนและหลังการเดินจึงมีค่าไม่แตกต่างกัน ซึ่งการลดน้ำหนักตัวและไขมันในร่างกาย จะได้ผลก็ต่อเมื่อร่างกายมีการใช้พลังงานมากกว่าที่รับเข้ามา ดังนั้นการออกกำลังกายจะต้องพิจารณาถึงงาน

โดยรวมที่ทำ (total work output) (3) American College OF Sports Medicine (ACSM) ได้แนะนำไว้ว่า หากต้องการลดน้ำหนักตัวนั้น ควรออกกำลังกายอย่างน้อย 150 นาที หรือ 2.5 ชั่วโมงต่อสัปดาห์ ที่ระดับความหนักปานกลาง และเพื่อให้ได้ผลระยะยาวในการลดน้ำหนักตัว ผู้ที่มีน้ำหนักตัวเกินและอ้วนนั้น ควรเพิ่มระยะเวลาขึ้นที่อย่างน้อยจนกระทั่งถึง 200-300 นาที (3.3-3.5 ชั่วโมง หรือ มีการใช้พลังงานมากกว่าหรือเท่ากับ 2000 กิโลแคลอรี) ต่อสัปดาห์ (13) ในขณะที่ยังใช้เวลาในการเดินเร็วเพียง 120 นาทีต่อสัปดาห์ นอกจากนี้ มีรายงานเพิ่มเติมจากการศึกษาของ Murphy และ Hardman (12) ว่า การเดิน brisk walking ระยะสั้น วันละ 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที นั้นสามารถลดความหนาของไขมันได้ชั้นผิวหนังได้ ไม่แตกต่างจากการเดินระยะยาว วันละ 3 ครั้ง ๆ ละ 30 นาที ที่ความถี่และความหนักเท่า ๆ กัน ดังนั้น เพื่อให้ได้ผลดียิ่งขึ้นในการลดน้ำหนักตัวและค่าดัชนีมวลกาย การศึกษาต่อไปควรพิจารณาถึงความหนักของโปรแกรมการออกกำลังกายแล้วเพิ่มระยะเวลาให้เหมาะสมมากขึ้น

ส่วนระยะทางและความเร็วในการเดินที่เพิ่มขึ้นหลังออกกำลังกายตามโปรแกรมนั้น ก็เป็นตัวบ่งชี้ถึงความทนทานของกล้ามเนื้อที่พัฒนาขึ้น แต่เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาอื่น พบว่า เหตุหนึ่งที่น้ำหนักตัวเกินจากการศึกษานี้ ยังคงมีระยะทาง (483.4 ± 65.5 เมตร) และ/หรือความเร็วในการเดิน (0.67 ± 0.09 เมตร/นาที) น้อยกว่าการศึกษาอื่น ๆ เช่น กลุ่มวัยรุ่นที่มีน้ำหนักตัวเกินซึ่งทดสอบด้วยการเดิน 12-MWT (ระยะทาง 1174.4 ± 208.1 เมตร) (14) หรือกลุ่มวัยกลางคนที่ออกกำลังกายเพื่อการนันทนาการแบบ brisk walk (ความเร็วในการเดิน 1.79 ± 0.19 เมตร/วินาที) (15) และระยะทางที่เดินได้นั้นมีค่าใกล้เคียงกับระยะทางที่กลุ่มผู้ป่วยอัมพาตครึ่งซีกเดินได้ (ระยะทาง 530.5 ± 184.9 เมตร) (16) ดังนั้น จะเห็นได้ว่าการออกกำลังกายอย่างต่อเนื่องยังเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับกลุ่มผู้เข้าร่วมการศึกษาต่อไป

สำหรับข้อจำกัดในการศึกษานี้ คือ การที่ไม่สามารถควบคุมกิจกรรมทางกาย ชนิดและปริมาณของอาหารที่รับประทานของผู้เข้าร่วมการศึกษา ที่นอกเหนือไปจากโปรแกรมการออกกำลังกายได้ ดังนั้น การแนะนำการรับประทานอาหารเพื่อควบคุมน้ำหนักไม่ให้เพิ่มขึ้นจึงนำ

จะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาค้างนี้ แต่อย่างไรก็ตามผลที่ได้จากการศึกษาส่วนหนึ่งก็อาจเป็นผลมาจากการให้ความรู้ดังกล่าวได้เช่นกัน ซึ่งการศึกษาต่อไป ควรเพิ่มกลุ่มที่ควบคุมอาหารเพียงอย่างเดียว และกลุ่มที่ออกกำลังกายเพียงอย่างเดียว แต่ก็มีข้อสังเกตว่าการศึกษาครั้งนี้ไม่มีผู้ใดที่ขอลถอนตัวจากการศึกษา ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการให้อิสระต่อผู้เข้าร่วมการศึกษาโดยไม่ไปเปลี่ยนแปลงรูปแบบการดำเนินชีวิตตามปกติของเขามากจนเกินไป ทำให้ได้รับความร่วมมือเป็นอย่างดีในการศึกษา และหากผลการฝึกสามารถปรับเปลี่ยนพฤติกรรมการเดินทางของผู้เข้าร่วมการศึกษาได้ ก็น่าจะเป็นผลดีต่อการส่งเสริมสุขภาพระยะยาวต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. บรรจบ ชุณหสวัสดิกุล. กินน้อยตายยากกินมากตายเร็ว. พิมพ์ครั้งที่ 2 กรุงเทพมหานคร: รวมพรรณ. 2539.
2. Liebel R, Hirson J. Change in energy expenditure resulting from altered body weight. *North Engl J Med* 1995; 332: 621-28.
3. Hills AP, Byrne NM. Physical activity in the management of obesity. *Clinics in Dermatology* 2004; 22: 315-18.
4. Rippe J, Hess S. The role of physical activity in the prevention and management of obesity. *J Am Diet Assoc* 1998; 98: 531-38.
5. Elaine MM, Colin AB, Marie HM. Speed and exercise intensity of recreational walkers. *Preventive Medicine* 2002; 35: 397-400.
6. Corbin CB, Lindsey R, Greg Welk G, (eds). *Body composition*. In: *Concepts of fitness and wellness*. 3rd ed. Boston: Mc Graw Hill; 2000. p. 273-96.
7. Solway S, Brooks D, Lacasse Y, Thomas S. A qualitative systematic overview of the measurement properties of functional walk tests used in the cardiorespiratory domain. *Chest* 2001; 119(1): 256-70.
8. Garrow J. Christmas factor and snacking. *Lancet* 2000; 355: 8.
9. Reisin E, Abel R, Modan M, Silverberg DS, Eliahou HE, Modan B. Effect of weight loss without salt restriction on the reduction of blood pressure in overweight hypertensive patients. *N Engl J Med* 1978; 298: 1-6.
10. Wood PD, Stefanick ML, Dreon DM, et al. Changes in plasma lipids and lipoproteins in overweight men during weight loss through dieting as compared with exercise. *N Engl J Med* 1988; 319: 1173-9.
11. Fox EL, Bowers RW, Foss ML. (eds). Exercise, body composition, and weight control. In: *The Physiological Basis for Exercise and Sport*. 5th ed. WCB. Madison: Brown & Benchmark; 1993. p. 538-75.
12. Murphy MH and Hardman AE. Training effects of short and long bouts of brisk walking in sedentary women. *Med Sci Sports Exerc* 1998; 30: 152-57.
13. American College of Sports Medicine. Position stand. Appropriate intervention strategies for weight loss and prevention of weight regain for adults. *Med Sci Sports Exerc* 2001; 33: 2145-156.
14. Drinkard B, McDuffie J, McCann S, et al. Relationships between walk/run performance and cardiorespiratory fitness in adolescents who are overweight. *Phys Ther* 2001; 81(12): 1989-996.
15. Murtagh EM, Boreham CAG, Murphy MH. Speed and exercise intensity of recreational walkers. *Preventive Medicine* 2002; 35: 397-400.
16. Eng JJ, Chu KS, Dawson AS, et al. Functional walk tests in individuals with stroke relation to perceived exertion and myocardial exertion. *Stroke* 2002; 33: 756-61.

นิพนธ์ต้นฉบับ**รูปแบบทางพันธุกรรมของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสในน้ำเลือดประชากรไทยภาคเหนือ**

วารณี จิตอารี*, ทิพวรรณ ประภามณฑล*, ศักดิ์ระพี อินชื้อจาง*

บทคัดย่อ

ความเป็นมา เอนไซม์บิวทิลโคลีนเอสเตอเรสนิยมนำมาใช้ตรวจการได้รับพิษจากสารเคมีกำจัดศัตรูพืช และมีระดับการทำงานที่ขึ้นอยู่กับปัจจัยของแต่ละบุคคล เช่น เพศ อายุ การได้รับสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และรูปแบบทางพันธุกรรมของเอนไซม์

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับการทำงานของเอนไซม์บิวทิลโคลีนเอสเตอเรสกับรูปแบบทางพันธุกรรม

วิธีการ ศึกษาแบบภาคตัดขวาง โดยเลือกศึกษาในกลุ่มประชากรในจังหวัดเชียงใหม่ เก็บตัวอย่างเลือดเพื่อวิเคราะห์หาเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสในน้ำเลือดและรูปแบบโดยวิธีของ Ellman และ Genest and Kalow ตามลำดับ วิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธีทางสถิติเพื่อหาความถดถอยโดยพิจารณาความสัมพันธ์สหสัมพันธ์

ผลการศึกษา กลุ่มตัวอย่างมีจำนวน 133 คน (ชาย = 76, หญิง = 57) มีค่าเฉลี่ยระดับการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสเฉลี่ยเท่ากับ 5.08 ± 2.15 U/ml พบรูปแบบทางพันธุกรรม 4 แบบ คือ UU (ร้อยละ 67.6) UA (ร้อยละ 17.3) AF (ร้อยละ 14.3) และ UF (ร้อยละ 0.75) พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญระหว่างรูปแบบและระดับการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส ที่ $p < 0.05$

สรุป การประเมินผู้ที่ได้รับพิษจากสารเคมีกำจัดศัตรูพืชโดยใช้เอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส ควรจะคำนึงถึงรูปแบบทางพันธุกรรมร่วมด้วย วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2549; 39: 42-51.

คำสำคัญ: เอนไซม์บิวทิลโคลีนเอสเตอเรส สารเคมีกำจัดศัตรูพืช

* สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Abstract : Genetic Variants of Plasma Cholinesterase Enzyme in the Northern Thai Population

Warunee Jitaree*, Tipawan Prapamontol*, Sukrapee Inzeearj*

Background Cholinesterase enzyme activities are mostly used for pesticide exposure monitoring and they are influenced to individual health, age, sex, anti-cholinesterase inhibitors and genetic variants of cholinesterase enzyme.

Objective This study assessed the relationship between BChE level and in Chiang Mai strawberry farmers.

Method A cross-sectional study was conducted Chiang Mai population. Collected blood samples were determined for BChE activities and BChE genetic variants by using Ellman's and Genest&Kalow spectrophotometric method, respectively. Correlation between BChE level and BChE genetic variants were analyzed by regression analysis.

Results In all 133 farmers (male = 76, female = 57), the mean ($\pm$ SD) level of BChE were 5.201 $\pm$ 2.226 U/ml. Four genetic variants were found as UU (67.6%), UA (17.3%), AF (14.3%) and UF (0.75%) and found statistic significant between enzyme activity and genetic variants at $p < 0.05$.

Conclusion Therefore, the evaluation of pesticide intoxication cases by using cholinesterase level should be also concerned with BChE genetic variants. Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2006; 39: 42-51.

Key words: Cholinesterase enzyme, pesticide

* Research Institute of Health Sciences

บทนำ

เอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส (Cholinesterase enzyme: ChE; E.C. 3.1.1) เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบประสาท และการสื่อสารประสาท มีหลายปัจจัยหลายประการที่มีผลเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ เช่น เพศ อายุ ภาวะ หรือ โรคบางชนิด รวมทั้งการได้รับสารเคมีที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงาน เช่น สารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมต

ดังนั้นการวินิจฉัยผู้ที่ได้รับพิษจากสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในทางพิษวิทยาและนิติเวชศาสตร์ จึงนิยมตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสในน้ำเลือด หรือที่เรียกว่าบิวทิลโคลีนเอสเตอเรส (Butyryl cholinesterase: BuChE; E.C. 3.1.1.8) เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ระดับการสัมผัสสารเคมีกำจัดศัตรูพืช¹

จากค่าปกติของเอนไซม์ BuChE ที่กำหนดในกลุ่มต่างๆ นั้น พบว่าค่าปกติของเอนไซม์มีช่วงค่อนข้างกว้าง

และแตกต่างกันในแต่ละกลุ่ม เช่น ในต่างประเทศกำหนดค่าปกติอยู่ระหว่าง 4,000 ถึง 12,000 U/L² โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่กำหนดให้มีค่าตั้งแต่ 4,300 U/L ขึ้นไป³ ปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อระดับการทำงานของเอนไซม์ที่แตกต่างกันในแต่ละกลุ่ม คือ รูปแปรทางพันธุกรรม ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการกำหนดการสร้างเอนไซม์ให้มีระดับที่แตกต่างกันในแต่ละบุคคล รูปแปรของยีน BuChE ที่พบได้แพร่หลายมี 4 ลักษณะคือ U (Usual), A (Atypical), S (Silent) และ F (Fluoride resistant) gene บางรูปแปรจะกำหนดให้เอนไซม์มีระดับต่ำ เมื่อบุคคลเหล่านี้ได้รับสารเคมีกำจัดศัตรูพืชเพียงเล็กน้อย ก็จะตอบสนองและเกิดอาการแพ้พิษอย่างชัดเจน ในขณะที่รูปแปรอื่นๆ ของยีนกำหนดการสร้างเอนไซม์ที่มีค่าสูง ก็จะไม่แสดงอาการแพ้พิษให้เห็นแม้ว่าจะได้รับในปริมาณสูง

การตรวจหา ยีน BuChE นั้นสามารถตรวจหาได้โดยวิธีทางอนุชีววิทยาและทางเคมีคลินิก ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้วิธีการทางเคมีคลินิกในการตรวจ เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความเหมาะสมที่จะไปใช้งานในภาคสนามและใช้เวลาตรวจน้อย การตรวจด้วยวิธีนี้จะอาศัยหลักการของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ BuChE โดยใช้สาร inhibitor 2 ชนิด ได้แก่ Dibucaine และ Sodium Fluoride ซึ่งจะให้ค่าร้อยละของการยับยั้งการทำงานจาก Dibucaine หรือเรียกว่า Dibucaine Number (DN) และ Fluoride เรียกว่า Fluoride Number (FN) ซึ่งค่า DN และ FN จะมีค่าแตกต่างกันขึ้นอยู่กับรูปแปรทางพันธุกรรม เช่น ถ้ามี UU phenotype จะมีค่า DN อยู่ระหว่าง 71-90 ส่วน UA, AA จะมีค่า DN น้อยกว่า 20 และ 40-70 ตามลำดับ ส่วน AF จะใช้ค่า FN ซึ่งจะมีค่า FN น้อยกว่า 44^{4,5}

ดังนั้นการแปรผลการสัมผัสสารเคมีในผู้ที่มี BuChE ต่ำกว่าปกติควรจะวินิจฉัยควบคู่กับรูปแปรทางพันธุกรรม ซึ่งพบว่ารูปแปรที่มีระดับเอนไซม์สูงสุดได้แก่รูปแปรแบบ UU และน้อยที่สุดสำหรับรูปแปรแบบ SS และ FF นอกจากนี้ยังมีรูปแปรอื่นๆ อีก ซึ่งมีความถี่ที่จะตรวจพบได้น้อย เช่น รูปแปรแบบ J และ K เป็นต้น⁵

การศึกษานี้จึงได้ ออกแบบการศึกษาแบบภาคตัดขวาง (Cross sectional Study) เก็บข้อมูลการใช้การสัมผัสสารเคมีกำจัดศัตรูพืชและพฤติกรรมที่มีความเสี่ยงต่อการได้รับพิษ รวมทั้งเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อนำไป

ตรวจหาระดับการทำงานของเอนไซม์ BuChE และรูปแปรทางพันธุกรรมด้วยวิธีทางเคมีคลินิก

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสกับรูปแปรทางพันธุกรรมด้วยวิธีทางเคมีคลินิก

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแบบ Cross sectional study ได้เลือกศึกษาในกลุ่มประชากรที่อาศัยอยู่ในอำเภอสะเมิง จังหวัดเชียงใหม่ โดยมีเกณฑ์คัดเลือกหลักมีอายุตั้งแต่ 18 ปีขึ้นไป หากอายุต่ำกว่า 18 ปีต้องการเข้าร่วมโครงการจะต้องได้รับการยินยอมจากผู้ปกครองเป็นลายลักษณ์อักษร อาสาสมัครทุกคนมีสุขภาพดี มีความยินดีเข้าร่วมกิจกรรมได้ตลอดโครงการ ยินดีให้ข้อมูลการทำเกษตร การใช้สารเคมี และยินดีให้เก็บตัวอย่างเลือดเพื่อวิเคราะห์หาระดับการทำงานของ BuChE และรูปแปรทางพันธุกรรม โดยอาสาสมัครทุกคนจะได้รับทราบผลการตรวจและคำปรึกษา โดยอาสาสมัครที่ผ่านเกณฑ์จะถูกร้องขอให้ส่งลายมือชื่อในใบยินยอมให้ทำวิจัยได้อาสาสมัครที่มีคุณสมบัติครบตามเกณฑ์จำนวน 133 คน ประกอบด้วยเพศชาย 76 ราย เพศหญิง 57 ราย

วัสดุและวิธีการ

(1) การเก็บข้อมูลด้วยแบบสัมภาษณ์

การวิจัยนี้ได้เก็บรวบรวมข้อมูลในช่วงเดือนพฤศจิกายน ถึง ธันวาคม 2547 โดยข้อมูลที่เก็บด้วยแบบสัมภาษณ์จะแบ่งเป็น 3 ส่วน คือ 1) ข้อมูลทั่วไป 2) ข้อมูลการประกอบอาชีพและการสัมผัสกับสารเคมีกำจัดศัตรูพืช

(2) การเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดในสารกันการแข็งตัวของเลือดชนิด Sodium Heparine ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตรเก็บรักษาในกระติกน้ำแข็งและนำส่งเพื่อวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการพิษวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ต่อไป เมื่อถึงห้องปฏิบัติการจึงนำตัวอย่างเลือดที่เก็บจากอาสาสมัครมาปั่นแยกน้ำเลือด ด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 1,300 rpm นาน 15 นาที แยกส่วนของ

น้ำเลือดเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์

(3) การวิเคราะห์ระดับเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส ในตัวอย่างเลือด

การวัดระดับการทำงานของ BuChE จะใช้วิธีของ Ellman⁶ ซึ่งจะนำตัวอย่างน้ำเลือดเจือจางในน้ำกลั่น อัตราส่วน 1:50 ตูมา 100 ไมโครลิตรเติมลงในสารละลาย 0.5 mM DTNB (5, '5'-dinitro (2-nitrobenzoic acid))

ปริมาตร 3 มิลลิลิตร pH 7.4 ซึ่งเตรียมใน phosphate buffer ความเข้มข้น 5.0 mM แล้วจึงเติม 156 mM Butyrylthiocholine Iodide ในหลอดทดลอง ซึ่งอุ่นที่ 25 องศาเซลเซียส และจับเวลานาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 12 mM Eserine และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร เทียบกับหลอด Blank แล้วนำผลที่ได้มาคำนวณหาระดับการทำงานของเอนไซม์ดังนี้

$$\text{Enzyme Activity} = \frac{Abs_{test} - Abs_{blank}}{\epsilon} \times \frac{TV}{dilution} \times \frac{1}{t}$$

Abs_{test} = Absorbance in test tube

Abs_{blank} = Absorbance in blank tube

ϵ = Extinction Coefficient

TV = Total Volume

$Dilution$ = dilution factor

t = incubation time

(4) การตรวจหารูปแปรทางพันธุกรรม ของ เอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสในตัวอย่างเลือด

วิธี Kalow and Genest⁷ เตรียมการวิเคราะห์ เช่นเดียวกับวิธี Ellman ข้างต้น แต่ให้เพิ่มหลอดสำหรับ หาค่า DN และ FN อย่างละ 2 หลอด โดยก่อนนำไปแช่ใน อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิให้เต็ม 0.3mM dibucaine และ 20mM sodium fluoride ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใน

หลอด DN และ FN ตามลำดับ แล้วจึงนำไปอุ่นในอ่างน้ำ เพื่อวิเคราะห์ตามขั้นตอนข้างต้นต่อไป วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร นำมาคำนวณหาค่าร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ จะได้ค่า DN และค่า FN แล้วจึงนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับตารางต่อไปนี้เพื่อระบุ รูปแปรทางพันธุกรรมของเอนไซม์

ตารางที่ 1 แสดงค่า Dibucaine and Fluoride number ของรูปแปรทางพันธุกรรม

BuChE phenotype	Dibucaine Number (DN)	Fluoride Number (FN)
UU	≥ 77	≥ 55
UF	72-76	≥ 53
UA	48-72	≥ 44
AF	45-59	<44
FF	64-69	<44
AA	>35	-

การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลทั่วไปของเกษตรกร การใช้สารเคมีและพฤติกรรมเสี่ยงจะทำการวิเคราะห์สถิติเชิงพรรณนาเป็นค่าร้อยละ ค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ข้อมูลระดับการทำงานของ BuChE จะวิเคราะห์ในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง เช่น กลุ่มอายุ กลุ่มเพศชายและหญิง กลุ่มเกษตรกรที่ฉีดพ่นด้วยตัวเอง รูปแปรทางพันธุกรรม โดยใช้ independent paired t-test และ Anova นอกจากนี้ยังหาความสัมพันธ์ระหว่างรูปแปรกับระดับการทำงานของ BuChE โดยทดสอบหาค่าความสัมพันธ์และหาสมการเพื่อพยากรณ์ระดับเอนไซม์จาก Regression ตามลำดับ

ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม

การวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้รับคำยินยอมจากอาสาสมัครทุกรายโดยสมัครใจ และมีหนังสือยินยอมลงลายมือชื่อ

พร้อมพยานเพื่อเป็นหลักฐานก่อนการดำเนินการวิจัยเรียบร้อยแล้ว

ผลการศึกษา

ข้อมูลทั่วไปและข้อมูลการสัมผัสกับสารเคมีกำจัดศัตรูพืช

เกษตรกรที่เข้าร่วมโครงการมีจำนวนทั้งหมด 133 คน เป็นเพศชายร้อยละ 57.1 เพศหญิงร้อยละ 42.9 มีอายุระหว่าง 16 ถึง 75 ปี ส่วนใหญ่ประกอบอาชีพเกษตรกร จึงสัมภาษณ์เพิ่มเติมเพื่อเก็บข้อมูลการสัมผัสต่อสารเคมีกำจัดศัตรูพืช พบว่ากลุ่มตัวอย่างร้อยละ 77.4 ทำหน้าที่ผสมสารเคมี และร้อยละ 78.2 ทำหน้าที่ฉีดพ่นสารเคมีกำจัดศัตรูพืช เกษตรกรจะสวมหน้ากาก ถุงมือ รองเท้าบูท หมวก กางเกงขายาว ชะวนทำสวนและฉีดพ่นสารเคมีกำจัดศัตรูพืช มีเพียงร้อยละ 6.0 เท่านั้นที่จะสวมเสื้อกันฝนและแว่นตา

ตารางที่ 2 แสดงข้อมูลทั่วไปของกลุ่มประชากร

ข้อมูลทั่วไป	ร้อยละของประชากร (จำนวนตัวอย่าง)		
	เพศชาย (n=76)	เพศหญิง (n=57)	รวม (n=133)
1. อายุ (ปี)			
น้อยกว่าหรือเท่ากับ 20 ปี	2.2 (3)	0 (0)	2.2 (3)
ตั้งแต่ 21 ถึง 60 ปี	49.2 (66)	41.3 (55)	90.9 (121)
มากกว่าหรือเท่ากับ 60 ปี	5.2 (7)	1.5 (2)	6.7 (9)
2. จำนวนปีที่ทำการเกษตร			
น้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 ปี	39.5 (30)	38.6 (22)	39.1 (52)
ตั้งแต่ 11-20 ปี	46.1 (35)	47.4 (27)	46.6 (62)
ตั้งแต่ 21-30 ปี	11.8 (9)	12.3 (7)	12.0 (16)
ตั้งแต่ 31 ปีขึ้นไป	2.6 (2)	1.8 (1)	2.3 (3)
3. ทำหน้าที่เป็นผู้ฉีดพ่นสารเคมี			
ใช่	86.8 (66)	50.9 (29)	71.4 (95)
ไม่เป็น/ไม่ใช่	13.2 (10)	49.1 (28)	28.6 (38)

ตารางที่ 2 แสดงข้อมูลทั่วไปของกลุ่มประชากร (ต่อ)

ข้อมูลทั่วไป	ร้อยละของประชากร (จำนวนตัวอย่าง)		
	เพศชาย (n=76)	เพศหญิง (n=57)	รวม (n=133)
4. ชนิดของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่ใช้			
สารเคมีกำจัดแมลง	96.1 (73)	94.7 (54)	95.3 (127)
สารเคมีกำจัดวัชพืช	92.1 (70)	86.0 (49)	89.5 (119)
สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา	94.7 (72)	94.7 (54)	94.7 (126)
5. การใช้อุปกรณ์ป้องกันสารเคมี			
หน้ากาก	38.2 (29)	29.8 (17)	34.5 (46)
ถุงมือ	59.2 (45)	54.4 (31)	53.4 (71)
รองเท้าน้ำ	63.2 (48)	54.4 (31)	59.4 (79)
แว่นตา	6.6 (5)	5.3 (3)	6.0 (8)
หมวก	57.9 (44)	50.9 (29)	54.8 (73)
กางเกงขายาว	61.8 (47)	50.9 (29)	57.1 (76)
เสื้อกันฝน	6.6 (5)	5.3 (3)	6.0 (8)

ระดับการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสและ
รูปแบบทางพันธุกรรมในเกษตรกร

ระดับการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสใน
น้ำเลือดของเกษตรกร พบว่ามีค่าเฉลี่ยโดยรวมเท่ากับ
 5.08 ± 2.15 U/ml เมื่อจำแนกกลุ่มของเกษตรกรตามเพศ
อายุ ระยะเวลาทำการเกษตรและหน้าที่ฉีดพ่นสารเคมี
พบว่ามีความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ทำการเกษตรน้อยกว่า
หรือเท่ากับ 10 ปี กับกลุ่มที่ทำการเกษตรระหว่าง 11-20
ปี ที่ $p<0.05$ ส่วนกลุ่มอื่นๆ นั้น ไม่พบว่ามีค่าแตกต่าง
ตามตารางที่ 3 รูปแบบทางพันธุกรรมของเอนไซม์
บิวทิลโคลีนเอสเตอเรสพบว่ามี 4 รูปแบบ คือ UU, UA,

UF และ AF จำนวน 90, 23, 1 และ 19 รายตามลำดับ
โดยรูปแบบที่มีระดับเอนไซม์สูงสุดได้แก่ UF (7.060 U/
ml) ถัดมาเป็น UU (6.389 ± 1.350 U/ml) และ UA (3.465
 ± 1.443 U/ml) รูปแบบที่มีระดับเอนไซม์ต่ำที่สุดได้แก่ AF
มีระดับการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 1.60 ± 0.409
U/ml

เมื่อเปรียบเทียบระดับเอนไซม์บิวทิลโคลีน
เอสเตอเรสในน้ำเลือดกับรูปแบบทางพันธุกรรมของกลุ่ม
ตัวอย่างทั้งหมด กลุ่มที่ฉีดพ่นและไม่ได้ฉีดพ่นสารเคมี
ด้วยตัวเอง พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ
ทางสถิติ ที่ $p<0.01$ ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ทางสถิติของปัจจัยต่างๆ กับระดับการทำงานของเอนไซม์

ปัจจัย	จำนวน (n=133)	BChE Level (U/ml)		
		ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ค่าสถิติ
1. เพศ				0.719 ^{NS}
- ชาย	76	5.320	2.270	
- หญิง	57	5.040	2.177	
2. อายุ				1.968 ^{NS}
- น้อยกว่าหรือเท่ากับ 20 ปี	3	4.655	3.220	
- ตั้งแต่ 21 ถึง 60 ปี	121	5.327	2.176	
- มากกว่าหรือเท่ากับ 60 ปีขึ้นไป	9	3.679	2.280	
3. ปีเพาะปลูก				3.632*
- น้อยกว่า 10 ปี	52	4.465	2.369	
- ตั้งแต่ 11 ถึง 20 ปี	62	5.641	2.066	
- ตั้งแต่ 21 ถึง 30 ปี	16	5.988	1.645	
- ตั้งแต่ 31 ปี ขึ้นไป	3	4.658	2.809	
4. หน้าที่ฉีดพ่นสารเคมี				1.577 ^{NS}
- ใช่	95	5.679	2.235	
- ไม่ใช่/ไม่ใช่คนฉีดพ่นสารเคมี	38	5.009	2.205	

หมายเหตุ NS = Non significant * p value < 0.05

ตารางที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบทางพันธุกรรมกับระดับการทำงานของเอนไซม์

รูปแปรทางพันธุกรรม	จำนวน (n=133)	BChE Level (U/ml)				
		ค่าสูงสุด-ค่าต่ำสุด	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานฐาน	ค่าสถิติ	r
1. ประชากรทั้งหมด					93.419**	0.754
UU	90	3.219-11.33	6.389	1.350		
UA	23	1.289-5.579	3.443	1.363		
UF	1	7.060	7.060	-		
AF	19	0.939-2.408	1.600	0.409		
2. ทำหน้าที่ฉีดพ่นสารเคมี					69.710**	0.751
UU	62	3.219-9.680	6.244	1.310		
UA	16	1.460-5.579	3.465	1.443		
UF	1	7.060	7.060	-		
AF	16	0.939-2.408	1.640	0.420		
3. ไม่ใช้/ไม่ได้ทำหน้าที่ฉีดพ่นสารเคมี					33.680**	0.748
UU	28	3.617-11.33	6.711	1.405		
UA	7	1.289-4.503	3.394	1.268		
UF	-	-	-	-		
AF	3	1.057-1.700	1.386	0.321		

หมายเหตุ ** p value < 0.01

อภิปรายและสรุปผล

ลักษณะของเกษตรกรอาสาสมัครในโครงการพบว่ามีความคล้ายคลึงกัน เมื่อทดสอบทางสถิติด้วย Unpaired t-test ไม่พบความแตกต่างของ อายุ ระยะเวลาการทำงาน เกษตร พื้นที่และปริมาณของสารเคมีที่ใช้ ระหว่างกลุ่มเพศชายและหญิง ซึ่งมีอยู่ร้อยละ 57.1 และ 42.9 ตามลำดับ

สำหรับเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสพบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่าง เพศ อายุ และหน้าที่ในการฉีดพ่นสารเคมี แต่พบว่าเกษตรกรที่ทำการเกษตรมาแล้ว 11-20 ปี มีระดับเอนไซม์สูงกว่ากลุ่มที่ทำการเกษตรน้อยกว่า 10 ปี อย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ เพราะเกษตรกรที่ทำมานานเกินกว่า 10 ปีนั้นมักจะขยายพื้นที่ทำการเกษตรเพิ่มขึ้น มีแรงงานในไร่เพิ่มขึ้น จึงไม่ได้ทำหน้าที่ฉีดพ่นสารเคมีหรือดูแลด้วยตนเอง โอกาสที่จะเสี่ยงต่อการสัมผัสสารเคมีจะน้อยลงกว่ากลุ่มที่เริ่มทำการเกษตรใหม่ ระดับเอนไซม์ที่ตรวจได้เมื่อเปรียบเทียบกับรูปแบบทางพันธุกรรม ซึ่งพบว่ามี 4 รูปแบบในกลุ่มประชากรนี้คือ UU, UA, UF และ AF โดยพบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.01$ เมื่อจำแนกตามกลุ่มที่ฉีดพ่นสารเคมี ก็พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.01$ โดยจะสังเกตเห็นว่ารูปแบบที่พบมากที่สุดคือ UU มีถึงร้อยละ 67.6 ซึ่งเป็นรูปแบบที่มีระดับเอนไซม์อยู่ในช่วง 3.22-11.33 U/ml มีค่ามัธยฐานเท่ากับ 6.414 U/ml หากเกษตรกรกลุ่มดังกล่าวสัมผัสกับสารเคมีกำจัดศัตรูพืชแล้ว อาจจะพบว่าระดับที่ลดลงนั้นยังอยู่ในเกณฑ์ปกติ ในขณะที่กลุ่มที่มีรูปแบบ AF จะมีระดับเอนไซม์ต่ำมากคืออยู่ในช่วง 0.939-2.408 U/ml มีค่ามัธยฐาน 1.568 U/ml จัดว่าอยู่ในเกณฑ์ที่มีความเสี่ยงสูงต่อการได้รับพิษ เมื่อพิจารณาในกลุ่มฉีดพ่นสารเคมีจะมีระดับเอนไซม์จะพบว่ารูปแบบ AF (0.939-2.408 U/ml) มีระดับเอนไซม์ใกล้เคียงกับกลุ่มที่ได้ฉีดพ่นสารเคมี (1.057-1.700 U/ml) ดังนั้นจะเห็นได้ว่ากรณีวินิจฉัยเพียงการวัดระดับเอนไซม์นั้นอาจจะไม่เพียงพอที่จะระบุระดับการได้รับพิษจากสารเคมีกำจัดศัตรูพืช หากมีการวัดรูปแบบทางพันธุกรรมร่วมด้วยจะเป็นประโยชน์ยิ่งขึ้น

วิจารณ์ผล

ปัจจัยที่มีผลต่อระดับการทำงานของเอนไซม์บิวทิลโคลีนเอสเตอเรส มีหลายประการ เช่น ปัจจัยของเพศและอายุ โดยเพศชายจะมีระดับเอนไซม์สูงกว่าเพศหญิง แต่เมื่ออายุเกินกว่า 60 ปีแล้วจะไม่พบความแตกต่างระหว่างเพศ^{8,9} และหญิงที่รับประทานยาคุมกำเนิดจะมีระดับเอนไซม์ต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ทานยา^{8,9} ในผู้สูงอายุและเด็กเล็กจะมีระดับเอนไซม์ต่ำกว่ากลุ่มอื่นๆ⁹ นอกจากนี้ยังพบว่าโรคและภาวะบางอย่างมีผลรบกวนต่อระดับการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส เช่น ภาวะขาดสารอาหาร โรคทูปโภชนาการ โลหิตจาง ซึ่งจะมีระดับต่ำลง^{10,11} ผู้ป่วยโรคตับก็จะมีระดับเอนไซม์ต่ำเช่นกัน^{11,12} มีการศึกษาอื่นๆ ที่หาความสัมพันธ์ของรูปแบบทางพันธุกรรม โดยเฉพาะ Silent gene (S genotype) ซึ่งมักพบร่วมกับโรคอื่น เช่น โรคไขมันในเลือดสูง (hyperlipidemia) และ Nephrotic Syndrome¹³ แต่ปัจจุบันพบว่ามีเอนไซม์อีกชนิดหนึ่งที่สัมพันธ์ต่อระดับเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสและภาวะโรคต่างๆ คือ เอนไซม์พาราออกซอนเนส¹⁴

อย่างไรก็ตามการติดตามระดับเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสในอาสาสมัคร ควรจะมีการเก็บข้อมูลการเจ็บป่วยที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ เช่น โรคประจำตัว ยาที่รับประทานเป็นประจำ และปัจจัยต่างๆ ร่วมด้วย เพื่อช่วยในการแปลผล การศึกษานี้ได้เก็บข้อมูลการเจ็บป่วย และอาการที่อาจจะเกิดจากการแพ้พิษจากสารเคมีกำจัดศัตรูพืชร่วมด้วย แต่พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กัน เมื่อเปรียบเทียบลักษณะของกลุ่มประชากรมีลักษณะที่คล้ายคลึงกันทั้งกลุ่ม แต่ปัจจัยที่พบว่าทำให้กลุ่มประชากรมีความแตกต่างกันของระดับเอนไซม์คือปัจจัยทางพันธุกรรม โดยพบว่าความถี่ของยีนแต่ละรูปแบบพบได้มากน้อยต่างกันตามเชื้อชาติ เช่น Fluoride variant มี frequency เท่ากับ 0.0021 ในชาวอะลาสกา Atypical gene พบได้น้อยในชาวตะวันออกบางเชื้อชาติ อาจพบเพียง 1 ใน 25 ล้านคน ความถี่เท่ากับ 0.0002⁵ การศึกษาใน Trinidad พบว่าประชากรมีรูปแบบ UU ร้อยละ 98.5 รูปแบบ UA ร้อยละ 1.5¹⁵ เช่นเดียวกับการศึกษานี้ที่ประชากรส่วนใหญ่มีรูปแบบ UU มากกว่าแบบอื่นๆ

ข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นเพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างยีนและระดับการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส อย่างไรก็ตามการตรวจหาการแปรของเอนไซม์ควรจะวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา (Molecular Biology) เพราะการวัดระดับเอนไซม์ด้วยวิธีทางเคมีคลินิกด้วยการหาค่า DN และ FN นั้นมีข้อเสียหากเอนไซม์ของบุคคลนั้นถูกยับยั้งด้วยสารอื่นๆ เช่น Sarin¹⁶, Soman¹⁷, Tabun¹⁸ และสารอื่นๆ ที่เป็น Irreversible inhibitor มาก่อนแล้วจะไม่สามารถทราบได้ว่าค่า DN หรือ FN ที่แท้จริงเท่ากับเท่าใด ทำให้การระบุชนิดของรูปแบบทางพันธุกรรมอาจจะผิดพลาดหรือคลาดเคลื่อนไปได้ สำหรับการตรวจหาการแปรของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสด้วยเทคนิคอณูชีววิทยามีกระบวนการที่ซับซ้อนกว่าวิธีทางเคมีคลินิก อาจจะไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในภาคสนาม อย่างไรก็ตามการตรวจหาระดับเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสก็เป็นวิธีการที่ทำได้อย่างสะดวกรวดเร็ว แต่การแปลผลต้องคำนึงถึงภาวะและโรคต่างๆ ของอาสาสมัคร รวมทั้งรูปแบบทางพันธุกรรมด้วย ซึ่งจะช่วยลดความผิดพลาดในการวินิจฉัยระดับการแพ้พิษได้มากยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ได้สนับสนุนทุนการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. World Health Organization Metabolism and mode of action. Organophosphorus Insecticides: a General Introduction. WHO. Geneva; 1986. p. 39-48.
2. Moss DW and Henderson AR. Tietz. Textbook of Clinical Chemistry. 2 nd ed. New York: Burtis CA, & Ashwood ER(eds); 1994. p. 735-896.
3. Pongraveevongsa P. and Ruangyuttikarn W. Measurement of Serum Cholinesterase level in Normal Thai People. Chiang Mai Medical Bull 2000; 39 (1-2): 21-29.
4. Davis L., Britten J.J. and Morgan M. Cholinesterase: Its significance in anaesthetic practice. Anaesthesia 1997; 52: 244-60.
5. Kalow W. Genetic Variants of Human Serum Cholinesterase Influence Metabolism of the Muscle Relaxant Succinylcholine. Paramac Ther 1990; 47: 35-60.
6. Ellman G.L., Courtacy D., Andres V. Jr. and Featherstone R.M. A new and rapid colormetric determination of Acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol 1961; 7: 88-95.
7. Kalow W. and Genest K. A method for the detection of atypical forms of human serum cholinesterase. Determination of dibucaine numbers. Can J. Biochem Physiol 1957; 35: 339-46.
8. Nielson J.B. and Anderson H.R. Cholinesterase Activity in Female Greenhouse Workers Influence of Work Practise and Use of Oral Contraceptives 2002; 44: 234-39.
9. Sidell F. R. and Kaminskis A. Influence of Age, Sex and Oral Contraceptives on Human Blood Cholinesterase Activity. Clin Chem 1975; 21(10): 1393-395.
10. Mitache J., Passweg J.R., Libura J. and et.al. Anemia: an Indicator for Malnutrition in the Elderly. Ann Hematol 2001; 80: 295-98.
11. Goodal R. Cholinesterase heterogeneity: pharmacogenetic models and clinical implications. Curr Anesth&Critical Care 2004; 15: 29-35.
12. Wilson A., Calvert R.J. and Geoghegan H. Plasma Cholinesterase Activity in Liver Disease: Its value as a Diagnostic Test of Liver Function Compared with Flocculation Test and Plasma Protein Determinations. 1952. J Clin Invest 1952; September 31(9): 815-23.
13. Honda K., Yumura W., Arai J. and et.al. Hereditary Serum Cholinesterase Deficiency

- Associated with Severe Lipid Deposition in the Kidney. Intern Med 1993; February 32(2): 145-51.
14. Sogorb M. A. and Vilanova E. Enzymes Involved in the Detoxification of Organophosphate, Carbamate and Pyrethroid Insecticides Through Hydrolysis 2002; 128: 215-28.
 15. Pinto Pereira L.M., Clement Y. and Telang B.V. Distribution of Cholinesterase Activity in the Population of Trinidad. Can J. Physiol Pharmacol 1996; 74: 286-89.
 16. United States Senate, 103d Congress, 2d Session.1994. "Material Safety Data Sheet : Lethal Nerve Agents Sarin". (online). 25 May. Available [http://www.gulfweb.org/bigdoc/report / appgd.html/](http://www.gulfweb.org/bigdoc/report/appgd.html/) (November 6, 2004)
 17. United States Senate, 103d Congress, 2d Session.1994. "Material Safety Data Sheet : Lethal Nerve Agents Somain". (online). 25 May. Available [http://www.gulfweb.org/bigdoc/ report /appgd.html/](http://www.gulfweb.org/bigdoc/report/appgd.html/) (November 6, 2004)
 18. United States Senate, 103d Congress, 2d Session.1994. "Material Safety Data Sheet : Lethal Nerve Agents Tabun". (online). 25 May. Available [http://www.gulfweb.org/bigdoc/report / appgd.html/](http://www.gulfweb.org/bigdoc/report/appgd.html/) (November 6, 2004)

นิพนธ์ต้นฉบับ

อุบัติการณ์การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ (Atypical pneumonia) ในผู้ป่วยโรงพยาบาลนครพิงค์ จังหวัดเชียงใหม่

เจียรนัย ชันติพงศ์ *, วิรุทธ วัฒนสุกุลชัย **

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาอุบัติการณ์การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ (Atypical pneumonia) โดยการตรวจหาเชื้อ *Influenza A Virus / Influenza B Virus, Mycoplasma pneumoniae, Resp. Syncytial Virus (RSV)* และพัฒนาเทคโนโลยีสำหรับการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการให้เหมาะสม

วัสดุและวิธีการ ตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ (Atypical pneumonia) ในเสมหะผู้ป่วยที่คัดเลือกโดยแพทย์โรงพยาบาลนครพิงค์ว่าเป็น Pneumonia (โรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ หรือโรคปอดบวมจากการติดเชื้อ) ทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธี ELISA antigen จำนวน 31 ราย

ผลการศึกษา จากการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการโดยการตรวจหาเชื้อในเสมหะด้วยวิธี ELISA antigen ในผู้ป่วยจำนวน 31 รายจากผู้ป่วยที่รับบริการ ณ งานตรวจพิเศษ กลุ่มงานอายุรกรรม (โรคทางเดินหายใจ) โรงพยาบาลนครพิงค์ ที่มีลักษณะอาการทางคลินิกบ่งชี้ว่ามีการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ (Pneumonia) ในช่วงเดือนเมษายน 2546 – มีนาคม 2547 พบว่ามีการติดเชื้อ *Influenza A Virus* จำนวน 2 ราย (6.4%) *Mycoplasma pneumoniae* 1 ราย (3.2%) *Resp. Syncytial Virus* 3 ราย (9.6%) ส่วน *Influenza B Virus* ได้ผลเป็น negative result รวมทั้งสิ้นมีผู้ป่วย Atypical pneumonia 6 ราย จากผู้ป่วย 31 ราย (19.3%) การตรวจเสมหะด้วยวิธี ELISA antigen เป็นวิธีการที่ทำได้ง่าย ใช้เวลาสั้น และราคาถูก จึงน่าจะนำมาใช้ในการตรวจทางห้องปฏิบัติการทั่วไปได้ เสมหะที่นำมาตรวจควรเป็นเสมหะที่ได้จากการไอออกมาจากปอด และมีลักษณะ purulent และไม่ควรถูกเก็บเสมหะไว้นานเกินกว่า 24 ชั่วโมง ควรเก็บไว้ในตู้เย็นภายใน 5 วันหรือ ที่อุณหภูมิ -20°C หากต้องการเก็บไว้นานกว่านั้น

สรุป Atypical pneumonia เป็นโรคปอดบวมที่เกิดจากการติดเชื้อที่ไม่ได้พบบ่อยๆ เหมือนปอดบวมทั่วไปไม่สามารถใช้วิธีการหรือประสบการณ์ในการรักษาแบบโรคปอดบวมธรรมดามาใช้ได้ มีอาการโรคปอดบวมที่ไม่รุนแรงมาก แต่ก็สามารถเป็นสาเหตุของการตายจากโรคได้เหมือนกัน การพัฒนาเทคโนโลยีและการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการมีความสำคัญสามารถช่วยในการตัดสินใจในการรับผู้ป่วยไว้รักษาในโรงพยาบาล และการเลือกจ่ายยาปฏิชีวนะที่เหมาะสม วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2549; 39: 52-59.

คำสำคัญ: การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ, เชื้อ *Influenza A Virus / Influenza B Virus, Mycoplasma pneumoniae, Resp. Syncytial Virus (RSV)*, การพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

* สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 เชียงใหม่

** โรงพยาบาลนครพิงค์ อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่

Abstract: The Incidence of Atypical Pneumonia Infection in Patients of Nakornping Hospital

Jiaranai Khantipongse*, Veerayut Khositsakulchai**

Objective: To study the incidence of atypical pneumonia infection detected for *Influenza A Virus / Influenza B Virus*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Resp. Syncytial Virus* (RSV) and to develop technology of the method in laboratories.

Material and method: Sputum of 31 symptomatic patients with pneumonia were detected for atypical pneumonia infection by ELISA antigen method.

Result: The incidence of atypical pneumonia infection in 31 symptomatic patients with pneumonia of Nakornping Hospital detected by ELISA antigen during April 2003 – March 2004, was 6 cases (19.3%). We found that the infection rate from *Influenza A Virus*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Resp. Syncytial Virus* (RSV) were 2 cases (6.4%), 1 case (3.2%), 3 cases (9.6%) respectively and *Influenza B Virus* was not found. The detection of sputum by ELISA antigen was easy, used no long time and not expensive so it's probably to use this method in laboratories.

Conclusion: Atypical pneumonia is pneumonia that infected from microorganism which not like common pneumonia. So we cannot use the same experience or treatment that we use for cure common pneumonia. The clinical of atypical pneumonia in patients is not severe but sometimes it's become to mortality. The development of technology and method for detect atypical pneumonia in laboratories is very important and help for the way to decide of treatment. *Bull Chiang Mai Assoc Sci* 2006; 39: 52-59.

Key words: Atypical pneumonia, *Influenza A Virus / Influenza B Virus*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Resp. Syncytial Virus* (RSV), develop technology of the method in laboratories

* Department of prevent and control disease region 10

** Nakornping Hospital, Maerim, Chiangmai

บทนำ

การแพร่ระบาดของเชื้อโรคที่ปนมากับอากาศและเข้าสู่ระบบทางเดินหายใจเป็นสิ่งที่ควบคุมลำบากประชาชนทั่วไปได้รับเชื้อง่าย บางคนที่มีภูมิคุ้มกันต่ำจะสามารถเป็นโรคได้ง่ายและแพร่เชื้อต่อกลุ่มเดียวกัน

และผู้อื่นต่อไปอีก เช่น ผู้ติดเชื้อ HIV ผู้ป่วยเบาหวาน เด็ก ผู้สูงอายุ เชื้อโรคที่เป็นสาเหตุของระบบทางเดินหายใจ มีหลายชนิดส่วนใหญ่สามารถทราบจากห้องปฏิบัติการทั่วไปที่เป็นเชื้อรา และแบคทีเรีย แต่ยังมีเชื้อชนิดอื่นเช่น ริกเก็ตเซีย (*Rickettsiae*) ที่ก่อให้เกิดกลุ่มโรค typhus,

bronchiolitis, croup, pharyngitis เชื้อเหล่านี้ติดต่อได้ทั้งคนสู่คน สัตว์สู่คน (Zoonosis) และอาศัยพาหะพวกหมัด เหา ไร หรือมูลสัตว์ ยิ่งทำให้ยากต่อการควบคุมป้องกัน Pneumonia (โรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ หรือโรคปอดบวมจากการติดเชื้อ) เป็นโรคที่มีความสำคัญโรคหนึ่งเพราะว่าเป็นโรคที่พบได้บ่อยมีอาการที่สำคัญคือเป็นไข้ ไอ หายใจลำบาก หอบ พบลักษณะปอดอักเสบหรือมีลักษณะของ Respiratory Distress Syndrome มีเสียงปอดผิดปกติ (เช่น crackles, bronchial breath sound) หรือมี nonspecific symptoms เช่น อ่อนเพลีย ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ คลื่นไส้ปวดท้อง และปวดศีรษะ เป็นต้น ซึ่งผู้ป่วยไม่จำเป็นต้องมีอาการหรืออาการแสดงครบทุกอาการ ร่วมกับมีความผิดปกติของภาพรังสีทรวงอก ที่มีลักษณะเข้าได้กับโรคปอดบวมที่เกิดขึ้นใหม่ เมื่อผู้ป่วยได้รับการรักษาที่ไม่เหมาะสมอาจเกิดโรคแทรกซ้อนตลอดจนถึงเสียชีวิตได้ ในปี พ.ศ. 2538 มีการพยากรณ์อัตราป่วยของโรคปอดบวมของประเทศไทยไว้เท่ากับ 182 รายต่อประชากร 100,000 คน

ในปัจจุบันมีข้อมูลเพิ่มเติมที่น่าสนใจ โดยเฉพาะที่เกี่ยวข้องกับเชื้อที่เป็นสาเหตุ คือ มีการพบเชื้อใหม่ ได้แก่ เชื้อ *Chlamydia (C) pneumoniae*, *Influenza A Virus / Influenza B Virus*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Resp. Syncytial Virus (RSV)* ในสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยทางระบบทางเดินหายใจและเชื้อที่เป็นสาเหตุเดิมแต่กลับมาเป็นปัญหาเพิ่มมากขึ้นในปัจจุบันจากการดื้อยาที่เพิ่มมากขึ้น คือ *Streptococcus (S) pneumoniae* ได้มีการวางแผนทางการรักษาโรคปอดบวมขึ้น ซึ่งให้ความสำคัญต่อการแบ่งผู้ป่วยออกเป็นกลุ่มต่างๆ ตามความรุนแรงของโรค เพื่อช่วยในการตัดสินใจในการรับผู้ป่วยไว้รักษาในโรงพยาบาล และการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะที่เหมาะสม นอกจากนี้ยังพบผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้นในประเทศไทย ซึ่งมีผลให้ผู้ป่วยเกิดการติดเชื้อที่ปอดเกิดโรคปอดบวมมากขึ้น ทำให้การรักษาและสืบค้นสาเหตุทำได้ลำบาก

สถานการณ์ของโรคในพื้นที่ภาคเหนือตอนบนที่มีอุบัติการณ์การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจจากเชื้อ *Influenza A Virus / Influenza B Virus*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Resp. Syncytial Virus (RSV)* ยังขาด

ฐานข้อมูลเพราะการวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการยังมีไม่มาก ปัจจุบันเทคโนโลยีด้าน Immunology ได้พัฒนาขึ้นมาก จึงน่าจะมีวิธีการที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ตรวจสอบได้ บทบาทสำคัญของสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 จึงน่าจะพัฒนาและประยุกต์องค์ความรู้นี้โดยร่วมมือกับโรงพยาบาลนครพิงค์ดำเนินการต่อไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาอุบัติการณ์การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ (Atypical pneumonia) โดยการตรวจหาเชื้อ *Influenza A Virus / Influenza B Virus*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Resp. Syncytial Virus (RSV)* ด้วยวิธี ELISA antigen
2. พัฒนาเทคโนโลยีสำหรับการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการให้เหมาะสม

ประโยชน์ที่จะได้รับ

1. ทราบสถานการณ์และข้อมูลพื้นฐานเพื่อใช้ประโยชน์ในการวางแผนควบคุมป้องกันโรค
2. ก่อให้เกิดความร่วมมือระหว่างหน่วยงาน
3. ผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยและการรักษาที่ถูกต้อง
4. ประยุกต์องค์ความรู้และเทคโนโลยีที่เหมาะสม

ระเบียบวิธีวิจัย

ตัวอย่างทดสอบ

เก็บเสมหะจากผู้ป่วย ที่มีลักษณะบ่งชี้ว่ามีการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ (Atypical pneumoniae) จากผู้ป่วยที่รับบริการ ณ งานตรวจพิเศษ กลุ่มงานอายุรกรรม (โรคทางเดินหายใจ) โรงพยาบาลนครพิงค์ อ.แมริม จ.เชียงใหม่ ทั้งหมดจำนวน 31 ตัวอย่าง ลงในตลับเก็บเสมหะเก็บในตู้เย็น และส่งยังกลุ่มงานชันสูตรกลางเพื่อการป้องกันควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 เชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ ภายใน 16-24 ชั่วโมง

วิธีการ

1. การตรวจพิสูจน์ชนิดของเชื้อ

นำสิ่งส่งตรวจมาทำการตรวจวินิจฉัยหาเชื้อ Influenza A Virus / Influenza B Virus, Mycoplasma pneumoniae, Resp. Syncytial Virus (RSV) ด้วยวิธี ELISA antigen

2. การเตรียมสิ่งส่งตรวจ

นำเสมหะมาเจือจางด้วย specimen buffer ในอัตราส่วน 1:1 mix ให้เข้ากัน incubate ที่อุณหภูมิห้อง overnight นำไปปั่น 5 นาทีเพื่อให้ตกตะกอนนำส่วน supernatant มาใช้สำหรับการตรวจด้วยวิธี ELISA antigen จำนวน 150 ul

3. การเตรียมชุดทดสอบ

- Controles ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ml และ specimen buffer 1 ml
- Conjugate เจือจางด้วย conjugate buffer ในอัตราส่วน 1:50
- TMB substrate solution , ready to use
- Washing solution เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:20

4. การตรวจหาเชื้อ Influenza A Virus / Influenza B Virus, Mycoplasma pneumoniae, Resp. Syncytial Virus (RSV) ด้วยวิธี ELISA (SERION ELISA antigen)

นำชุดทดสอบออกจากตู้เย็นรอให้อุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง
pipette samples (supernatant) and controls (150 ul) ลงในหลุมของ microtest strips



INCUBATION 60 Min./37 °C moist chamber



WASH



เติม diluted conjugate solution (100 ul) ลงทุกหลุม ยกเว้น substrate blank



INCUBATION 30 Min./37 °C moist chamber



WASH



เติม TMB – substrate solution (100ul) ทุกหลุม



INCUBATION 20 Min./18-25 °C ในที่มืด



เติม stopping solution (100 ul) ทุกหลุม



อ่านค่า OPTICAL DENSITY ที่ 450 nm

5. การอ่านผล (Evaluation SERION ELISA antigen)

E(NC): หมายถึง ค่าเฉลี่ยของ negative control

Positive result	measured value of the specimens:
Influenza A Virus / Influenza B Virus	$> E (NC) + 0.25$
Mycoplasma pneumoniae	
Resp. Syncytial Virus	$> E (NC) + 0.4$

Borderline result	measured value of the specimens:
Influenza A Virus / Influenza B Virus	from $E (NC) + 0.15$ to $E(NC) + 0.25$
Mycoplasma pneumoniae	
Resp. Syncytial Virus	from $E (NC) + 0.25$ to $E(NC) + 0.4$

Negative result	measured value of the specimens:
Influenza A Virus / Influenza B Virus	$< E (NC) + 0.15$
Mycoplasma pneumoniae	
Resp. Syncytial Virus	$< E (NC) + 0.25$

6. การแปลผล (Interpretation of results) positive test results แสดงว่ามี protein concentration ของ specific pathogen $> 6 \text{ ng / ml}$ และบ่งชี้ถึง ภาวะ acute infections. การแปลผลที่ได้จะประกอบ ควบคู่ไปกับ ลักษณะอาการทางคลินิก negative test results อาจเป็นผลมาจาก stage of infection ขณะที่เก็บ sample, การเตรียม, การเก็บ sample แต่ไม่ใช่หมายถึงการติดเชื้อ acute infection ออกไป

ผลการศึกษา

เมื่อทำการคัดเลือกผู้ป่วยที่มาใช้บริการ ณ งานตรวจพิเศษ กลุ่มงานอายุรกรรม (โรคทางเดินหายใจ) โรงพยาบาลนครพิงค์ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น pneumonia จำนวนทั้งสิ้น 31 คน แล้วทำการเก็บเสมหะผู้ป่วย ตั้งแต่เดือนมิถุนายน จนถึงเดือนธันวาคม 2546 นำสิ่งส่งตรวจที่ได้ส่งมาเก็บรวบรวมไว้ที่กลุ่มงานชั้นสูตรกลาง สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 เชียงใหม่ ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรอทำการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธี ELISA antigen ต่อไปในการทดลองครั้งนี้ ได้ผลการทดสอบตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงผลการทดสอบหาเชื้อ Influenza A Virus / Influenza B Virus, Mycoplasma pneumoniae, Resp.Syncytial Virus ด้วยวิธี ELISA antigen

ลำดับ ผู้ป่วย/ เพศ	อายุ	Influenza A Virus	Influenza B Virus	Mycoplasma pneumoniae	Resp.Syncytial Virus	ลักษณะอาการ ทางคลินิก/ การวินิจฉัย
1 หญิง	21	Negative result	Negative result	Negative result	Negative result	pneumonia
2 ชาย	57	Negative result	Negative result	Negative result	Negative result	ไอ ไม่มีไข้
3 ชาย	29	Negative result	Negative result	Negative result	Negative result	ไอหอบเหนื่อย,HIV positive/pneumonia
4 หญิง	64	Negative result	Negative result	Negative result	Negative result	หายใจเหนื่อย หอบ/COPD
5 หญิง	76	Negative result	Negative result	Negative result	Negative result	หายใจเหนื่อยหอบ ไข้ ไอ /pneumonia
6 ชาย	24	Negative result	Negative result	Positive result	Negative result	ไข้ ไอ หายใจ เหนื่อยหอบ
7 หญิง	82	Positive result	Negative result	Negative result	Negative result	ไข้สูง ไอ หายใจเหนื่อย /pneumonia LLL
8 หญิง	90	Negative result	Negative result	Negative result	Negative result	หายใจเหนื่อยเจ็บอก /COPD, pneumonia
9 ชาย	66	Positive result	Negative result	Negative result	Negative result	ไอ/pneumonia
10 หญิง	39	Negative result	Negative result	Negative result	Negative result	
11 หญิง	70	Negative result	Negative result	Negative result	Negative result	เหนื่อย/RML pneumonia
12 ชาย	69	Negative result	Negative result	Negative result	Negative result	ไอ หายใจเหนื่อย/ COPD, pneumonia
13 ชาย	74	Negative result	Negative result	Negative result	Negative result	ไอ หายใจหอบเหนื่อย / COPD, pneumonia
14 ชาย	40	Negative result	Negative result	Negative result	Negative result	ไข้ หอบเหนื่อย/pneu- monia
15 ชาย	80	Negative result	Negative result	Negative result	Negative result	ไอ เจ็บหน้าอก เหนื่อย/ Bronchitis
16 หญิง	77	Negative result	Negative result	Negative result	Negative result	
17 ชาย	74	Negative result	Negative result	Negative result	Positive result	
18 ชาย	76	Negative result	Negative result	Negative result	Negative result	ไอ หอบ/ Pneumonia
19 หญิง	24	Negative result	Negative result	Negative result	Positive result	ไข้ ไอ หายใจ เหนื่อย/ pneumonia
20 หญิง	55	Negative result	Negative result	Negative result	Negative result	ไข้ ไอ เจ็บหน้าอก CA lung, pneumonia
21 หญิง	47	Negative result	Negative result	Negative result	Negative result	หายใจเร็ว pneumonia
22 หญิง	90	Negative result	Negative result	Negative result	Negative result	เจ็บคอ/pneumonia
23 หญิง	29	Negative result	Negative result	Negative result	Negative result	
24 ชาย	74	Negative result	Negative result	Negative result	Positive result	เจ็บหัว ไอ หอบ/ RLL pneumonia
25 หญิง	64	Negative result	Negative result	Negative result	Negative result	
26 หญิง	27	Negative result	Negative result	Negative result	Negative result	ไข้ ไอ
27 หญิง	76	Negative result	Negative result	Negative result	Negative result	ไอ เหนื่อย/ pneumonia
28 หญิง	23	Negative result	Negative result	Negative result	Negative result	
29 หญิง	53	Negative result	Negative result	Negative result	Negative result	หายใจเหนื่อย ไอ/COPD
30 หญิง		Negative result	Negative result	Negative result	Negative result	
31 ชาย		Negative result	Negative result	Negative result	Negative result	

บทวิจารณ์

การดูแลรักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคปอดบวมจากการติดเชื้อนั้นขึ้นอยู่กับ อาการแสดง โรคเดิมของผู้ป่วย ตลอดจนการใช้การตรวจเพิ่มเติมทางห้องปฏิบัติการเบื้องต้น จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาประเมินความรุนแรงของโรค เพื่อพิจารณาการรักษา การรับผู้ป่วยไว้ในโรงพยาบาล การเลือกยาปฏิชีวนะ และการสืบค้นเพิ่มเติมต่อไป การศึกษาหรือเก็บข้อมูลทางด้านระบาดวิทยาเชื่อว่าเป็นสาเหตุของโรคในแต่ละพื้นที่ของประเทศเป็นสิ่งสำคัญ เพราะมีผลต่อการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะ หลังจากที่ผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยว่าเกิดจากเชื้ออะไรได้แน่นอนแล้ว Atypical pneumonia เป็นโรคปอดบวมที่ต้องอาศัยผลการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ ช่วยยืนยัน ไม่สามารถนำวิธีการหรือประสบการณ์ในการรักษาแบบโรคปอดบวมธรรมดามาใช้ได้ ดังนั้นผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการจึงต้องมีความแม่นยำเพราะมีความสำคัญต่อการวินิจฉัยโรคของแพทย์เป็นอย่างมากแม้ว่าวิธีการตรวจด้วยวิธี ELISA antigen มีความจำเพาะและความไวสูง (sensitivity 81% Specificity 94%) แต่ในการตรวจวินิจฉัยครั้งนี้ยังขาดวิธีการตรวจยืนยัน (gold standard) ที่จะใช้ในการเปรียบเทียบอ้างอิง ผลการทดลองให้มีความน่าเชื่อถือยิ่งขึ้น เนื่องจากมีข้อจำกัดในเรื่องของงบประมาณที่ใช้ ทำให้การศึกษานี้เป็นการศึกษานำร่อง ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติมต่อไป

นอกจากนี้ยังมีข้อควรระวังในการปฏิบัติงาน ควรสวมเครื่องป้องกัน เช่น ใส่แว่น หน้ากาก ถุงมือ และเสื้อกาวน์ทุกครั้ง เมื่อคาดว่าจะสัมผัส สิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วย ทำความสะอาดพื้นที่ทำงาน และสิ่งแวดล้อมที่เป็นสิ่งส่งตรวจอย่างถูกวิธี

เอกสารอ้างอิง

1. Bartlett JG, Dowell SF, Mandell LA, File Jr, TM, Musher DM, and Fine MJ. Practice Guidelines for the Management of Community-Acquired pneumonia in Adult. Clin Infect Dis 2003; 31: 347-82.
2. Kleemola, M., Raty, R., Karjalainen, J., Schuy, W., Gerstenecker, B., Jacobs, E. Evaluation of an Antigen-Capture Enzyme Immunoassay for Rapid Diagnosis of Mycoplasma pneumoniae Infection Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12, 872-875, 1993.
3. Doller, G., Doller, P, C., Jacobs, E., Schuy, W. Zur Differentialdiagnostik von infektionen des Respiratinsttrakts Diagnose & Labor 43, 21-33, 1993.
4. Working Group of the South African Thoracic Society. Clinical guidelines: Management of community-acquired pneumonias in adults. S Afr Med J 2002; 92(8): 647-55.
5. Working Groups of the South African Pulmonology Society and the Antibiotic Study Group of South Africa. Clinical guidelines: Management of community-acquired pneumonias in adults. S Afr Med J 1996; 86: 1152-63.
6. Vallen-Mashikian MA, Menenghetti A. Community-Acquired Pneumonia In Goldstein RH, O'Connell JJ, Karlinsky JB. A Practical Approach to Pulmonary Medicine. 1st Edition. Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia, 1998: 85-128.
7. Levison ME. Pneumonia. In: Fauci AS, et al. Harrison's Principles of Internal Medicine. 14th Edition. The McGraw-Hill Companies, Inc.: New York, 1998: 1437-45.
8. Bartlett JG, Dowell SF, Mandell LA, File Jr, TM, Musher DM, and Fine MJ. Practice Guidelines for the Management of Community-Acquired pneumonia in Adult. Clin Infect Dis 2003; 31: 347-82
9. http://www.abbott.co.th/pharma_edu/pneumonia_outside_hospital.htm
10. Kleemola, M., Raty, R., Karjalainen, J., Schuy, W., Gerstenecker, B., Jacobs, E. Evaluation of an Antigen-Capture Enzyme Immunoassay for Rapid Diagnosis of Mycoplasma pneumoniae Infection Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12,

872-875, 1993

11. Doller, G., Doller, P, C., Jacobs, E., Schuy, W. Zur Differentialdiagnostik von infektionen des Respiratinsttrakts Diagnose & Labor 43,

21-33,1993

12. ลลิตา ชีระสิริ. ปอดบวม ปอดอักเสบ หรือนิวโมเนีย. หมอชาวบ้าน. 7(มีนาคม 2529); 24-26.

นิพนธ์ต้นฉบับ**Abstract : The cytotoxic effect of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin purified from Turmeric powder on leukemic cell lines****Songyot Anuchapreeda^a, Wittawat Sadjapong^a, Chadarat Duangrat^b, and Pornngarm Limtrakul^c**

Curcuminoids, major active components of the food flavor turmeric (*Curcuma longa* Linn.); consist of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin that exhibit anticarcinogenic properties *in vivo*. This study was aimed to investigate the effect of curcuminoids on the cytotoxicity of the leukemic cells, HL60 (human promyeloid leukemia), U937 (human monocytic leukemia) and K562 (human erythroid leukemia). In this experiment, three major natural curcuminoids, pure curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin, isolated from turmeric powder, were compared for cytotoxicity on leukemic cell lines by MTT assay and trypan blue exclusion method. The result showed that all three curcuminoids exhibited an excellent cytotoxic activity on leukemic cell lines with the inhibitory concentration at 50% (IC_{50}) approximately 7 μ g/mL in HL60 and U937 and 20 μ g/mL in K562 cell line. Demethoxycurcumin seem to be the most effective in all leukemic cell lines. The inhibitory effect of three forms of curcuminoids was not statistically different in each leukemic cell line. These results indicate that three major forms of curcuminoids affect the cell viability in all leukemic cell lines by MTT assay and Trypan blue exclusion method. Thus curcuminoid treatment may provide a guideline for molecular study and clinical treatment in leukemic patients in future. Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2006; 39: 60-71.

Key words: Curcumin; Demethoxycurcumin; Bisdemethoxycurcumin; Leukemic cell lines

^a Department of Clinical Microscopy, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand,

^b Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand,

^c Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

1. Introduction

Cancer is one of the major health concerns in the world today. An estimated 6 million new cases are diagnosed each year worldwide.¹ Cancer is a main cause of death in Thailand.² Almost half of the new cases of cancer are diagnosed early enough to be treated with surgery or radiotherapy. In the remaining cases, however, the cancer has metastasized and must be treated with chemotherapy. Chemotherapy can effectively cure several cancers, such as leukemia, lymphomas, choriocarcinoma, and testicular cancers. Chemotherapy can improve the long-term survival for patients with breast cancer, the most common malignancy in women.

Herbs were used as drugs, spices, and a few types were used for food element in daily life: for example, turmeric, ginger and pepper. These herbs show various biological activities, such as anti-inflammatory, anti-mutagen, strong antioxidant, anti-thrombotic action, antimicrobial action, antiparasitic action and oncogene expression inhibitor. One of the pharmacologically safe compounds that inhibit the proliferation of tumor cells and have a potential to be used as anticancer agents, is a group of

turmeric curcuminoids.

Curcumin (diferuloyl methane), a phenolic compound believed to be the main pharmacological agent in turmeric, possesses antioxidant activity *in vitro*,³⁻⁶ and is used in lipid peroxidation tests.⁷⁻⁹ Curcumin is effective in preventing and ameliorating gastric lesion. It also possesses anti-inflammatory,^{10,11} antibacterial,¹²⁻¹⁴ anti-fungal and anti-yeast,¹⁵ antihypocholesterolemic,^{6, 17} anticancer [18-23], antimutagen,^{24, 25} antiparasitic [26], antitumor-promoting²⁷ antiproliferative,²⁸ MDR modulator effect,²⁹⁻³¹ etc.

Curcuminoids are composed of three major compounds: curcumin, demethoxycurcumin (curcumin II) and bisdemethoxycurcumin (curcumin III). These 3 major pigments can absorb the visible light at the wave length between 420-425 nm.

The structures of the three main curcuminoids isolated from turmeric powder are shown in Figure 1. Commercial grade curcuminoids (such as Sigma-Aldrich) when isolated from the powdered dry rhizome of *Curcuma longa* Linn contains approximately 77% curcumin, 17% demethoxycurcumin and 3% bisdemethoxycurcumin.

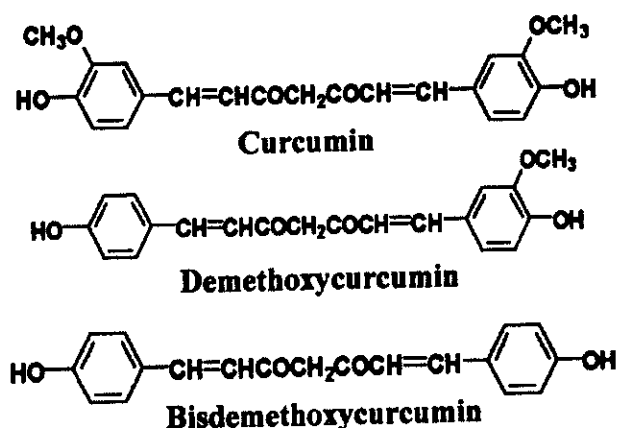


Fig. 1 Chemical structures of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin

The safety of *Curcuma longa* and its derivatives has been studied in various animal models.³² It is clear that turmeric is not toxic to animals even at high doses. A single feeding of a 30 percent turmeric diet to rats did not produce any toxic effects. In a 24 h acute toxicity study, mice were fed turmeric extract at daily dosages of 0.5, 1.0 and 3.0 g/kg. There was no increase in mortality rate when compared to the respective controls. A 90-day feeding of turmeric extract resulted in no significant weight gain.³³

Studies of the effect of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin and tetrahydrocurcumin on TPA induced tumor promotion have found that pure curcumin and demethoxycurcumin had an equally potent inhibitory effect on TPA induced increases in tumor promotion in DMBA-initiated mouse skin. Bisdemethoxycurcumin and tetrahydrocurcumin were less active.³⁴

The cytotoxicity of curcumin was examined in cancer cell lines; Hep-2 (human larynx), PC-9 and PC-14 (human lung cancers), Hep-1 (mouse hepatoma) and F-25 (mutate H-ras transfected NIH mouse fibroblast) by MTT assay. It was found that curcumin is a potent antiproliferative agent for several cancer cell lines.³⁵

Cytotoxicity evaluation *in vitro* is usually made by using cell viability assays, such as the uptake of a dye by dead cells after breakdown of the cellular permeability barrier (ex. Trypan blue, eosin Y, etc.) or mitochondrial function (ex. MTT or XTT assay), but other parameters, such as changes in cell morphology under microscopic examination, have also been used as indicators of compound toxicity. In this experiment, we determine the cytotoxicity of curcuminoids by MTT assay and trypan blue exclusion method. This study showed which curcuminoids exhibited the most effect in leukemic cell lines. The reduction of MTT ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,

5-diphenyl tetrazolium bromide]) in the cell assesses the functional intactness of mitochondria based on the enzymatic reduction of the tetrazolium salt by the mitochondrial dehydrogenase in viable cells. MTT is probably the most commonly used colorimetric indicator of cell viability and it has been used to evaluate cytotoxicity in a quantitative way in contrast with cell morphology evaluation by inverted light microscopy which is qualitative and more subjective.

2. Materials and methods

2.1 Chemicals

Silica gel 60 and petroleum ether was purchased from Merck. An MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) and trypan blue dye were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). RPMI 1640, Penicillin-Streptomycin, Fetal bovine serum and L-glutamine were purchased from Invitrogen™ Life Technology (Carlsbad, CA, USA).

2.2 Extraction and isolation of curcuminoids

Chiang Mai turmeric powder (1 Kg) was successively extracted with hexane (2.5 L) and 95% ethanol (7.5 L) at room temperature. Turmeric curcuminoids were then precipitated with petroleum ether yielding 50 g crude curcuminoid mixtures (78% curcumin, 16% demethoxycurcumin and 5% bisdemethoxycurcumin). The crude curcuminoids (3 g) were further fractionated by Silica gel 60 column chromatography (44 X 1.6 cm) using first CHCl_3 and followed by $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ with increasing polarity. Fractions containing curcumin (1.11 g) were eluted with 100% CHCl_3 (0.6 L). Fractions containing demethoxycurcumin (200 mg) and

bisdemethoxycurcumin (40 mg) were further eluted with $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (98:2, 0.8 L) and $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (95:5, 1 L), respectively.^{30, 31} The purity of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin by HPLC analysis was 100%. These curcuminoids were used in the experiments described here.

2.3. Cell culture conditions

The erythroid leukemic cell line (K562) was a generous gift from Dr. Chaisuree Supawilai (Research Institute for Health Sciences, Chiang Mai, Thailand). Human promyeloid leukemia (HL60) was a generous gift from Dr. Rattana Bunjertpongchai (Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University) and human monocytic leukemia (U937) was a generous gift from Dr. Watchara Kasinrek (Department of Immunology, Faculty of Associated Medical Science). These leukemic cell lines were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 1 mM L-glutamine, 100 units/mL penicillin and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin, 10% inactivated FCS, and adjusted to pH 7.2 by the addition of 15 mM HEPES. All cell lines were maintained in a humidified incubator with an atmosphere of 95% air and 5% CO_2 at 37°C.

2.4 Determination of cell viability

Cell viability was determined by MTT test method and confirmed by trypan blue exclusion test [36]. MTT (5 mg/mL) was dissolved in PBS. The solution is filtered through a 0.2 μm filter and stored at 2–8°C for frequent use. Cells were cultured in 96-well plates ($3.0 \times 10^4/\text{well}$) containing 100 μL medium, before curcuminoid treatment at 37°C for 24 hrs. After 24 hrs, the cultured medium was added with 100 μL fresh medium containing various con-

centrations of curcuminoids (curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin), and incubated for another 24 hrs. Diluted curcuminoid solutions were freshly prepared in DMSO prior to each experiment. The metabolic activity of each well was determined by the 3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and compared with those in untreated cells. After removal of 100 μL medium, MTT dye solution was added (15 $\mu\text{L}/100 \mu\text{L}$ medium) and the plates were incubated at 37°C for 4 hours in humidified 5% CO_2 atmosphere. After 4 hours, the solvent (DMSO), 100 μL , was added to each well, mixed thoroughly to dissolve the dye crystals and the absorbance was measured using an ELISA plate reader (Biotek EL 311) at 570 nm with a reference wavelength of 630 nm. High optical density readings correspond to a high intensity of dye color, i.e., to a high number of viable cells able to metabolize MTT salts. The fractional absorbance was calculated by the following formula:

$$\% \text{ Cell survival} = \frac{\text{Mean absorbance in test wells}}{\text{Mean absorbance in control wells}} \times 100$$

Trypan blue exclusion method [36] is a typical method to measure the cell viability. The intact membrane of viable cells excludes the trypan blue dye. Trypan blue enters dead cells whose membrane becomes permeable. Trypan blue assay was used to evaluate cell viability as described previously.³⁷ This microscopic assay for cell death was carried out by assessing the ability of live cells to exclude trypan blue dye. A 50 μL aliquot of the cells, after curcuminoid treatment as described by MTT assay, was stained with 50 μL of 0.2% trypan blue and cells were monitored under a light microscope (40X magnification). Stained cells were considered to be no longer viable.

2.5. Statistical analysis

Data were the mean $\pm$ standard deviation of mean from triplicate samples of three independent experiments. Differences between the means were analyzed by one-way ANOVA analysis of variance. Statistical significance was considered when $P < 0.05$.

3. Results

The crude curcuminoids were separated into three components by silica gel 60 column chroma-

tography. In order to further confirm the purity of curcuminoids, HPLC was employed. The standard curcuminoids (Sigma-Aldrich) showed three peaks, with the retention time of 7.087, 8.115 and 9.275 min corresponding to curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin, respectively. This was verified by subjecting purified curcuminoids to HPLC analysis and curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin eluted at 7.072, 8.128 and 9.258, respectively. The purity of each curcuminoid was 100% (Fig. 2).

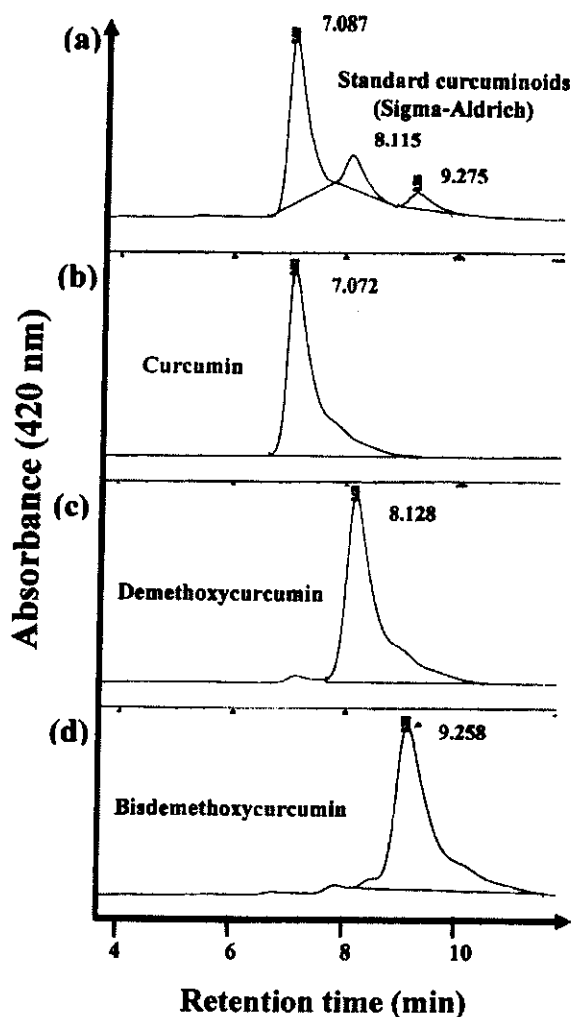


Fig. 2 The HPLC elution profile of pure curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. The HPLC histogram of standard curcuminoids (Sigma-Aldrich), pure curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin as depicted in panels (a), (b), (c) and (d), respectively.

Curcuminoids have been reported to contain anti-carcinogen against human cancer cells. The activity has usually been reported on the basis of curcuminoid mixture (curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin). Thus, previous results did not show which forms of curcuminoids caused the maximum activity in cancer cells, especially in leukemic cell lines. The cytotoxic effects of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin at various concentrations (0-50%) on HL60 cell line for 24 h by MTT assay was shown in Fig. 1. All

curcuminoids are capable of inhibiting cell growth of HL60. The IC_{50} of demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin and curcumin were $9.8 \pm 1.30 \mu\text{g/mL}$, $10.3 \pm 1.73 \mu\text{g/mL}$ and $11.2 \pm 1.23 \mu\text{g/mL}$, respectively (Fig. 3a and 3c). Three curcuminoids did not show different inhibitory effect. These results were supported by using trypan blue exclusion method which has shown that the IC_{50} of demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin and curcumin were $3.2 \pm 0.12 \mu\text{g/mL}$, $3.5 \pm 0.52 \mu\text{g/mL}$ and $4.2 \pm 0.5 \mu\text{g/mL}$, respectively (Fig. 3b and 3c).

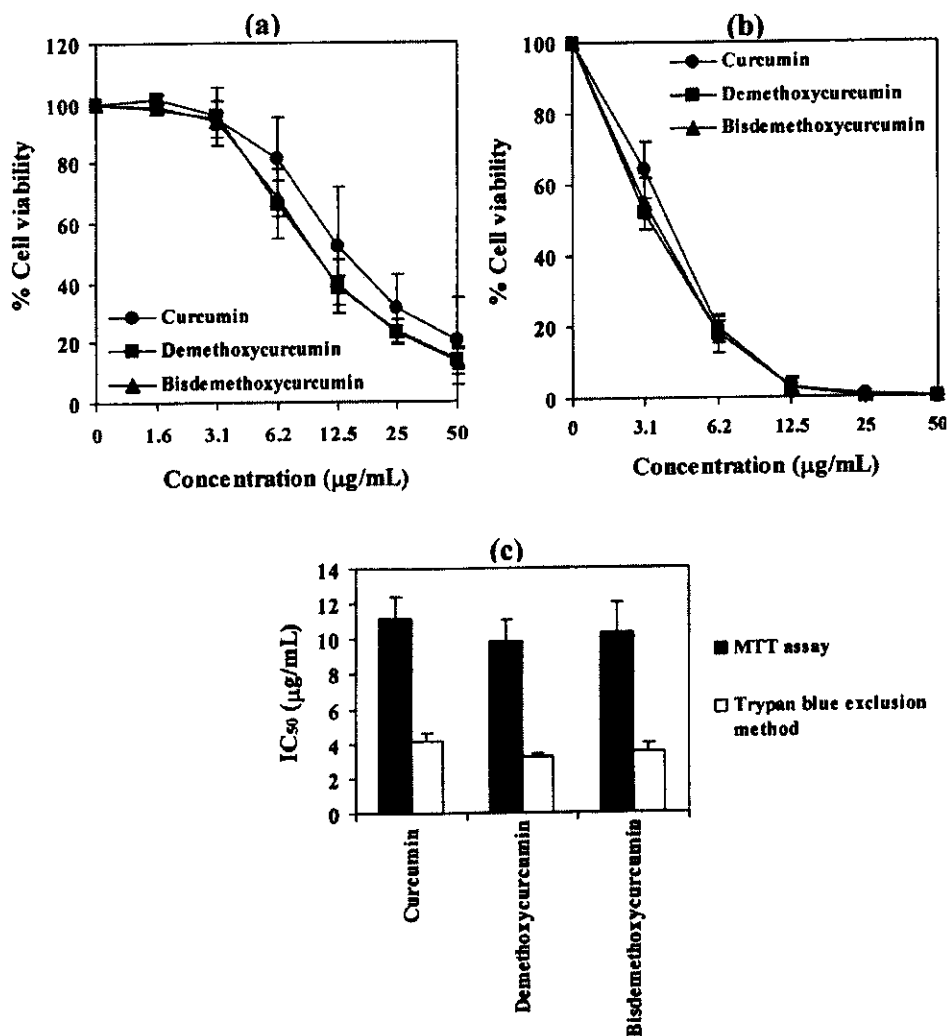


Fig. 3 Effect of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin on HL60 cell line. Cells were grown in the presence of various concentrations of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. The number of viable cells was determined by MTT assay (a) in triplicate, trypan blue exclusion method (b). IC_{50} values in three independent experiment of MTT assay and trypan blue exclusion method were plot for the comparison (c).

The cytotoxic effect of curcuminoids on U937 cell line by MTT assay demonstrated that the IC_{50} of demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin and curcumin were $7.0 \pm 1.34 \mu\text{g/mL}$, $8.6 \pm 0.70 \mu\text{g/mL}$ and $8.7 \pm 0.97 \mu\text{g/mL}$, respectively (Fig. 4a and 4c). In this case, three curcuminoids did not show

different significant cytotoxic effect. These results were supported by using trypan blue exclusion method which the IC_{50} of demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin and curcumin were $5.5 \pm 1.41 \mu\text{g/mL}$, $6.7 \pm 0.24 \mu\text{g/mL}$ and $8.2 \pm 0.48 \mu\text{g/mL}$, respectively (Fig. 4b and 4c).

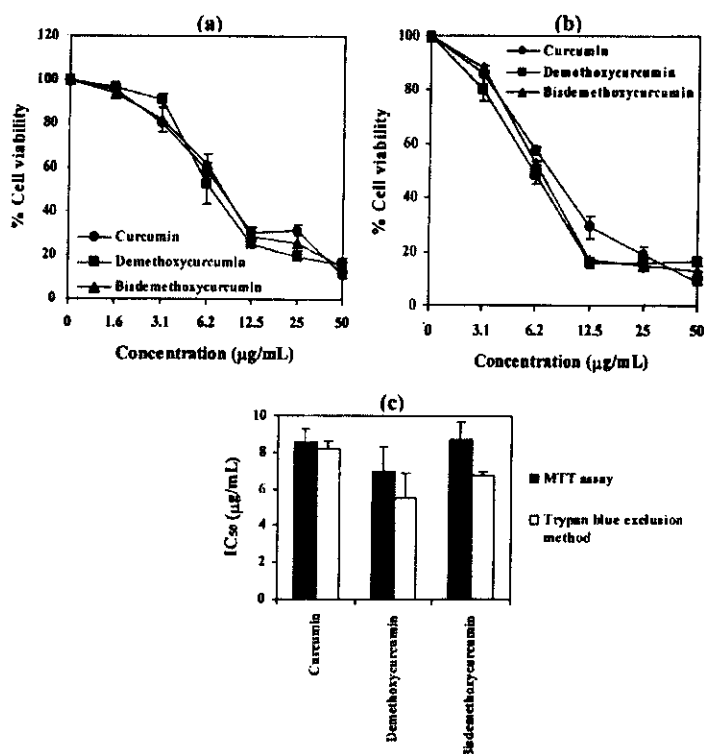


Fig. 4 Effect of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin on U937 cell line. Cells were grown in the presence of various concentrations of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. The number of viable cells was determined by MTT assay (a) in triplicate, trypan blue exclusion method (b). IC_{50} values in three independent experiment of MTT assay and trypan blue exclusion method were plot for the comparison (c).

The concentration of curcuminoids that caused the cytotoxic effect in K562 cell line was higher than that in HL60 and U937 ($0-100 \mu\text{g/mL}$). After curcuminoid treatment for 24 hrs and determined by MTT assay, it was found that the IC_{50} of demethoxycurcumin was $21.7 \pm 2.14 \mu\text{g/mL}$, followed by curcumin and bisdemethoxycurcumin at $25.9 \pm 8.67 \mu\text{g/mL}$ and $27.4 \pm 5.8 \mu\text{g/mL}$, respectively (Fig. 5a and 5c). These three curcuminoids did not show any

different cytotoxic effect. However, the IC_{50} for cell cytotoxicity by trypan blue exclusion method were $14.1 \pm 0.63 \mu\text{g/mL}$, $23.4 \pm 0.81 \mu\text{g/mL}$ and $27.3 \pm 1.13 \mu\text{g/mL}$ for demethoxycurcumin, curcumin and bisdemethoxycurcumin, respectively (Fig 5b and 5c). By trypan blue exclusion method, demethoxycurcumin significantly inhibited in growth of K562 cell line as compared to curcumin and bisdemethoxycurcumin by 40% and 48%, respectively ($P < 0.05$) (Fig. 5c).

However, the overview of the cytotoxic effect result showed that all three ingredients of curcuminoids exhibited an excellent cytotoxic

activity on leukemic cell lines with the inhibitory concentration at 50% (IC_{50}) approximately 7 $\mu\text{g/mL}$ in HL60 and U937 and 20 $\mu\text{g/mL}$ in K562 cell line.

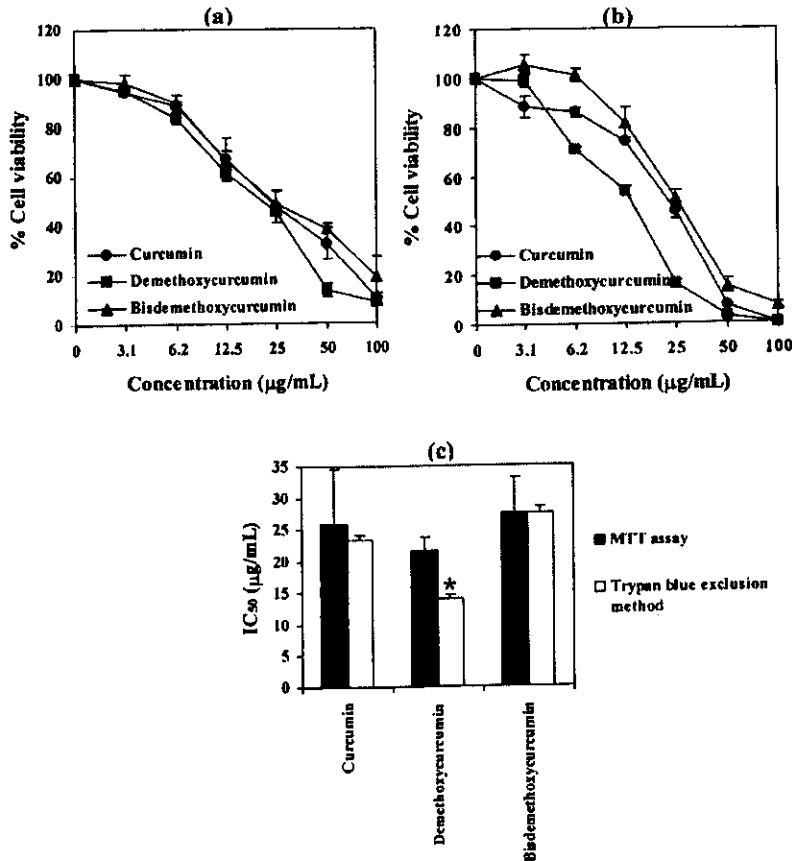


Fig. 5 Effect of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin on K562 cell line. Cells were grown in the presence of various concentrations of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. The number of viable cells was determined by MTT assay (a) in triplicate, trypan blue exclusion method (b). IC_{50} values in three independent experiment of MTT assay and trypan blue exclusion method were plot for the comparison (c). Key: (*) significantly different from curcumin and bisdemethoxycurcumin ($P < 0.05$).

4. Discussion

Our previous study indicated that curcumin (Sigma-Aldrich), a natural plant phenolic compound, exhibited anti-carcinogenic activities *in vitro* [35] and *in vivo* [18]. Since curcuminoids are non-toxic, non-mutagenic and non-carcinogenic, fraction of these compounds that can inhibit the proliferation of tumor cells have potential as anticancer agents. In the

present studies we demonstrated the cytotoxic effect of curcuminoids against leukemic cell lines, HL60, U937 and K562. The cytotoxic effect was monitored by MTT assay and trypan blue exclusion method. The principle of the MTT assay is to measure mitochondria enzyme activities of viable cells. The viable cells convert the tetrazolium component of the dye solution into a formazan crystal product. The

formazan product was solubilized by an organic solvent, and the violet color solution was determined by the absorbance at 570 nm. The 570 nm absorbance reading is directly proportional to number of viable cells.

The trypan blue exclusion method is the classical and the most widely accepted method and used for differentiating living and dead cells in culture. The intact membrane of viable cell excludes the trypan blue dye. These methods can be used for both proliferation and complement-mediated cytotoxicity assays. Cell viable test by trypan blue dye exclusion method is more suitable to cells grown in suspension than the monolayers because dead cells can detach from monolayers and therefore be lost from the assay.

Although the cytotoxicity of curcuminoid mixture (the commercial curcuminoid mixture which is usually sold as "curcumin" is a mixture of the three curcuminoids) has been previously reported, the cytotoxic effect of the individual compound had not been investigated. The results obtained from this study have show that curcuminoids exhibited the most effect in leukemic cell lines. All curcuminoids showed cytotoxic effect on all leukemic cell lines, with demethoxycurcumin appeared to be the most cytotoxic fraction. However, the effect of demethoxycurcumin on K562, which was determined by trypan blue assay, showed the significant difference from curcumin and bisdemethoxycurcumin.

The results obtained from MTT and trypan blue assay showed similar degree of cell cytotoxicity after curcuminoids treatment. The trypan blue test is reliable and correlates well with the MTT assay. Nevertheless, the IC_{50} values of both methods were not absolutely the same, which may due to the fact that different parts of the cell were examined. MTT

assay is used to investigate tumor cell viability. This assay involves mitochondria succinate dehydrogenase enzyme found in metabolically active cell. On the other hand, trypan blue involves the intact membrane of viable cell. This study, MTT assay exhibited higher IC_{50} values than trypan blue exclusion method. It was possible that some dead cells still contained the mitochondria enzyme inside but the cell permeability was lost.

The results of the present study are in agreement with other reports on the inhibitory action of commercial curcumin (Sigma-Aldrich) on cell growth and proliferation. The growth inhibitory effect of curcumin against several cancer cell lines; breast tumor cell line [38], Hep-2, PC-9, PC-14, Hep-1 and F-25 [35] were reported. It has been reported that curcumin reduced the proliferation rate of HT-29 and HCT-15 human colon cancer cell lines *in vitro* mainly by accumulating cells in the G2/M phase [39], the proliferation of cell cycle progression of human umbilical vein endothelial cell [40] and the proliferation of human promyelocytic leukemia HL60 cells [41]. But curcumin showed no significant effect on inhibiting proliferation or inducing apoptosis on human PBMC [42]. Thus curcuminoid treatment may provide a guideline for molecular study and clinical treatment in leukemic patients in future.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Thailand Research Fund (TRF), the Commission of Higher Education, and Chiang Mai University Endowment Fund. We gratefully acknowledge Dr. Floyd W Dunn, Dr. Roongsiri Chotpadiwetkul, and Mr. Singkome Tima for their excellent help.

References

- [1] Georg GL., Chen TT., Ojima I., and Vyas DM. Taxane anticancer agents: basic science and current status. American Chemical Society: Washington DC, 1995.
- [2] Sriplung H, Sontipong S, Martin N, Wiangnon S, Vootipong V, Cheirsilpa A, Kanchanabat C, Khuhaprema T: Cancer in Thailand. Bangkok; Medical Publisher: Bangkok, 2003; Vol. 3, Chapter II pp 7-69.
- [3] Kunchandy E, Rao MNA. Oxygen radical scavenging activity of curcumin. Int J Pharm. 1990; 58:237-40.
- [4] Saudamini KK, Kuttan R. Inhibition of chemical carcinogenesis by curcumin. J Ethnopharmacol 1989; 27: 227-33.
- [5] Kuo ML, Huang TS, Lin JK. Curcumin, an antioxidant and antitumor promoter, induces apoptosis in human leukemia cells. Biochim Biophys Acta 1996; 1317: 95-100.
- [6] Selvam R, Subramanian L, Gayathri R, Angayarkanni N. The antioxidant activity of turmeric (*Curcuma longa*). J Ethnopharmacol 1995; 47(2): 59-67.
- [7] Sreejayan, Rao, MNA, Curcuminoids as potent inhibitors of lipid peroxidation. J Pharm Pharmacol 1994; 46: 1013-16.
- [8] Salimath BP, Sundaresh CS, Srinivas L. Dietary components inhibit lipid peroxidation in erythrocyte membrane. Nutr Res 1989; 6: 1171-178.
- [9] Asai A, Nakagawa K, Miyazawa T. Antioxidative effects of turmeric, rosemary and capsicum extracts on membrane phospholipid peroxidation and liver lipid metabolism in mice. Biosci Biotechnol Biochem 1999; 63: 2118-122.
- [10] Huang HC, Jan TR, Yeh SF. Inhibitory effect of curcumin, an anti-inflammatory agent, on vascular smooth muscle cell proliferation. Eur J Pharmacol 1992; 221 (2-3): 381-84.
- [11] Ammon HP, Safayhi H, Mack T, Sabieraj J. Mechanism of anti-inflammatory actions of curcumin and boswellic acids. J Ethnopharmacol 1993; 38: 113-19.
- [12] Banerjee A, Nigam SS. Antimicrobial efficacy of the essential oil of *Curcuma longa*. Indian J Med Res 1978; 68: 864-66.
- [13] Fitzpatrick F. Plant substances active against *Mycobacterium tuberculosis*. Antibiot Chemother 1954; 4: 528-36.
- [14] Shankar TNB, Murthy VS. Effect of turmeric (*Curcuma longa*) on the growth of some intestinal bacteria in vitro. J Food Sci Technol 1978; 15(4): 152-53.
- [15] Sawada T, Yamahara J, Shimazu S, Ohta T. Evaluation of crude drugs by bioassay. III. Comparison local variation of contents and the fungistatic action of the essential oil from the root of *Curcuma longa*. Shoyakugaku Zasshi 1971; 25 (1): 11-16.
- [16] Rao DS, Kekhara NC, Satyanarayana MN, Srinivasan M. Effect of curcumin on serum and liver cholesterol levels in the rat. J Nutr 1970; 100: 1307-15.
- [17] Patil TN, Srinivasan M. Hypocholesteremic effect of curcumin in induced hypercholesteremic rats. Indian J Exp Biol 1971; 9(2): 167-69.
- [18] Limtrakul P., Lipigorngoson S., Namwong O., Apisariyakul A., Dunn FW. Inhibitory effect of dietary curcumin on skin carcinogenesis in mice. Cancer Lett 1997; 116: 197-203.
- [19] Limtrakul P., Anuchapreeda S., Lipigorngoson S., Dunn FW. Inhibition of carcinogen induced c-Ha-ras and c-fos proto-oncogenes expression by dietary curcumin. BMC Cancer 2001; 1: 1-7.
- [20] Rao CV, Rivenson A, Simi B, Reddy BS.

- Chemoprevention of colon cancer by dietary curcumin. *Ann NY Acad Sci* 1995; 768:201-4.
- [21] Ruby AJ, Kuttan G, Babu KD, Rajasekharan KN, Kuttan R. Anti-tumor and antioxidant activity of natural curcuminoids. *Cancer Lett* 1995; 94 (1): 79-83.
- [22] Singh SV, Hu X, Srivastava SK, Sigh M, Xia H, Orchard JL, Zaren HA. Mechanism of inhibition of benzo[a]pyrene-induced forestomach cancer in mice by dietary curcumin. *Carcinogenesis* 1998; 19: 1357-60.
- [23] Mohan R, Ashton P, Russo LA, Pham BQ, Kasahara N, Raizman MB, Fini ME. Curcuminoid inhibit the angiogenic response stimulated by fibroblast growth factor-2, inducing expression of matrix metalloproteinase gelatinase B. *J Biol Chem* 1998; 275:10405-412.
- [24] Nagabhushan M, Amonkar AJ, Bhide SV. In vitro antimutagenicity of curcumin against environmental mutagens. *Food Chem Toxicol* 1987; 25: 545-47.
- [25] Posada K, Raghuram TC, Krishma TP, et al. Effect of turmeric on urinary mutagens in smokers. *Mutagenesis* 1992; 7(2): 107-9.
- [26] Roy RG, Madesayaa NM, Ghosh RB, et al. Study on inhalation therapy and indigenous compound on *P. vivax* and *P. falciparum* infections; a preliminary communication. *Indian J Med Res* 1976; 64(10): 1451-455.
- [27] Azuine MA, Bhide SV. Chemopreventive effect of turmeric against stomach and skin tumors induced by chemical carcinogens in swiss mice. *Nutr Cancer* 1992; 17(1): 77-83.
- [28] Dorai T, Cao YC, Buttyan R, Katz AE. Therapeutic potential of curcumin in human postate cancer III. Curcumin inhibits proliferation induces apoptosis and inhibits angiogenesis of LNCaP prostate cancer cells *in vivo*. *Prostate* 2001; 47(4): 293-303.
- [29] Anuchapreeda S, Muangmoonchai R, Limtrakul P. Effect of curcuminoids on *MDR1* gene promoter activity in human cervical carcinoma cells. *Chiang Mai Med Bull* 2002; 41(4):189-202.
- [30] Limtrakul P, Anuchapreeda S, Bhudsuk D. Modulation of human multidrug-resistance *MDR-1* gene by natural curcuminoids. *BMC Cancer* 2004; 4(13): 1-6.
- [31] Chearwae W, Anuchapreeda S, Nandigama K, Ambudkar S, Limtrakul P. Biochemical mechanism of modulation of human P-glycoprotein (ABCB1) function by curcuminoids purified from Turmeric powder. *Biochem pharmacol* 2004; 68: 2043-52.
- [32] Rao DS., Sekhara NC., Satyanarayana MN., Srinivasan M. Effect of curcumin on serum and liver cholesterol levels in the rat. *J Nutr* 1970; 100: 1307-315.
- [33] Shankar TN., Shantha NV., Ramesh HP. Murthy IA and Murthy VS, Toxicity studies on Turmeric: acute toxicity studies in rats, guinea pigs and monkeys. *Indian J Exp Biol.* 1980; 18: 73-5.
- [34] Huang MT, Ma W, Lu YP, Chang RL, Fisher C., Manchand PS., Newmark HL, Conney AH. Effect of curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin and tetrahydrocurcumin on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion. *Carcinogenesis* 1995; 16: 2493-497.
- [35] Limtrakul P, Chearwae W, Anuchapreeda S, The effect of curcumin on the proliferation of cancer cell lines. *Chiang Mai Med Bull* 1999; 38: 55-61.
- [36] Kaltenbach JP, Kaltenbach MH, Lyons WB. Nigrosin as a dye for differentiating live and dead ascites cells. *Exp Cell Res* 1958; 15:112-17.
- [37] Algan O, Stobbe CC, Helt AM, Hanks GE,

- Chapman JD. Radiation inactivation of human prostate cancer cells: the role of apoptosis. *Radiat Res* 1996; 146: 267-75.
- [38] Metha K, Pantazis P, McQueen T, Agarwal BB. Antiproliferative effect of curcumin (diferuloyl methane) against human breast tumor cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 233: 692-96.
- [39] Hanif R, Qiao L, Shiff SJ, Rigas B. Curcumin, a natural plant phenolic food additive inhibits cell proliferation and induces cell cycle changes in colon adenocarcinoma cell lines by a prostaglandin-independent pathway. *J Lab Clin Med* 1997; 130: 576-84.
- [40] Singh AK, Sidhu GS, Deepa T, Maheshwari RK. Curcumin inhibits the proliferation and cell cycle progression of human umbilical vein endothelial cell. *Cancer Lett* 1996; 107: 109-15.
- [41] Liu Y, Chang RL, Cui XX, Newmark HL, Conney AH. Synergistic effects of curcumin on all-trans retinoic acid-and 1 alpha' 25-dihydroxyvitamin D3-induced differentiation in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Oncol Res* 1997; 9: 19-29.
- [42] Sun CY, Liu XY, Chen Y, Liu F, Wang Y. Experimental study on anticancer effect of curcumin on Raji cells in vitro. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*. 2004; 24: 1003-6.

นิพนธ์ต้นฉบับ**การติดเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ในจังหวัดน่าน
(1 ตุลาคม พ.ศ. 2540 - 30 กันยายน พ.ศ. 2548)**

เดช อมรทิพย์วงศ์ * ไพบุลย์ ทนไชย * เอนก คำพันธ์ * พวงมณี จิตดวงค์พันธ์ *

บทคัดย่อ

การศึกษาการติดเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ในผู้ป่วยที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลน่าน จังหวัดน่านและโรงพยาบาลชุมชนในพื้นที่จังหวัดน่าน ระหว่าง วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2540 ถึง 30 กันยายน พ.ศ. 2548 จากตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยโรคท้องร่วงจำนวน 28,625 ราย ผลการตรวจพบที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียจำนวน 1,432 ราย เชื้อที่พบมากที่สุดคือ *V. parahaemolyticus* จำนวน 709 ราย (49.5%) ซึ่งเป็นการตรวจพบเชื้อได้มากตั้งแต่เดือนเมษายนถึงเดือนตุลาคม การติดเชื้อสูงสุดอยู่ในเดือนกรกฎาคม กลุ่มอายุที่ติดเชื้อมากที่สุดเป็นช่วงอายุ 31-45 ปี พบในเพศชาย 355 ราย เพศหญิง 354 ราย การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ พบว่าเชื้อมีความไวสูงต่อยา Norfloxacin ร้อยละ 100 มีความไวต่อยา Co-trimoxazole, Chloramphenicol, Tetracycline และ Gentamicin ร้อยละ 99.1, 98.8, 97.4 และ 97.3 ตามลำดับ แต่เชื้อจะดื้อต่อยา Ampicillin เป็นส่วนใหญ่ วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2549; 39: 72-81.

คำรหัส : การติดเชื้อ *V. parahaemolyticus*, อาหารเป็นพิษ, อุจจาระร่วง, แบบแผนความไวของยาต้านจุลชีพ

* กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลน่าน

Abstract: *Vibrio Parahaemolyticus* Infection in Nan Province. (October 1, 1997 to September 30, 2005)**Dech Amornthipayawong * Paiboon Tanunchai *, Anek Khumfun *, Pongmanee Jittawongpun ***

Retrospective study of *Vibrio parahaemolyticus* infection among patients attending Nan Hospital and Community Hospital, Nan province was performed during October 1, 1997 to September 30, 2005. A total of 28,625 specimens from patients showing acute diarrhea were investigated. The result showed that 1,432 specimens were considered bacterial infection positive. The majority of infectious agents were found to be *V. parahaemolyticus* in 709 cases (49.5 %). The higher number of infection appeared from April to October with a peak in July. The highest rate of infection was found in patients aged 31-45 years *V. parahaemolyticus* infection was found in 355 males and 354 females. Results of antimicrobial susceptibility testing were shown that all *V. parahaemolyticus* isolates were susceptible to Norfloxacin whereas 99.1, 98.8, 97.4 and 97.3 percent of isolates were susceptible to Co-trimoxazole, Chloramphenicol, Tetracycline and Gentamicin, respectively. However, most of *V. parahaemolyticus* isolates were Ampicillin resistant. *Bull Chiang Mai Assoc Med Sci* 2006; 39: 72-81.

Key words: *V. parahaemolyticus*, Food poisoning, Diarrhea, Antibiotic susceptibility testing

*Clinical Laboratory Pathology Section, Nan Hospital.

บทนำ

Vibrio parahaemolyticus เป็นเชื้อแบคทีเรียรูปแท่งโค้ง หรือแท่งตรง เคลื่อนที่ได้อย่างรวดเร็ว โดยอาศัยฟลาเจลล่าที่อยู่ตรงปลายติดสัณฐานมัลบิดอยู่ในตระกูล Vibrionaceae เป็นเชื้อที่ต้องการเกลือโซเดียมคลอไรด์ในการเจริญเติบโต ให้ปฏิกิริยา Oxidase เป็นผลบวกจึงมีแหล่งธรรมชาติในน้ำทะเล และ น้ำกร่อย เป็นสาเหตุท้องร่วงเฉียบพลันที่สำคัญในประเทศต่างๆ ทั่วโลก โดยเฉพาะประเทศที่รับประทานอาหารทะเลชนิดสุก ๆ ดิบ ๆ มีรายงานครั้งแรกในประเทศญี่ปุ่นโดยการรับประทานชิราสุ

ทำจากปลาสดครั้งสุกครั้งดิบ สำหรับในประเทศไทยเริ่มมีรายงาน การพบเชื้อเป็นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2513⁽¹⁾ การทำให้เกิดโรค เกิดจากรับประทานอาหารทะเลที่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่ โดยเฉพาะพวกปลา ปู กุ้ง หอย จำนวนเชื้อต้องมีปริมาณมากพอ คือ ตั้งแต่ 10^6 ถึง 10^9 ตัวต่อกรัม จึงจะสามารถทำให้เกิดภาวะอาหารเป็นพิษได้ การรับประทานอาหารทะเล อย่างใดอย่างหนึ่งที่ไม่สุกดี เช่น ปูนี้ หอยลวก อาการท้องร่วงมักจะเกิดหลังการกิน 12 - 24 ชั่วโมง^(2,3) บางรายอาจเกิดเร็วกว่านี้โดยมากเป็นอาหารมื่อสุดท้าย อาการมักเป็นแบบอาหารเป็นพิษคือ

ปวดท้องบริเวณกระเพาะอาหารก่อน มักจะปวดมากผิดจากโรคหิววัด หรือ โรคอื่น ๆ และมีอาการอาเจียนด้วยแล้วจึงถ่ายอุจจาระเป็นน้ำเป็นส่วนมากมีปนเนื้ออุจจาระบ้าง อาจมีเป็นสีชมพู เนื่องจากมีเม็ดเลือดแดงออกมาด้วยจำนวนอุจจาระ แต่ละครั่งจะมากจนคล้ายหิววัดได้ มีไข้สูงในันต่อมาอุจจาระอาจเปลี่ยนเป็นลักษณะมีมูกปนเลือดได้ เนื่องจากเชื้อลงมาถึงลำไส้ใหญ่จึงคล้ายใน Shigellosis เชื้อนี้อาจเข้าสู่กระแสเลือดได้ในผู้ป่วยที่เป็นที่ภูมิคุ้มกันต่ำ (compromised host) เช่นโรคตับแข็ง โรคเอดส์ เป็นต้น จะมีอาการหนักถึงชีวิตได้ โรคอุจจาระร่วงชนิดนี้เกิดจาก heat stable hemolysin อาการท้องร่วงจึงเป็นแบบ invasive diarrhea โดยที่ cytotoxin จากแบคทีเรียเป็นตัวทำให้เกิดอาการอักเสบที่ผนัง ลำไส้ นอกจากนี้ยังสามารถเกิดร่วมกันกับแบบ enterotoxin ได้ด้วยเช่นเดียวกันกับเชื้อกลุ่ม Shigella, Salmonella

ดังนั้นปัญหาโรคอุจจาระร่วงจึงยังเป็นปัญหาที่สำคัญทั้งการแพทย์และการสาธารณสุขของประเทศไทย เนื่องจากทำให้ประเทศต้องเสียงบประมาณจำนวนมากเพื่อใช้ในการรักษาและป้องกันโรคนี้ นอกจากนี้ยังมีผลต่อสุขภาพอนามัยของผู้ป่วยและเศรษฐกิจของชาติด้วย ดังนั้นจึงเป็นเหตุผลหนึ่งที่น่าไปสู่การศึกษาอุบัติการณ์ของโรคท้องร่วงที่เกิดจากเชื้อ *V. parahaemolyticus* ขึ้นเพื่อเป็นแนวทางในการป้องกันและรักษาต่อไป

วัสดุและวิธีการ

1. สิ่งสังตรวจ

ตัวอย่างอุจจาระจากผู้ป่วยแสดงอาการอุจจาระร่วงที่เข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาลน่าน และโรงพยาบาลชุมชนในจังหวัดน่าน ระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2540 ถึง 30 กันยายน พ.ศ. 2548 จำนวน 28,625 ตัวอย่าง การเก็บสิ่งส่งตรวจทำได้ 2 วิธี คือเก็บอุจจาระบริเวณที่มีมูกเลือดโดยใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อป้ายเก็บใส่อาหาร

สำหรับขนส่ง ที่เรียกว่า Cary blair transport medium หรือ การเก็บ Rectal swab⁽⁴⁾ ที่ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อสอดเข้าทางทวารหนัก 1-2 นิ้ว หมุน 2-3 รอบ ดึงออกมาใส่ขวดบรรจุ Cary blair transport medium ให้ไม้พันสำลีแช่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยหักก้านส่วนเกินออก ปิดฝาให้แน่น แล้วนำส่งห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา

2. วิธีการเพาะเชื้อ

เพาะเชื้อเบื้องต้นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียประจำถิ่นในขณะเดียวกันก็ส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อโรคด้วย คือ TCBS agar (Thiosulfate-citrate-bile-sucrose) และ Alkaline peptone^(5,6)

2.1 วิธีการแยกเชื้อจากอุจจาระ

การนำเอาไม้พันสำลีที่แช่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อป้ายลงบนอาหาร (TCBS agar) แล้วใช้ลูป (loop) ไร้เชื้อ streak จากจุดที่ป้ายเพื่อให้ได้โคโลนีของแบคทีเรียที่แยกออกจากกัน จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปอบที่อุณหภูมิ 35 - 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง ส่วนไม้พันสำลีนั้นใส่ใน Alkaline peptone media อบไว้ 6-8 ชั่วโมง ก่อนนำมาเพาะเลี้ยงบน TCBS อีกครั้งหนึ่ง

2.2 การพิสูจน์ชนิดของเชื้อ

2.2.1 นำโคโลนีที่มีสีเขียวขนาด 2-3 มิลลิเมตร กลม แบน มีลักษณะเหนียว บนอาหาร TCBS ไปเพาะในอาหารสำหรับทดสอบคุณสมบัติของเชื้อต่อไปนี้ คือ TSI (Triple sugar iron agar), MIL (Motile Indole Lysine), 3% NaCl, 7% NaCl และ 9% NaCl

2.2.2 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *V. parahaemolyticus*^(6,7)

เมื่อเชื้อที่แยกได้แสดงคุณสมบัติทางชีวเคมีดังตารางที่แสดงนี้ จะแปลผลว่าเชื้อนั้นคือ *V. parahaemolyticus*

TSI				MIL			Oxidase	NaCl		
Slant	butt	gas	H ₂ S	Motility	Indole	lysine		3%	7%	9%
K	A	-	-	+	+	+	+	+	+	+

3. การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ

การทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพโดยวิธี Disc diffusion method (Kirby-Bauer method) ^(8,9,10,11) โดยมีวิธีการทำและแปลผลดังนี้

3.1 วิธีการทำ Disc diffusion

นำเชื้อ *V. parahaemolyticus* 4-5 โคโลนีละลายใน Trypticase soy broth จนมีความขุ่นของเชื้อประมาณ 1.5×10^8 cfu/ml. (McFaland No 0.5) จากนั้นใช้ไม้ปั่นสำลีปราศจากเชื้อจุ่มลงในหลอดเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้ว หมุนไม้ปั่นสำลีกับข้างหลอดเพื่อให้สำลีหมาดๆ ป้ายบนผิวหน้า Mueller-Hinton agar plate ที่ๆ อย่างสม่ำเสมอทั่วจานเพาะเชื้อ ป้ายเชื้อซ้ำกัน 3 ครั้ง โดยแต่ละครั้งหมุนจานอาหารทำมุมเอียงไปจากเดิม 60 องศา เพื่อให้แบคทีเรียกระจายสม่ำเสมอทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ปิดฝาจานเพาะเชื้อและตั้งทิ้งไว้ 3-5 นาที เพื่อให้ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง ก่อนวางยาต้านจุลชีพ ไม่ควรตั้งทิ้งไว้นานเกิน 15 นาที แล้วใช้เข็มที่ปราศจากเชื้อคืบแผ่นยาไปวางบนผิวหน้าของอาหารและกดบนแผ่นยาเบาๆ เพื่อให้แนบสนิท การวางแผ่นยาควรวางให้ห่างกันประมาณ 3 เซนติเมตร และห่างจากขอบจานอาหารประมาณ 1.5 เซนติเมตร หลังจากวางแผ่นยาไม่เกิน 15 นาที ให้รีบนำจานอาหารเก็บในตู้เพาะเชื้ออุณหภูมิ 35 – 37 องศาเซลเซียสในลักษณะคว่ำจานอาหารเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เมื่อวางแผ่นยาต้านจุลชีพแล้ว ไม่ควรเคลื่อนย้ายแผ่นยา เนื่องจากสารต้านจุลชีพบางส่วนจะซึมสู่อาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว

3.2 การอ่านและแปลผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ

นำจานอาหารเพาะเชื้อที่ทดสอบความไวมาวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่ไม่มีเชื้อขึ้น (Inhibition zone) โดยวัดเป็นมิลลิเมตรแล้วนำไปเปรียบเทียบกับตารางแปลผลมาตรฐานของ NCCLS ^(12,13,14,15) ซึ่งจะแปลผลเป็นไวต่อยา (S; susceptible), ไวต่อยาปานกลาง (I; interme-

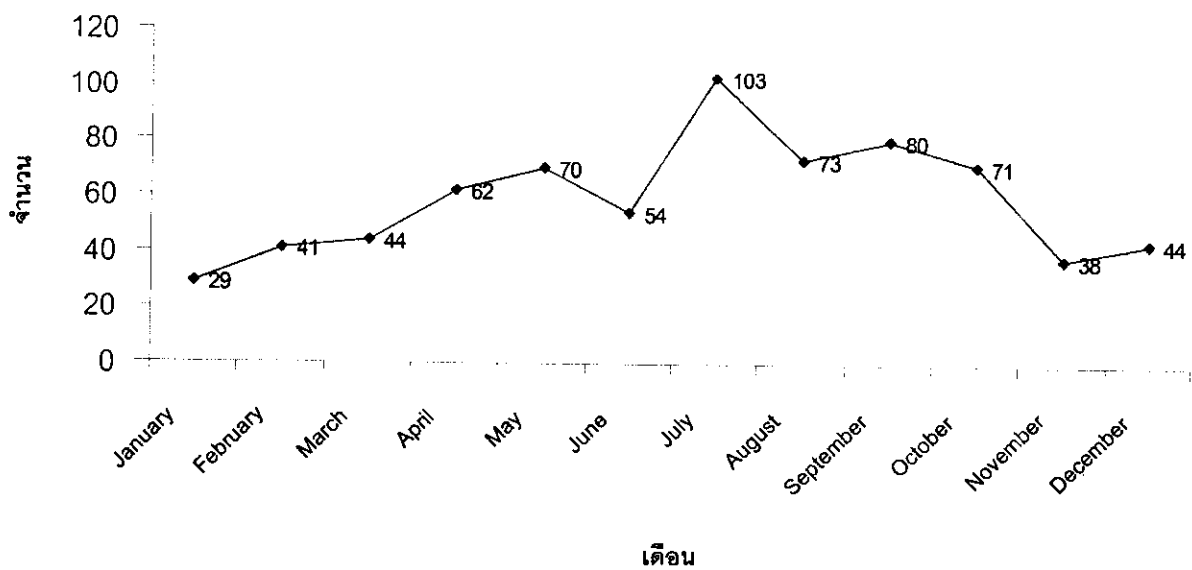
diate) หรือดื้อต่อยา (R; resistant)

ผลการศึกษา

การศึกษาเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ของผู้ป่วยที่มารักษาในโรงพยาบาลน่าน และโรงพยาบาลชุมชน ในพื้นที่จังหวัดน่าน ระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2540 ถึง วันที่ 30 กันยายน พ.ศ. 2548 จากจำนวนตัวอย่างอุจจาระ 28,625 ตัวอย่าง พบการติดเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคอุจจาระร่วงจำนวน 1,432 ราย พบว่าเป็นเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* จำนวน 709 ราย รองลงมาเป็นเชื้อกลุ่ม *Salmonella* group A-E 425 ราย, *Shigella* group A-D 291 ราย และเชื้อ *V. cholerae* ogawa 7 ราย ตามลำดับ (ตารางที่ 1) การติดเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* พบเชื้อมากที่สุดในช่วงเดือนเมษายน-ตุลาคม (แผนภูมิที่ 1) ผู้ป่วยที่ติดเชื้อส่วนใหญ่เป็นผู้มารับการรักษาที่โรงพยาบาลน่านร้อยละ 74 (525 ราย จาก 709 ราย) และโรงพยาบาลชุมชน ร้อยละ 26 (184 ราย จาก 709 ราย) ประเภทคนไข้ส่วนใหญ่ในโรงพยาบาลน่านเป็นแผนกอายุรศาสตร์ ร้อยละ 61.2 รองลงมา เป็นผู้ป่วยนอก ร้อยละ 7.9 และผู้ป่วยแผนกศัลยกรรม ร้อยละ 2.0 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) กลุ่มอายุของผู้ติดเชื้อพบมากในอายุระหว่าง 31-45 ปี ร้อยละ 30.0 (ตารางที่ 3) และพบอัตราการติดเชื้อไม่แตกต่างกันระหว่างเพศชายและเพศหญิง คือพบการติดเชื้อในเพศชาย 355 ราย และเพศหญิง 354 ราย สำหรับผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ พบว่า *V. parahaemolyticus* ทุกสายพันธุ์ที่แยกได้ไวต่อยา Norfloxacin ส่วนความไวต่อยา Co-trimoxazole, Chloramphenicol, Tetracycline และ Gentamicin พบเป็นร้อยละ 99.1, 98.8, 97.4, 97.3 ตามลำดับ โดยที่เชื้อมีความไวต่ำมากต่อยา Ampicillin คือพบเพียงร้อยละ 6.5 เท่านั้น (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนการตรวจพบเชื้อที่ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วง ในระยะ 8 ปี (2540-2548) โรงพยาบาลน่าน และโรงพยาบาลชุมชนในจังหวัดน่าน

ชนิดของเชื้อ	ตรวจพบการติดเชื้อ	
	ตัวอย่าง	ร้อยละ
Salmonella group A-E	425	29.7
Shigella group A-D	291	20.3
Vibrio cholerae El Tor	7	0.5
Vibrio parahaemolyticus	709	49.5
Total	1,432	100.0



แผนภูมิที่ 1 เชื้อ *V. parahaemolyticus* จำนวนรวม 709 สายพันธุ์ที่ตรวจพบในเดือนต่างๆในรอบ 8 ปี (2540-2548) ณ โรงพยาบาลน่านและโรงพยาบาลชุมชนในจังหวัดน่าน

ตารางที่ 2 จำนวนและร้อยละการติดเชื้อ V. parahaemolyticus จำแนกตามประเภทผู้ป่วย

ประเภทผู้ป่วย	จำนวนราย	ร้อยละ
โรงพยาบาลชุมชนในจังหวัดน่าน	184	25.9
โรงพยาบาลน่าน		
ผู้ป่วยนอก	56	7.9
ผู้ป่วยหนัก	4	0.6
ผู้ป่วยอายุกรรม	434	61.2
ผู้ป่วยสูตินรีเวช	6	0.8
ผู้ป่วยเด็ก	11	1.6
ผู้ป่วยศัลยกรรม	14	2.0
รวม	709	100.0

ตารางที่ 3 จำนวนและร้อยละการติดเชื้อ V. parahaemolyticus จำแนกตามกลุ่มอายุ

ช่วงอายุ	จำนวนราย	ร้อยละ
0-15	73	10.3
16-30	133	18.8
31-45	213	30.0
46-60	158	22.3
61-75	93	13.1
76-90	39	5.5
รวม	709	100.0

ตารางที่ 4 ร้อยละความไวของเชื้อ V. parahaemolyticus ต่อยาต้านจุลชีพชนิดต่าง ๆ

ยาต้านจุลชีพ	จำนวนเชื้อที่ทดสอบ	ร้อยละ ดื้อยา (R)	ร้อยละ ไวปานกลาง (I)	ร้อยละ ไวต่อยา (S)
Ampicillin	709	83.7	9.8	6.5
Gentamicin	709	0.8	1.9	97.3
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	709	0.7	0.2	99.1
Tetracycline	709	1.0	1.6	97.4
Chloramphenicol	709	0.7	0.5	98.8
Norfloxacin	709	0.0	0.0	100.0

วิจารณ์ผล

เนื่องจากเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* มีแหล่งธรรมชาติอยู่ในทะเลบริเวณชายฝั่งในแถบต่างๆ ทั่วโลก ได้แก่ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ออสเตรเลีย อเมริกาเหนือ และยุโรป ฉะนั้นจึงทำให้สามารถแยกเชื้อได้จากน้ำทะเลและอาหารทะเล ดังนั้นการติดเชื้อจึงเกิดจากการรับประทานอาหารทะเล ซึ่งจากรายงานครั้งแรกที่ประเทศญี่ปุ่นโดยรับประทานชิราสุ (Shirasu) ซึ่งทำมาจากปลาซาตินที่ปรุงในสภาพครึ่งสุกครึ่งดิบและอุบัติเหตุที่ห้องว่างมากสุดในฤดูร้อนจากการรับประทาน Sushi⁽¹⁶⁾ การเกิด Outbreaks⁽¹⁷⁾ ในประเทศสหรัฐอเมริกาเกิดจากการรับประทานอาหารทะเลดิบที่ไม่สะอาด มีการปนเปื้อนเชื้อเป็นต้น ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้พบว่าภาวะอาหารเป็นพิษเกิดจากเชื้อชนิดนี้ประมาณร้อยละ 70 มีผู้ทำการตรวจแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากอาหารทะเลชนิดต่างๆ เช่น ปลา กุ้ง ปู หอย ซึ่งผลิตโดยบรรดาบริษัทผู้ผลิตอาหารทะเลเพื่อส่งเป็นสินค้าออกรวมทั้งสิ้น 934 ตัวอย่าง⁽¹⁸⁾ ปรากฏว่า อัตราการพบเชื้อนี้โดยเฉลี่ยร้อยละ 37 ปลาสดแช่เย็นแข็งมีอัตราพบเชื้อสูงกว่าอาหารประเภทอื่นคือร้อยละ 42 รองลงมาคือปลาหมึกและกุ้งสดแช่เย็นแข็ง อาหารทะเลชนิดที่ผ่านความร้อนและชนิดหมักเกล็ดตรวจไม่พบเชื้อนี้ จากการสำรวจอาหารทะเลที่สุ่มจากตลาดสดในกรุงเทพมหานครพบปนเปื้อนเชื้อ *V. parahaemolyticus* สูงมากกว่าร้อยละ 50 ของอาหารที่ตรวจพบ สำหรับข้อมูลในประเทศไทยก็พบว่าเชื้อชนิดนี้เป็นสาเหตุของอุจจาระร่วงบ่อยที่สุด⁽¹⁸⁻¹⁹⁾ เชื้อชนิดนี้ถูกทำลายได้ง่ายโดยกรดและความร้อน เชื้อจะถูกทำลายในภาวะเป็นกรด pH 4.4 เพียง 30 วินาที และที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสในเวลา 15 นาที นอกจากนี้พบว่าอาหารทะเลที่เก็บในน้ำเกลือมีความเค็มถึงร้อยละ 7 และ อุณหภูมิต่ำกว่า 8 องศาเซลเซียส เชื้อชนิดนี้สามารถอยู่รอดได้ ดังนั้นในอาหารทะเล เช่น ปลา กุ้ง ปู หอยนางรม หอยแมลงภู่ และผลิตภัณฑ์จากอาหารทะเล ถ้านำมารับประทานในลักษณะไม่สุกจะเป็นสาเหตุที่สำคัญในการติดเชื้อได้

การศึกษาของโรงพยาบาลนานในระยะเวลา 8 ปี ครั้งนี้ก็พบเชื้อได้ถึงร้อยละ 49.5 ทั้งๆ ที่ในระยะ 10 ปีย้อนหลัง (ปีงบประมาณ 2531-2540) มีการตรวจพบ

เชื้อในปริมาณต่ำมาก และถือว่าพบเชื้อสูงกว่าการการตรวจพบในระดับประเทศระยะ 5 ปี (2543-2547) ของศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ ที่มีสมาชิกจากโรงพยาบาลทั่วไปและโรงพยาบาลศูนย์จำนวน 33 แห่ง ซึ่งตรวจพบเชื้อเพียงร้อยละ 34.7⁽²⁰⁾ แต่ถือว่าพบอัตราที่ต่ำกว่าการศึกษาในไต้หวันในระยะ 5 ปี (2536-2539) ที่พบว่าติดเชื้อชนิดนี้เป็นอันดับที่ 1 (ร้อยละ 63.8)⁽²¹⁾ สำหรับสาเหตุการตรวจพบเชื้อในกลุ่ม *Salmonella* และ *Shigella* เป็นอันดับรองลงไป คงมี 2 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องคือ แหล่งและพาหะของเชื้อกลุ่ม *Salmonella* มักจะพบในสัตว์บก เช่น หนู หมู สัตว์ปีก (เป็ด ไก่) และสัตว์เลื้อยคลานอื่นๆ ที่เป็นแหล่งสะสมเชื้อแต่ไม่เป็นโรคได้แก่ จิ้งจก ตุ๊กแก เป็นต้น ปัจจัยที่สองน่าจะมาจากพยาธิกำเนิดของเชื้อเช่น *Salmonella* มักเพิ่มจำนวนที่บริเวณลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ แล้วเข้าทางเนื้อเยื่อน้ำเหลืองของผนังลำไส้ทำให้เกิดการอักเสบในบริเวณดังกล่าวขึ้น และเชื้อสามารถผ่านทางหลอดน้ำเหลืองสู่กระแสเลือดและอวัยวะอื่นๆ ได้ส่วนเชื้อ *Shigella* มักก่อพยาธิสภาพที่ลำไส้ใหญ่ มักจะมาพร้อมกับเชื้อ *Salmonella* ในขณะที่เชื้อ *V. parahaemolyticus* แหล่งของเชื้ออยู่ในอาหารทะเลประเภท ปลา ปู กุ้ง หอย เมื่อรับประทานอาหารสุกๆ ดิบๆ ที่ปนเปื้อนเชื้อเข้าไป เชื้อจะเพิ่มจำนวนที่ลำไส้เล็กและสร้างพิษขึ้น ทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการท้องเดินขึ้นได้ ดังนั้นถ้าคนส่วนใหญ่นิยมบริโภคอาหารทะเลในลักษณะครึ่งสุกครึ่งดิบ จำนวนที่มากขึ้นจึงส่งผลให้มีอัตราการตรวจพบเชื้อชนิดนี้ได้สูงกว่าเชื้อ *Salmonella* และ *Shigella*

หลายๆ รายงานก็เชื่อว่าเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดภาวะอาหารเป็นพิษต้องเป็นชนิด Kagawa positive ซึ่งจะมี virulence factor ที่สำคัญคือ cytotoxin, hemolysin, adhesin และ mucinase ที่ทำให้เกิด Gastroenteritis และบางทีเกิด Extraintestinal infection ได้⁽²²⁾ จากการศึกษาการระบาดในหลายๆ ประเทศโดยอาศัย O: K serovars⁽²³⁻²⁴⁾ พบว่ามีหลากหลาย serovar ที่ทำให้เกิดการระบาดในแต่ละประเทศ เช่น ไต้หวัน บังคลาเทศ ลาว ญี่ปุ่น เกาหลี และประเทศไทย จากการศึกษาการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในสหรัฐอเมริกาของ Daneis และ

คณะ⁽²¹⁾ พบว่าการระบาดส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นระหว่างช่วงเดือน เมษายน ถึง พฤศจิกายน การศึกษาครั้งนี้ก็พบว่าการระบาดได้ตลอดทั้งปี ที่มีการตรวจพบมากที่สุดในเดือนกรกฎาคม มีการตรวจพบน้อยในช่วงฤดูหนาวระหว่างเดือนธันวาคมถึงกุมภาพันธ์ สาเหตุการตรวจพบเชื้อและมีการระบาดทั่วโลกหลายรายงาน⁽²⁵⁻²⁸⁾ สรุปว่าคนที่มีความเสี่ยงสูงสุดในการเกิดโรค มักเป็นผู้ที่ชอบรับประทานอาหารทะเลแบบสุก ๆ ดิบ ๆ เชื้อทั้งหมดในการศึกษาครั้งนี้เป็นการตรวจพบในอุจจาระเท่านั้น แต่จากรายงานของ Danieis และคณะ⁽²¹⁾ พบว่ามีการตรวจพบในกระเพาะในหนอง และทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ สำหรับในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบว่ามีผู้ป่วยเสียชีวิต

จากการศึกษาพบว่าเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* มากที่สุดในฤดูร้อน เนื่องจากเป็นช่วงอุณหภูมิที่พอเหมาะสำหรับการแบ่งตัวของเชื้อจึงสามารถพบได้มากในฤดูนี้ จึงทำให้ในน้ำทะเล อาหารทะเล มีการปนเปื้อนของเชื้อมากขึ้นตามด้วย การรับประทานอาหารทะเลสุก ๆ ดิบ ๆ ก็ติดเชื้อได้โดยง่าย การป้องกันการติดเชื้อที่ดีที่สุดคือการรับประทานอาหารทะเลที่ปรุงสุกแล้ว และต้องเป็น การสุกอย่างทั่วถึง เข้าถึงเนื้ออาหารทุกส่วน ถ้าหากต้องการรับประทานอาหารทะเลในลักษณะดิบหรือสุก ๆ ดิบ ๆ เช่น ปลาดิบ หอยนางรม ควรทำความสะอาดอย่างดี รวมทั้งภาชนะที่ใส่อาหารระมัดระวังการปนเปื้อนข้ามจากภาชนะและอุปกรณ์ประกอบอาหาร จากนั้นควรเก็บอาหารไว้ในที่เย็นต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียส จนกว่าจะรับประทาน

สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อพบว่าเชื้อจะเจริญได้ไม่ติดบนอาหาร Differential media ที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ *Salmonella* และเชื้อ *Shigella* แต่จะเจริญได้ดีบน Blood agar และ TCBS ลักษณะสำคัญของเชื้อให้โคโลนีมีลักษณะกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 ถึง 3 มิลลิเมตร สีฟ้าเขียว ให้ Oxidase positive จาก Blood agar จากหลายรายงานพบว่าเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* มีความไวสูง(มากกว่าร้อยละ 90)^(20-21,24-29) ในยาต้านจุลชีพชนิดต่าง ๆ เช่น Chloramphenicol, Tetracycline, Co-trimoxazole, Ceftriazone, Cefotaxime, Ciprofloxacin และ Norfloxacin แต่เชื้อส่วนใหญ่จะดื้อต่อยา Ampicillin

สรุป

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของจากร่วงอันดับที่ 1 ในจังหวัดน่านในระยะ 8 ปี (2540-2548) มีการติดเชื้อได้ทุกเพศทุกวัย ผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นผู้ป่วยแผนกอายุรกรรม มีช่วงอายุระหว่าง 31-45 ปี พบเชื้อมากที่สุดในช่วงเดือนพฤษภาคมถึงเดือนตุลาคม เชื้อมีความไวต่อยา Chloramphenicol, Tetracycline และ Norfloxacin แต่เชื้อส่วนใหญ่ดื้อต่อยา Ampicillin

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณนายแพทย์คณิต ตันติศิริวิทย์ ผู้อำนวยการโรงพยาบาลน่าน คุณไพบุลย์ ทั่นไชย หัวหน้ากลุ่มงานพยาธิวิทยา โรงพยาบาลน่าน ที่อนุญาตให้ทำการศึกษา ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่งานจุลชีววิทยา คลินิกและครอบครัวที่ช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้รายงานฉบับนี้สำเร็จลงได้

เอกสารอ้างอิง

1. อรษา สุตเธียรกุล.โรคติดเชื้อที่เกิดจากอาหารและน้ำ. ใน: กนกรัตน์ ศิริพานิชกร (บรรณาธิการ), โรคติดเชื้อ. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: โอเอสตีพิมพ์ลิซซิ่ง, 2541: 275-81.
2. สมพนธ์ บุญยคุปต์,สมศักดิ์ โล่ห์เลขา. โรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันจากการติดเชื้อ Acute infectious diarrhea. ใน: การวินิจฉัยเชื้อและการรักษาโรคติดเชื้อที่พบบ่อยเล่ม 2. กรุงเทพฯ, 2532: 26-66.
3. กวี เจริญลาภ. โรคติดเชื้อแบคทีเรีย (ภาวะอาหารเป็นพิษ). ใน: นิภา จุญแจสม,นลินี อัศวโกศล, กวี เจริญลาภ, ประกิจ รอดประเสริฐ, พีระ บุรณกิจเจริญ, รวีวรรณ พิบูลภานุวัชน (บรรณาธิการ), โรคเขตร้อน. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: เรือนแก้วการพิมพ์, 2543: 321-26.
4. กองมาตรฐานชั้นสูตรสาธารณสุข กระทรวงสาธารณสุข. คู่มือการควบคุมคุณภาพห้องปฏิบัติการชั้นสูตรสาธารณสุข. กรุงเทพฯ, 2537.
5. กองมาตรฐานชั้นสูตรสาธารณสุข กระทรวงสาธารณสุข. การเพาะเชื้อจากอุจจาระ. ใน: คู่มือการ

- ตรวจทางจุลชีววิทยาคลินิก. กรุงเทพฯ, 2529: 42-50.
6. วิภาวดี แมนมนตรี. การเพาะเชื้อจากอุจจาระ. ใน: วิภาวดี แมนมนตรี, อรุณวดี ชนะวงศ์, โชติชนะ วิสัยลักษณ์คณา (บรรณาธิการ), คู่มือการตรวจทางจุลชีววิทยาและราวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 1. ขอนแก่น: ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2521: 19-25.
 7. Zen-Yooji H, Ohashi M, Kudoh Y (eds). Manual for the isolation and identification of enteropathogenic bacteria. Seamic publication No.6, Tokyo: Seamic, 1976.
 8. ชมรมเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่. คู่มือปฏิบัติการชันสูตรโรค. เชียงใหม่: ชมรมเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่, 2525.
 9. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. คู่มือการตรวจทางจุลชีววิทยาคลินิก. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์การศาสนา, 2523: 134-38.
 10. กองโรงพยาบาลภูมิภาค กระทรวงสาธารณสุข. คู่มือการปฏิบัติงานแบคทีเรีย. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์การศาสนา, 2542: 145-68.
 11. จันทรเพ็ญ วิวัฒน์. การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ. ใน: นริกุล สุระพัฒน์, จันทรเพ็ญ วิวัฒน์, ปรีชา พุทธาวุฒิกโร, สุวณี สุขเวทย์, ประมวญ เทพชัยศรี (บรรณาธิการ), จุลชีววิทยาทางการแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 5. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์กรุงเทพเวชสาร, 2522: 38-49.
 12. National Committee for Clinical Laboratory Standard: Performance Standards for Anti-microbial Disk Susceptibility Test- Sixth edition. Approved standard M2-A6, Vol.17 No.1 National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997.
 13. National Committee for Clinical Laboratory Standard: Performance Standards for Anti-microbial Disk Susceptibility Testing; Eight Informational Supplements. M100-S8, Vol.18 No.1 National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1998.
 14. National Committee for Clinical Laboratory Standard: Performance Standards for Anti-microbial Disk Susceptibility Testing; Eight Informational Supplements. M100-S9, Vol.19 No.1 National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1999.
 15. ชลธวัช สุวรรณปิยะศิริ และคณะ. คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางการแพทย์พื้นฐาน. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2539: 123-25.
 16. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melnick & Adelberg. Medical Microbiology. 21st ed, California: Appleton & Lange, 1998.
 17. Murray RP, Baron JOE, Pfaller AM, Tenover CF, Tenover HR. Manual of clinical microbiology. 6th ed, Washington, DC: ASM Press, 1995.
 18. พงนิย โกลลภิส. Vibrionaceae. ใน: โสภณ คงสำราญและคณะ (บรรณาธิการ), แบคทีเรียทางการแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์พิมพ์เนศ, 2524.
 19. Mahon Rc, Manuselis G, Jr. Textbook of Diagnostic Microbiology. W.B. Sanders Company. 1995.
 20. ศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. <http://narst.dmsc.moph.go.th>
 21. Chiou C.S., Hsu S.Y., Chiu S.I., Wang T.K., and Chao C.S. Vibrio parahaemolyticus serovar O3: K6 as cause of unusually high incidence of food-borne disease outbreaks in Taiwan from 1996 to 1999. J Clin Microbiol. 2000; 38: 4621-625.
 22. Joklik WK, Willett HP, Amos DB., Wilfert CM. Zinsser microbiology 20th ed, California: Appleton & Lange. 1992.
 23. Matsumoto, C., J. Okuda, M. Ishibashi, M. Iwanaga, P. barg, T. Rammamurthy, H.C. Wong, A. Depaola, Y.B. Kim, M.J. Albert, M. Nishibuchi.

- Pandemic spread of an O3: K6 Clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strain evidenced by arbitrarily primed PCR and tox RS sequence analyses. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 578-85.
24. Danieis N.A., MacKinnon L., Bishop R., Altekruze S., Ray B., Hammond R.M., Thompson S., Wilson S., Bean N.H., Griffin P.M. and Slutsker L. *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973-1998. *J Infect Dis.* 2000; 181: 1661-666.
25. Yamazaki M., Inuzuka K., Matsmoto M., Miwa Y., Hiramatsu R., Matsui H., Sakac K., Suzuki Y., Miyazaki Y. Epidemiological study of outbreaks and sporadic cases due to *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3: K6 in Aichi Prefecture, Japan, during 1988 and 2001. *Kansenshogaku Zasshi.* 2003; 77: 1015-23.
26. Tangkanakul W., Tharmaphornpilas P., Datapon D., Sutantayawalee S. Food poisoning outbreak from contaminated fish-balls. *J Med Assoc Tai.* 2000; 83: 1289-295.
27. Hughes JM., Boyee JM., Aleem AR., Wells JG, Rahman AS., Curlin GT. *Vibrio parahaemolyticus* enterocolitis in Bangladesh: report of an outbreak. *AM J Trop Med. Hyg.* 1978; 27: 106-12.
28. Nolan CM., Ballard J., Kaysner CA., Lilja JL., Williams LP Jr., Tenover FC. *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis an outbreak associated with raw oysters in the Pacific Northwest. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1984; 2: 119-29.
29. Heitmann I, Jofrem L, Carlos Hormabao J, Olean A, Vallebuonas C, Valdech C. Review and guidelines for treatment of diarrhea caused by *Vibrio parahaemolyticus*. *Rev Chil Infect.* 2005; 22: 131-40.

บทความปริทรรศน์

แนวปฏิบัติทางคลินิก : การรักษาด้วยการจัดทำเพื่อระบายเสมหะ

Clinical Guideline: Postural Drainage Therapy (PDT)

ศุภพร ชีวะพาณิชย์

การปฏิบัติงานกายภาพบำบัดทางด้านระบบทางเดินหายใจทั้งกรณีผู้ป่วยที่เป็นเด็กและผู้ใหญ่ล้วนต้องการการพิจารณาที่ตัดสินใจอย่างถูกต้องและปฏิบัติด้วยความรอบคอบจากนักวิชาชีพในการให้การดูแลรักษาเป็นรายบุคคลเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพในการรักษามากที่สุด วิธีการหนึ่งที่ยังนิยมใช้ในการรักษากันอย่างกว้างขวางมาจนถึงปัจจุบันร่วมกับเทคนิคการรักษาอื่น ๆ คือ “การจัดทำเพื่อระบายเสมหะ(Postural Drainage Therapy: PDT)” ซึ่งเทคนิคนี้หากผู้ทำการรักษาได้อาศัยแนวปฏิบัติทางคลินิก (clinical guideline) มาช่วยกันในการปฏิบัติงานโดยพยายามดำเนินการให้เป็นไปในทิศทางเดียวกันแล้ว ผลดีย่อมเกิดแก่ผู้ป่วยเป็นอย่างมาก นอกจากนี้การรักษาด้วยการจัดทำร่วมกับการดูแลระบบทางเดินหายใจรูปแบบอื่น เช่น การเคาะ การไอ เป็นต้น ยังเป็นส่วนหนึ่งที่ช่วยลดปัญหาการเกิดภาวะนิวโมเนียในผู้ป่วยที่นอนพักรักษาตัวอยู่ในโรงพยาบาลนานหรือกรณีที่ได้รับการคาท่อช่วยหายใจได้เป็นอย่างดี เนื่องจากแนวปฏิบัติการรักษาด้วยการจัดทำเพื่อระบายเสมหะภาคภาษาไทยฉบับนี้ถอดใจความมาจาก RESPIRATORY CARE (Respir Care 1991;36:1418-1426) มีเนื้อหาที่ละเอียดรอบคอบเหมาะแก่การปฏิบัติ และคาดว่าจะยังไม่มีผู้ใดเรียบเรียงไว้เป็นภาษาไทยให้นักกายภาพบำบัดได้มีโอกาสนำมาใช้อย่างถูกต้องและเหมาะสม

PDT 1.0 วิธีการ

การรักษาด้วยการจัดทำเพื่อระบายเสมหะ (Postural Drainage Therapy: PDT) เป็นส่วนหนึ่งของการดูแลรักษาสุขภาวะบริเวณหลอดลมปอด ประกอบด้วย

จัดทำเพื่อระบายเสมหะ การจัดทำ และการพลิกตัว และบางครั้งต้องทำร่วมกับการเคาะปอด และ/หรือการสั่นปอด

เทคนิคการไอหรือการทำให้ท่อทางเดินหายใจโล่งนับเป็นองค์ประกอบสำคัญในการรักษาเมื่อจัดทำระบายเสมหะเพื่อให้เสมหะร้อนได้ง่าย (1-6) บ่อยครั้งที่ Postural Drainage Therapy ทำควบคู่ไปกับการรักษาด้วยการพ่นละอองฝอย (aerosol therapy) และการดูแลระบบทางเดินหายใจรูปแบบต่าง ๆ

การดูแลระบบทางเดินหายใจรูปแบบต่าง ๆ ได้แก่ (7-12)

- กายภาพบำบัดทรวงอก
- การจัดทำเพื่อระบายเสมหะและการเคาะปอด และ
- การสั่นปอด

PDT 2.0 คำนิยาม/ คำจำกัดความ

Postural Drainage Therapy (PDT) เป็นการรักษาเพื่อช่วยในการร่อนระบายเสมหะ (2,4,5,8-10,13-18) และทำให้ ventilation และ perfusion สมดุลกัน (19-23) และช่วยให้ค่า functional residual capacity (FRC) (17, 24-30) เข้าสู่ค่าปกติ โดยอาศัยผลของแรงโน้มถ่วงของโลกและแรงจากภายนอกที่เกิดจากการกระทำของมือต่อทรวงอก รวมถึงการพลิกตัวเพื่อระบายเสมหะ การเคาะ การสั่นปอด และการไอ

2.1 การพลิกตัว

การพลิกตัวเป็นการหมุนของร่างกายรอบแกนแนวนอนเพื่อให้เกิดการขยายตัวของปอด (19,22)

และการส่งผ่านออกซิเจนในหลอดเลือดแดงดีขึ้น (19-21,31) การพลิกตัวอย่างสม่ำเสมอทั้งพลิกตะแคงหรือพลิกคว่ำ สามารถปรับมุมของเตียงได้ตามความทนทานของผู้ป่วยแต่ละคน อาจด้วยการให้ผู้ป่วยทำด้วยตนเอง มีเครื่องมือ หรือมีคนช่วยทำให้ (21,22,33-35)

2.2 การจัดท่าเพื่อระบายเสมหะ (Postural drainage)

Postural drainage เป็นการระบายเสมหะโดยอาศัยผลของแรงโน้มถ่วงของโลกดึงเสมหะจากแขนงปอดที่ต้องการไปสู่ท่อนลมกลาง แล้วถูกขับออกด้วยการไอหรือกลืนลงสู่การสำลัก(2,4,5,11,13,15-18,26,29,36,37) แต่ละท่าประกอบด้วยการจัดวางตัวของแขนงปอดที่ต้องการระบายเสมหะให้อยู่เหนือต่อทางแยก carina โดยทั่วไปท่าแต่ละท่านานประมาณ 3 ถึง 15 นาทีหรืออาจนานกว่านี้ในบางเฉพาะกรณี (4,6,13,16,18,20,29,38-40)โดยยึดตามมาตรฐานท่าทางการจัดท่าเพื่อระบายเสมหะหรืออาจต้องปรับเปลี่ยนไปตามความทนทานของผู้ป่วยแต่ละราย

2.3 แรงการทำงานจากภายนอกที่กระทำบนทรวงอก

2.3.1 การเคาะ (Percussion)

การเคาะหมายถึงการห่อมือรูปถ้วย การตบมือมีเป้าหมายเพื่อประยุกต์ใช้พลังงานจลน์จากมือทำให้เกิดการเคลื่อนไหวบริเวณผนังทรวงอกและปอด โดยการกระทบมือหรืออุปกรณ์ที่ต้องการเคาะสัมผัสกับทรวงอกอย่างเป็นจังหวะและมุ่งเน้นไปบริเวณแขนงปอดที่ต้องการรักษา (4,18,41-44)

2.3.2 การสั่น (Vibration)

การสั่นเป็นการประยุกต์ใช้การเกิดปฏิกิริยาการสั่นอย่างละเอียดด้วยการใช้มือกดลงบนซี่โครงบริเวณปอดส่วนที่ต้องการระบายเสมหะ ทำในทิศทางเดียวกับที่กระดูกซี่โครงและเนื้อเยื่ออ่อนบริเวณทรวงอกเกิดการเคลื่อนที่ในขณะหายใจออก ยังไม่มีการสรุปผลของประสิทธิภาพ วิธีการ หรือความถี่ในการใช้เทคนิคนี้ (2,4,13,27,28,30,36,38,39,45-47)

PDT 3.0 การจัดการ

Guideline นี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้กับเด็กที่โตขึ้นและผู้ใหญ่ได้ แม้ว่าตามปกติจะใช้กับทารก เด็กเล็กและเด็กโตก็ตาม ซึ่งใช้PDT ในการรักษาได้อย่างกว้างขวางตามที่ต่าง ๆ ได้แก่

3.1 หน่วยผู้ป่วยวิกฤติ

3.2 หน่วยผู้ป่วยเฉียบพลัน (In-patient acute care)

3.3 การดูแลต่อเนื่องและการพัฒนาทักษะทางการพยาบาล

3.4 การให้การดูแลที่บ้าน

3.5 การดูแลแบบผู้ป่วยนอก ไป-กลับ

3.6 ห้องปฏิบัติการเพื่อการวินิจฉัย

PDT 4.0 ข้อบ่งชี้

4.1 การพลิกตัว

4.1.1 ผู้ป่วยที่ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงท่าทางด้วยตนเองได้ ได้แก่ ผู้ป่วยที่ได้รับการคาเครื่องช่วยหายใจ มีโรคทางระบบประสาทและกล้ามเนื้อ ได้รับยาที่มีผลทำให้แขนและขาอ่อนแรงลง

4.1.2 อยู่ในท่าที่มีการแลกเปลี่ยนออกซิเจนไม่ดี เช่น มีโรคบริเวณรพอดข้างใดข้างหนึ่ง

4.1.3 มีโอกาสเกิดภาวะปอดแฟบ (atelectasis) ได้ (24,26,30)

4.1.4 ได้รับการคาท่อทางเดินหายใจต่าง ๆ

4.2 Postural Drainage

4.2.1 มีอาการที่บ่งบอกว่ายังมีเสมหะค้างคั่งอยู่หรือระบายออกได้ยาก

4.2.1.1 ระบายเสมหะออกได้ยากอยู่แม้จะได้รับยาขับเสมหะแล้ว

4.2.1.2 มีอาการที่บ่งบอกว่ายังมีเสมหะค้างคั่งอยู่บริเวณท่อนทางเดินหายใจที่คาไว้

4.2.2 มีภาวะ atelectasis โดยมีสาเหตุจากการเกาะตัวอย่างหนาแน่นของเยื่อเมือก (mucus plugging) (24,26,29,30,54)

4.2.3 มีภาวะcystic fibrosis (1,5,6,13-15,18,36,55) bronchiectasis (4,5,14) หรือ cavitating lung disease

4.2.4 มีสิ่งแปลกปลอมในทางเดินหายใจ (56-58)

4.3 การใช้มือกระทำต่อทรวงอก

4.3.1 กรณีที่มีเสมหะในปริมาณมากหรือยังต้องการช่วยให้เสมหะร้อนมากขึ้นด้วยเทคนิคการเคาะหรือสั่นปอดโดยทำร่วมกับ postural drainage

PDT 5. ข้อห้าม

การตัดสินใจให้การรักษาด้วย PDT ต้องทำการตรวจประเมินและให้การรักษาตามความทนทานของผู้ป่วยในระยะเวลาที่ไม่นานเกินความจำเป็น มีข้อห้ามดังนี้

5.1 การจัดท่า Positioning

5.1.1 ห้ามทำ postural drainage ทุกท่าในกรณี

5.1.1.1 intracranial pressure (ICP) มากกว่า 20 มม.ปรอท (59,60)

5.1.1.2 บาดเจ็บบริเวณศีรษะและคอจนกระทั่งได้รับการประคองแล้ว (A)

5.1.1.3 เลือดไหลร่วมกับมี hemodynamic instability (A)

5.1.1.4 เพิ่งได้รับการผ่าตัดกระดูกสันหลัง เช่น laminectomy หรือการบาดเจ็บไขสันหลังหรือกระดูกสันหลังเฉียบพลัน

5.1.1.5 การบาดเจ็บไขสันหลังหรือกระดูกสันหลังเฉียบพลัน หรือมีการไอเป็นเลือด

5.1.1.6 empyema

5.1.1.7 bronchopleural fistula

5.1.1.8 pulmonary edema ร่วมกับมี congestive heart failure

5.1.1.9 pleural effusions ขนาดใหญ่

5.1.1.10 pulmonary embolism

5.1.1.11 ผู้สูงอายุ ผู้ป่วยที่สับสนหรือวิตกกังวลซึ่งไม่สามารถทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงท่าทาง

5.1.1.12 กระดูกซี่โครงหักอาจมีหรือไม่มี flail chest ร่วมด้วย

5.1.1.13 มีแผลผ่าตัดหรือเนื้อเยื่อกำลังอยู่ในช่วงสมานตัว

5.1.2 ห้ามจัดทำหัตถ์ ในกรณี

5.1.2.1 intracranial pressure (ICP) > 20 mm Hg(59,60)

5.1.2.2 ผู้ป่วยที่ควรหลีกเลี่ยงการเพิ่มค่า ICP เช่น ผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดสมอง การผ่าตัดเส้นเลือด ผ่าตัดตา

5.1.2.3 ผู้ป่วยความดันโลหิตสูงที่ยังควบคุมไม่ได้

5.1.2.4 ท้องป่อง

5.1.2.5 ได้รับการผ่าตัดหลอดอาหาร

5.1.2.6 เพิ่งมีไอเป็นเลือดที่อาจมีผลจากมะเร็งปอดซึ่งได้รับการผ่าตัดหรือได้รับรังสีรักษา (59)

5.1.2.7 ผู้ป่วยที่ไม่สามารถควบคุมทางเดินหายใจได้ดี เช่น การคายอาหาร หรือเพิ่งได้รับอาหารก่อนหน้านี้เนื่องจากเสี่ยงต่อการสำลักได้ง่าย

5.1.3 ห้ามจัดทำหัตถ์สูงในผู้ป่วยความดันโลหิตต่ำหรือได้รับยารักษาหลอดเลือดอยู่

5.2 การใช้มือกระทำต่อทรวงอก นอกเหนือจากที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว ยังห้ามในกรณี

5.2.1 subcutaneous emphysema

5.2.2 เพิ่งได้รับการดมยาสลบหรือฉีดยาเข้าไขสันหลังยังการทำงานของระบบประสาทบริเวณไขสันหลัง

5.2.3 เพิ่งได้รับการผ่าตัดปลูกถ่ายผิวหนังหรือการยกปิดผิวหนังบริเวณทรวงอก

5.2.4 ผู้ป่วยไฟไหม้ น้ำร้อนลวก มีแผลเปิดและผิวหนังติดเชื่อบริเวณทรวงอก

5.2.5 เพิ่งได้รับการใส่ transvenous pacemaker หรือ subcutaneous pacemaker

5.2.6 ผู้ป่วยที่สงสัยว่าจะเป็นวัณโรคปอด

(pulmonary tuberculosis)

5.2.7 lung contusion

5.2.8 bronchospasm

5.2.9 osteomyelitis ของกระดูกซี่โครง

5.2.10 ภาวะกระดูกผุ (osteoporosis)

5.2.11 coagulopathy

5.2.12 ผู้ป่วยที่บ่นเจ็บปวดบริเวณผนัง

ทรวงอก

หมายเหตุ A หมายถึง ไม่จำเป็นต้องเป็นข้อห้าม แต่ให้พึงระวังเมื่อเวลาผ่านไปอย่างเหมาะสม

PDT 6.0 อันตราย/ ภาวะแทรกซ้อน

6.1 Hypoxemia

สิ่งที่ควรทำหรือมีความเป็นไปได้ในการทำทันที:

หากสังเกตพบหรือมีแนวโน้มจะเกิดภาวะ hypoxemia ให้เพิ่มความเข้มข้นของออกซิเจนขึ้น ถ้าผู้ป่วยเกิดภาวะนี้ขณะให้การรักษาย่อย ให้เพิ่มออกซิเจนเป็น 100% หยุดให้การรักษาทันที เปลี่ยนท่าทางที่จัดไว้เพื่อให้เป็นท่าพักเดิมเหมือนกับก่อนให้การรักษ และรีบติดต่อแพทย์ ต้องแน่ใจว่าผู้ป่วยได้รับ ventilation จากสิ่งแวดล้อมได้พอเพียงด้วยในขณะนั้น การหลีกเลี่ยงการเกิด Hypoxemia ในผู้ป่วยที่มี unilateral lung disease ในขณะจัด postural drainage สามารถจัดให้ปอดซีกที่มีปัญหาให้อยู่ด้านบนบนแทนด้านล่าง (20,22,48-50)

6.2 Increased Intracranial Pressure

สิ่งที่ควรทำหรือมีความเป็นไปได้ในการทำทันที:

หยุดให้การรักษ และเปลี่ยนท่าทางที่จัดไว้ให้เป็นท่าพักเดิมเหมือนกับก่อนให้การรักษ และรีบติดต่อแพทย์

6.3 Acute Hypotension during Procedure

สิ่งที่ควรทำหรือมีความเป็นไปได้ในการทำทันที:

หยุดให้การรักษ และเปลี่ยนท่าทางที่จัดไว้ให้เป็นท่าพักเดิมเหมือนกับก่อนให้การรักษ และรีบติดต่อแพทย์

6.4 Pulmonary Hemorrhage

สิ่งที่ควรทำหรือมีความเป็นไปได้ในการทำทันที:

หยุดให้การรักษ และเปลี่ยนท่าทางที่จัดไว้ให้เป็นท่าพัก

เดิมเหมือนกับก่อนให้การรักษ และรีบติดต่อแพทย์ทันที ให้อยู่กับผู้ป่วยโดยให้ออกซิเจนรองจนกว่าจะได้รับการปรึกษาเพิ่มเติม

6.5 Pain or Injury to Muscles, Ribs, or Spine

สิ่งที่ควรทำหรือมีความเป็นไปได้ในการทำทันที:

หยุดให้การรักษซึ่งคาดว่าจะเป็นที่ที่มีผลโดยตรงต่ออาการของผู้ป่วยขณะนั้น ให้ลองเคลื่อนไหวให้ผู้ป่วยเท่าที่จะทำได้ และติดต่อปรึกษาแพทย์

6.6 Vomiting and Aspiration

สิ่งที่ควรทำหรือมีความเป็นไปได้ในการทำทันที:

หยุดให้การรักษ ช่วยใหทางเดินหายใจโล่งด้วยการดูดเสมหะตามความจำเป็น ให้ออกซิเจน ทำใหทางเดินหายใจโล่ง เปลี่ยนท่าทางที่จัดไว้เพื่อให้เป็นท่าพักเดิมเหมือนกับก่อนให้การรักษ และติดต่อปรึกษาแพทย์ทันที

6.7 Bronchospasm

สิ่งที่ควรทำหรือมีความเป็นไปได้ในการทำทันที:

หยุดให้การรักษ เปลี่ยนท่าทางที่จัดไว้ให้เป็นท่าพักเดิมเหมือนกับก่อนให้การรักษ ให้อยู่กับผู้ป่วยโดยให้ออกซิเจนรองจนกว่าจะได้รับการปรึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการให้ bronchodilators.

6.8 Dysrhythmias

สิ่งที่ควรทำหรือมีความเป็นไปได้ในการทำทันที:

หยุดให้การรักษ เปลี่ยนท่าทางที่จัดไว้ให้เป็นท่าพักเดิมเหมือนกับก่อนให้การรักษ และรีบติดต่อแพทย์ทันที ให้อยู่กับผู้ป่วยโดยให้ออกซิเจนรองจนกว่าจะได้รับการปรึกษาเพิ่มเติม

PDT 7.0 ข้อจำกัด:

7.1 การรักษาด้วย PDT อย่างมีประสิทธิภาพนั้น ผู้รักษาดองประยุกต์ให้เหมาะสมกับรายงานทางการแพทย์ ในผู้ป่วยแต่ละคน ซึ่งอาจไม่สามารถให้การรักษได้ในทุกขั้นตอนที่ได้รับไว้

7.2 การทำใหทางเดินหายใจโล่งอาจไม่เต็มที่ในกรณีผู้ป่วยที่ไม่สามารถไอได้อย่างมีประสิทธิภาพ

7.3 การจัดทำทางเพื่อการระบายเสมหะ
ไม่สามารถทำได้ทุกครั้งที่ต้องการเมื่อผู้ป่วยอยู่ในสภาวะป่วย
หรือวิกฤติมาก

PDT 8.0 ความจำเป็นในการตรวจประเมิน:

ควรทำการตรวจประเมินดังต่อไปนี้เพื่อพิจารณา
ความจำเป็นในการรักษาด้วยเทคนิค postural drainage

8.1 เสมหะมากหรือน้อย

8.2 ไอมีประสิทธิภาพหรือไม่

8.3 ประวัติที่เกี่ยวข้องกับปัญหาของปอดซึ่งเคย
ได้รับการรักษาด้วย PDT แล้วมีอาการดีขึ้น ได้แก่ ภาวะ
bronchiectasis, cystic fibrosis, lung abscess

8.4 เสียง breath sounds ลดลง หรือ crackles
หรือ rhonchi ทำให้แน่ใจได้ว่ายังมีเสมหะอยู่

8.5 มีการเปลี่ยนแปลงค่าสัญญาณชีพ

8.6 ภาพถ่ายทางรังสีทรวงอกบ่งบอกถึงความ
ผิดปกติ เช่น atelectasis, mucus plugging, หรือ infiltrates

8.7 ค่า arterial blood gas หรือ oxygen saturation ลดลงกว่าเดิม

PDT 9.0 ผลของการตรวจประเมิน:

ผลของการตรวจประเมินต่อไปนี้นี้เป็นเพียงตัวแทน
ข้อมูลในผู้ป่วยรายบุคคลที่มีอาการดีขึ้นจากการรักษา
แต่ไม่ได้หมายรวมทั้งหมดทั้งนี้ผู้ป่วยบางสภาวะได้แก่
ผู้ที่ได้รับการคาเครื่องช่วยหายใจอาจไม่ได้ผลการรักษา
ดังที่ตั้งเป้าหมายไว้ เช่น ผู้ที่คาเครื่องช่วยหายใจอาจยัง
คงมีเสมหะมากกว่า 30 mL/วัน ก็ตามแต่มีผลการรักษา
อื่นๆ ดีขึ้น เช่น breath sounds ฟังได้มากขึ้น ภาพถ่าย
ทางรังสีดีขึ้น หรือมี compliance ปอดขยายตัวมากขึ้น
และแรงด้านการหายใจน้อยลง

9.1 ผลการเปลี่ยนแปลงปริมาณเสมหะ

ถ้าพบว่าผู้ป่วยที่ได้รับน้ำอย่างเต็มที่แล้ว แต่การ
รักษาด้วย PDT สามารถช่วยขับเสมหะออกมาได้ใน
ปริมาณที่น้อยกว่า 25 mL/วัน นับว่าการทำ PDT ยังไม่มี
ประสิทธิภาพเพียงพอ (3,5,7,9,11,12,38,40,46,51-53)
ทั้งนี้เนื่องจากแม้ว่าตามปกติผู้ป่วยที่ไม่ได้รับการรักษาด้วย

PDT ก็สามารถขับเสมหะออกได้เอง 15 to 30 mL/วัน
หรืออาจมากถึง 70 or 100 mL/วัน ถ้าการรักษาด้วย PDT
ไม่สามารถเพิ่มการขับเสมหะออกได้มากกว่า 30 mL/
วันนับเป็นตัวบ่งชี้ว่าไม่ได้ผลในการรักษา เพราะตามปกติ
นั้นเสมหะจะถูกขับออกมาได้มากนั้นเป็นผลมาจากระบบ
ต่างๆ ต้องได้รับน้ำมากด้วย การรักษาด้วยวิธี PDT
จึงควรให้เมื่อร่างกายผู้ป่วยได้รับน้ำมากพอด้วย
อย่างน้อย 24 ชั่วโมงเป็นต้นไป

9.2 การเปลี่ยนแปลง breath sounds บริเวณปอด ส่วนที่ต้องการรักษา

การรักษาที่มีประสิทธิภาพนั้น เสียง breath
sounds อาจแย่ลงได้ภายหลังจากเสมหะเคลื่อนไปอยู่ใน
ท่อทางเดินหายใจที่มีขนาดใหญ่กว่าและทำให้เสียง rhon-
chi ดังมากขึ้น การเพิ่มขึ้นของเสียง adventitious breath
sounds สามารถบ่งชี้ได้ว่าอาการดีขึ้นหรือไม่ โดยฟัง
พบว่า breath sounds ไม่มีแล้วหรือลดลง และเป็นไปได้
ที่การไออย่างมีประสิทธิภาพสามารถทำให้ adventitious
breath sounds ซดขึ้น

9.3 อาการแสดงของผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการ รักษา

ควรถามความรู้สึกก่อน ขณะ และหลังการรักษา
ว่ารู้สึกอย่างไร นอกจากนี้ต้องทราบความรู้สึกเกี่ยวกับ
ความเจ็บปวด ความไม่สบาย หายใจตื้น วิงเวียน และ
ง่วงเหงาหาวนอน เพื่อช่วยในการตัดสินใจว่าควรหยุด
ให้การรักษาหรือไม่ ซึ่งอาจพิจารณาให้เพียงการขับ
เสมหะด้วยวิธีง่าย ๆ เพื่อช่วยให้ปอดโล่งได้ ซึ่งเป็นการ
เพิ่มปริมาตรของเสมหะในช่วงระหว่างและหลังการรักษา
ที่ยังต้องการอย่างต่อเนื่องไปก่อน

9.4 การเปลี่ยนแปลงค่าสัญญาณชีพ

ต้องหยุดการรักษาทันทีเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงค่า
อัตราการหายใจ และ/ หรือชีพจรในระดับปานกลาง
หัวใจเต้นช้าลง หัวใจเต้นเร็วขึ้น หรือชีพจรเพิ่มขึ้นอย่าง
ไม่สม่ำเสมอ หรือค่าความดันโลหิตลดลงหรือสูงขึ้นอย่าง
ผิดปกติ

9.5 การเปลี่ยนแปลงผลภาพถ่ายทางรังสีบริเวณ ทรวงอก

พบมี atelectasis น้อยลงซึ่งแสดงว่าได้ผลในการ
ระบายเสมหะดีขึ้นอย่างช้าๆ

9.6 การเปลี่ยนแปลงค่า arterial blood gas หรือ oxygen saturation

ภาวะออกซิเจนมากขึ้นเมื่อพบว่า atelectasis
ลดลง

9.7 การเปลี่ยนแปลงตัวแปรที่เกี่ยวข้องกับเครื่อง ช่วยหายใจ

atelectasis และ plugging สามารถลด resistance
และเพิ่ม compliance ของปอดได้ดี

PDT 10.0 ทรัพยากร:

10.1 เครื่องมือ

10.1.1 เตียงหรือโต๊ะที่ปรับพิสัยให้
ศีรษะสูง ขึ้นหรือต่ำลงได้

10.1.2 หมอน

10.1.3 ผ้าขนหนูบางๆ สำหรับคลุมบริเวณ
ทรวงอกที่ต้องทำการเคาะปอด

10.1.4 ถาดหรือผ้าอ้อมสำหรับใส่เสมหะ

10.1.5 อุปกรณ์ดูดเสมหะ

10.1.6 อุปกรณ์ป้องกันการติดเชื้อ เช่น
ถุงมือ แวนดา เสื้อกาวน์ และผ้าคลุมจมูก

10.1.7 อาจมีอุปกรณ์สำหรับเคาะหรือสั่น
ปอดแบบพกพา

10.1.8 เครื่องช่วยหายใจที่มีออกซิเจน
ด้วย

10.1.9 ผลภาพถ่ายทางรังสีของทรวงอก
ครั้งล่าสุด

10.1.10 stethoscope สำหรับฟังเสียงปอด

10.2 บุคลากร

จำเป็นต้องให้ความรู้และทักษะปฏิบัติตามระดับต่างๆ
แก่บุคลากรที่จะทำการรักษาด้วยการทำ postural drain-
age และต้องได้รับการประกันโดยผ่านการรับรอง
คุณภาพตามระดับต่างๆ ที่ได้รับการฝึกอบรมทางด้าน
respiratory care มาโดยตรง ซึ่งได้แก่

10.2.1. ระดับ I กลุ่มบุคลากรที่ทำงาน
ประจำในการรักษาพยาบาล ทำหน้าที่รักษาพยาบาล
อย่างต่อเนื่องเพื่อให้ผู้ป่วย บุคลากรกลุ่มนี้ควรได้รับการ
พัฒนาความรู้และทักษะต่อไปนี้

10.2.1.1 เทคนิค PDT ที่ถูกต้อง
และเหมาะสมกับผู้ป่วย

10.2.1.2 การใช้อุปกรณ์อย่าง
เหมาะสม

10.2.1.3 เทคนิคการหายใจและ
การไออย่างมีประสิทธิภาพ

10.2.1.4 เทคนิคการประยุกต์
ทักษะกรณีเกิดปฏิกิริยาตอบสนองที่ผิดปกติ

10.2.1.5 การปรับท่าทางหรือ
ความถี่เมื่อมีการตอบสนองจากผู้ป่วยในลักษณะอาการ
ต่างๆ อย่างรุนแรง

10.2.1.6 ตรวจประเมินสภาวะ
ผู้ป่วยและการตอบสนองต่อการรักษา เช่น การฟังและ
การพิจารณาค่าสัญญาณชีพ รวมทั้งการทดสอบ expira-
tory flow หรือเครื่องช่วยหายใจ

10.2.1.7 ความสามารถในการ
หยั่งรู้และตอบสนองต่ออาการตอบสนองที่เปลี่ยนแปลงและ
ภาวะแทรกซ้อน

10.2.1.8 ความเข้าใจและปฏิบัติ
ตามหลัก Universal Precautions

10.2.2 สำหรับการตรวจประเมินเริ่มต้น
และการดูแลผู้ป่วยที่มีอาการไม่คงที่ ควรเป็นบุคลากร
ระดับ II ซึ่งมีความรู้เกี่ยวกับ

10.2.2.1 ความรู้เกี่ยวกับการใช้
และข้อจำกัดของเครื่องมือ

10.2.2.2 มีความสามารถในการ
ตรวจประเมินสภาวะและการตอบสนองต่อการรักษา

10.2.2.3 มีความสามารถในการ
ตรวจร่างกายด้วยการฟังและวิเคราะห์สัญญาณชีพ

10.2.2.4 มีความรู้เกี่ยวกับผล
ของแรงโน้มถ่วงของโลกและท่าทางของร่างกายที่เกี่ยวข้อง
กับ ventilation, perfusion, และ sputum mobilization

10.2.2.5 มีความรู้เกี่ยวกับ
ขั้นตอนวิธีการ ข้อบ่งชี้ ข้อห้าม และอันตรายที่เกิดขึ้น

ได้จากการฝึกตัวผู้ป่วย

10.2.2.6 มีความรู้เกี่ยวกับการจัดทำมาตรฐานในการระบายเสมหะ (standard drainage positions) เทคนิคการเคาะและการสั่น กายวิภาคศาสตร์ของท่อทางเดินหายใจและแขนงข้อปอด

10.2.2.7 ความสามารถในการสอนวิธีการหายใจด้วยกะบังลม การผ่อนคลาย การไอพ่นลม (huff cough), forced expiration technique (FET) และการดูดเสมหะ

10.2.2.8 ความสามารถในการเฝ้าระวังผลและการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงเทคนิคการจัดท่าทางและการรักษาด้วยวิธีการระบายเสมหะวิธีอื่นๆ

10.2.2.9 มีความเข้าใจและสามารถในการควบคุมและป้องกันภาวะติดเชื้อตามหลักการ Universal Precautions เกี่ยวกับการรักษาและควบคุมความสะอาดของเครื่องมือ

10.2.2.10 มีความสามารถในการสอนผู้ป่วย ครอบครัวผู้ป่วย รวมทั้งผู้ดูแลให้บรรลุตามเป้าหมายในการรักษาด้วย PDT และการรักษาอื่นๆที่เกี่ยวข้อง

10.2.2.11 มีความรู้อย่างถูกต้องในการใช้เครื่องมือที่ใช้ในการดูดเสมหะ

10.2.2.12 สามารถเตรียม วัด และผสมผสานวิธีการทางการแพทย์ได้

10.2.2.13 สามารถทำความสะอาดเครื่องมือได้

10.2.2.14 มีความรู้เกี่ยวกับเทคนิคการหายใจและการไอ

10.2.2.15 สามารถประยุกต์ใช้เทคนิคในการรักษาได้ในกรณีที่ผู้ป่วยมีอาการแย่ลง

10.2.2.16 สามารถประยุกต์ใช้ปริมาณหรือความถี่อย่างเหมาะสมกับผู้ป่วยที่มีอาการร้ายแรง

10.2.3 บุคลากรที่มีหน้าที่เกี่ยวกับการให้การรักษา PDT ควรมีความรู้และทักษะทางด้านต่อไปนี้

10.2.3.1 บริหารจัดการเทคนิคการรักษาได้อย่างถูกต้อง

10.2.3.2 ใช้เครื่องมือได้อย่างเหมาะสม

10.2.3.3 ใช้เทคนิคการหายใจและการไอได้อย่างถูกต้อง

10.2.3.4 ประยุกต์ใช้เทคนิคอื่นๆ ทางการแพทย์ได้เมื่อผู้ป่วยมีอาการแย่ลง

10.2.3.5 สามารถประยุกต์ใช้ปริมาณหรือความถี่อย่างเหมาะสมกับผู้ป่วยที่มีอาการร้ายแรง

PDT 11.0 การเฝ้าระวัง:

ในการเฝ้าระวังผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วย PDT ทั้งก่อน ขณะ และหลังการรักษา มีข้อควรปฏิบัติที่เหมาะสมดังนี้

11.1 สังเกตอาการตอบสนองของผู้ป่วย เมื่อได้รับการรักษา PDT เช่น อาการเจ็บปวด ความไม่สบายหายใจติดขัด

11.2 ตรวจสอบอัตราการเต้นของชีพจร อัตราเต้นหัวใจที่ไม่เป็นจังหวะ และอ่านค่าคลื่นไฟฟ้าหัวใจ (EKG)

11.3 รูปแบบและอัตราการหายใจ ความสมมาตรของการขยายตัวของทรวงอกสองข้าง การเคลื่อนไหวอย่างสัมพันธ์กันระหว่างทรวงอกและท้อง flail chest

11.4 เสมหะที่ผู้ป่วยขับออก (ปริมาณ สี ความสม่ำเสมอในการขับออก และกลิ่น) และการไออย่างมีประสิทธิภาพ

11.5 การทำงานของความคิดและสมอง

11.6 สีผิว

11.7 เสียงหายใจ

11.8 ความดันโลหิต

11.9 ความอิ่มตัวของออกซิเจนด้วยการใช้ pulse oximetry (กรณีผู้ป่วยเกิดภาวะพร่องออกซิเจน)

11.10 ค่าความดันในโพรงสมอง [intracranial pressure (ICP)]

PDT 12.0 ความถี่:

ความถี่ที่ให้ข้อเสนอแนะนี้ได้มาจากการยอมรับในกลุ่มผู้ที่มีประสบการณ์ในการรักษาผู้ป่วยมาแล้ว

อย่างไรก็ตามผู้ดูแลควรตรวจประเมินอย่างระมัดระวัง และตัดสินใจอย่างรอบคอบในการรักษา

12.1 การพลิกตัว

กรณีผู้ป่วยที่ได้รับการคาเครื่องช่วยหายใจและผู้ป่วยวิกฤติ: พลิกได้เท่าที่จำเป็น เช่น ทุก 1 ชั่วโมงหรือมากกว่าตามวงรอบ หากเป็นผู้ป่วยไม่เจ็บปล้นอาจพลิกได้ทุก 2 ชั่วโมง

12.2 การรักษาด้วยการจัดทำเพื่อระบายเสมหะ (PDT)

12.2.1 ในผู้ป่วยวิกฤติ รวมทั้งผู้ป่วยที่ได้รับการคาเครื่องช่วยหายใจ: ควรให้การรักษาด้วย PDT ทุก 4-6 ชั่วโมง และควรประเมินผลการรักษาด้วย PDT ซ้ำทุก 48 ชั่วโมงเป็นอย่างน้อยขึ้นกับผลการตรวจประเมินและการรักษาในผู้ป่วยแต่ละราย

12.2.2 ในผู้ป่วยที่หายใจได้เอง: ควรให้ความถี่ในการรักษาอย่างเหมาะสมกับผู้ป่วยแต่ละราย

12.2.3 ในผู้ป่วยเจ็บปล้น: ควรได้รับการตรวจประเมินซ้ำทุก 72 ชั่วโมงหรือเมื่อพบอาการเปลี่ยนแปลงอื่นๆ

12.2.4 ผู้ป่วยที่กลับไปอยู่บ้านแล้ว: ควรได้รับการตรวจประเมินซ้ำทุกๆ 3 เดือนและเมื่อมีอาการเปลี่ยนแปลงอื่นๆ

PDT 13.0 การควบคุมการติดเชื้อ:

13.1 ใช้หลักการ Universal Precautions ให้สำเร็จ (64)

13.2 ใช้แนวปฏิบัติการควบคุมการติดเชื้อทุกระบบ

13.3 อุปกรณ์เครื่องมือทุกชิ้นที่ใช้กับผู้ป่วย ต้องปราศจากเชื้อ

จากแนวปฏิบัติทั้งหมดดังกล่าวมานี้ หากนักกายภาพบำบัดได้มีโอกาสสะสมทักษะประสบการณ์การทำงานของท่านในด้านนี้แล้ว เชื่อว่าผลการรักษาที่ผู้ป่วยได้รับ ย่อมมีประสิทธิภาพมากขึ้น ทั้งกับนักกายภาพบำบัดหรือบุคลากรที่เกี่ยวข้องเองยังเกิดเจตคติอันดีในการดูแลรักษาผู้ป่วยด้วยความรอบคอบและคำนึงถึงความปลอดภัยและชื่อเสียงในการปฏิบัติงานทางคลินิกของวิชาชีพกายภาพบำบัดอีกด้วย

REFERENCES

1. Pryor JA, Webber BA. An evaluation of the forced expiration technique as an adjunct to postural drainage. *Physiotherapy* 1979;65(10):305-7.
2. Bateman JRM, Newman SP, Daunt KM, Pavis D, Clarke SW. Regional lung clearance of excessive bronchial secretions during chest physiotherapy in patients with stable chronic airways obstruction. *Lancet* 1979;1:294-97.
3. Oldenburg FA, Dolovich MB, Montgomery JM, Newhouse MT. Effects of postural drainage, exercise, and cough on mucous clearance in chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis* 1979; 120: 739-45.
4. Bateman JRM, Newman SP, Daunt KM, Sheahan NF, Pavia D, Clarke SW. Is cough as effective as chest physiotherapy in the removal of excessive tracheo-bronchial secretions? *Thorax* 1981;36:683-87.
5. Sutton PP, Parker RA, Webber BA, Newman SP, Garland N, Lopez-Vidriero MT, et al. Assessment of the forced expiration technique postural drainage and directed coughing in chest physiotherapy. *Eur J Respir Dis* 1983;64:62-8.
6. DeBoeck C, Zinman R. Cough versus chest physiotherapy: a comparison of the acute effects on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1984;129: 182-84.
7. Rochester DF, Goldberg SK. Techniques of respiratory physical therapy. *Am Rev Respir Dis* 1980;122(2, Part 2):133-146.
8. Shapiro BA. Chest physical therapy administered by respiratory therapists. *Respir Care* 1981;26 (7):655-56.
9. Hodgkin JE. The scientific status of chest physiotherapy. *Respir Care* 1981;26(7):657-59.
10. Wanner A. Does chest physical therapy move

- airway secretions? *Am Rev Respir Dis* 1984;130: 701-2.
11. Kirilloff LH, Owens GR, Rogers RM, Mazzocco MC. Does chest physical therapy work? *Chest* 1985;88(3):436-44.
 12. Faling LJ. Pulmonary rehabilitation physical modalities. *Clin Chest Med* 1986;7(4):599-618.
 13. Lorin MP, Denning CR. Evaluation of postural drainage by measurement of sputum volume and consistency. *Am J Phys Med* 1974;50(5): 215-19.
 14. Cochrane GM, Webber BA, Clarke SW. Effects of sputum on pulmonary function. *Br J Med* 1977;2:1181-183.
 15. Wong JW, Keens TG, Warrnamaker EM, Crozier D, Levinson H, Aspin N. Effects of gravity on tracheal mucus transport rates in normal subjects and in patients with cystic fibrosis. *Pediatrics* 1977;60:146-52.
 16. May DB, Munt PW. Physiologic effects of chest percussion and postural drainage in patients with stable chronic bronchitis. *Chest* 1979;75(1): 29-32.
 17. Mackenzie CF, Shin B, Hadi F, Imle PC. Changes in total lung/thorax compliance following chest physiotherapy. *Anesth Analg* 1980;59(3):207-10.
 18. Murphy MB, Concannon D, Fitzgerald MX. Chest percussion: help or hindrance to postural drainage? *Irish Med J* 1983;76(4):189-90.
 19. Miller RD, Fowler WS, Helmholtz F. Changes of relative volume and ventilation of the two lungs with change to the lateral decubitus position. *J Lab & Clin Med* 1956;47(2):297-304.
 20. Zack MB, Pontoppidan H, Kazemi H. The effect of lateral positions on gas exchange in pulmonary disease. A prospective evaluation. *Am Rev Respir Dis* 1974; 110:49-55.
 21. Piehl MA, Brown RS. Use of extreme position changes in acute respiratory failure. *Crit Care Med* 1976;4:13-4.
 22. Schimmel L, Civetta JM, Kirby RR. A new mechanical method to influence pulmonary perfusion in critically ill patients. *Crit Care Med* 1977;5:277-79.
 23. Coonan TJ, Hope CE. Cardio-respiratory effects of change of body position. *Can Anaesth Soc J* 1983; 30:424-37.
 24. Thoren L. Post-operative pulmonary complications: observations on the prevention by means of physiotherapy. *Acta Chir Scand* 1954;107: 193-205.
 25. Burrington J, Cotton EK. Removal of foreign bodies from the tracheobronchial tree. *J Pediatr Surg* 1972; 7:119-22.
 26. Lord GP, Hiebert CA, Francis DT. A clinical, radiologic and physiologic evaluation of chest physiotherapy. *J Maine Med Assoc* 1972;63: 142-45.
 27. Newton DAG, Stephenson A. The effect of physiotherapy on pulmonary function: a laboratory study. *Lancet* 1978;2: 228-30.
 28. MacKenzie CF, Shin B, McAslan TC. Chest physiotherapy: the effect on arterial oxygenation. *Anesth Analg* 1978;57: 28-30.
 29. Marini JJ, Pierson DJ, Hudson LD. Acute lobar atelectasis: a prospective comparison of fiberoptic broncho-scopy and respiratory therapy. *Am Rev Respir Dis* 1979;119:971-77.
 30. Stiller K, Geake T, Taylor J, Grant R, Hall B. Acute lobar atelectasis: a comparison of two chest physiotherapy regimens. *Chest* 1990;98: 1336-340.
 31. Chulay M, Brown J, Summer W. Effect of post-operative immobilization after coronary artery bypass surgery. *Crit Care Med* 1982;10:

- 176-79.
32. Douglas WW, Rehder K, Beynen FM, Sessler AD, Marsh HM. Improved oxygenation in patients with acute respiratory failure: the prone position. *Am Rev Respir Dis* 1977;115: 559-66.
 33. Gentilello L, Thompson DA, Ronnesen AS, Hernandez D, Kapadia AS, Allen SJ, et al. Effect of a rotating bed on the incidence of pulmonary complications in critically ill patients. *Crit Care Med* 1988;16: 783-86.
 34. Summer WR, Curry P, Haponik EF, Nelson S, Elston R. Continuous mechanical turning of intensive care unit patients shortens length of stay in some diagnostic-related groups. *J Crit Care* 1989;4: 45-53.
 35. Fink MP, Helsmoortel CM, Stein KL, Lee PC, Cohn SM. The efficacy of an oscillating bed in the prevention of lower respiratory tract infection in critically ill victims of blunt trauma: a prospective study. *Chest* 1990; 97:132-37.
 36. Pryor JA, Webber BA, Hodson ME, Batten JC. Evaluation of the forced expiration technique as an adjunct to postural drainage in treatment of cystic fibrosis. *Br Med J* 1979;2:417-18.
 37. Maloney FP, Fernandez E, Hudgel DW. Postural drainage: variability of patients' responses. *Arch Phys Med Rehabil* 1982;63: 423-26.
 38. Campbell AH, O'Connell JM, Wilson F. The effect of chest physiotherapy upon the FEV1 in chronic bronchitis *Med J Aust* 1975;1:33-5.
 39. Feldman J, Traver GA, Taussig LM. Maximal expiratory flows after postural drainage. *Am Rev Respir Dis* 1979;119:239-45.
 40. Wollmer P, Ursing K, Midgren B, Eriksson L. Inefficiency of chest percussion in the physical therapy of chronic bronchitis. *Eur J Respir Dis* 1985;66:233-39.
 41. Pavia D, Thomson ML, Phillipakos D. A preliminary study of the effect of a vibrating pad on bronchial clearance. *Am Rev Respir Dis* 1976; 113:92-6.
 42. Maxwell M, Redmond A. Comparative trial of manual and mechanical percussion technique with gravity-assisted bronchial drainage in patients with cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 1979;54:542-44.
 43. Holody B, Goldberg HS. The effect of mechanical vibration physiotherapy on arterial oxygenation in acutely ill patients with atelectasis or pneumonia. *Am Rev Respir Dis* 1981;124: 372-75.
 44. Radford R, Barutt J, Billingsley JG, Hill W, Lawson WH, Willich W. A rational basis for percussion augmented mucociliary clearance. *Respir Care* 1982;27(5):556-63.
 45. Barrell SE, Abbas HM. Monitoring during physiotherapy after open heart surgery. *Physiotherapy* 1978; 64(90):272-73.
 46. Connors AF, Hammon WE, Martin RJ, Rogers RM. Chest physical therapy: the immediate effect on oxygenation in acutely ill patients. *Chest* 1980;78(4):559-64.
 47. Hammon WE, Martin RJ. Chest physical therapy for acute atelectasis. *Phys Ther* 1981;61(2): 217-20.
 48. Hasan FM, Beller TA, Sobonya RE, Heller N, Brown GW. Effect of positive and expiratory pressure and body position in unilateral lung injury. *J Appl Physiol* 1982;52:147-54.
 49. Sonnenblick M, Melzer E, Rosin AJ. Body position effect on gas exchange in unilateral pleural effusion. *Chest* 1983;83(5):784-86.
 50. Heaf DP, Helms P, Gordon I, Turner HM. Postural effects on gas exchange in infants. *N Engl J Med* 1983;308(25):1505-508.

51. Anthonisen P, Riis P, Sigaard-Anderson T. The value of lung physiotherapy in the treatment of acute exacerbations in chronic bronchitis. *Acta Med Scand* 1964; 175:715-19.
52. Murray JF. The ketchup-bottle method. *N Engl J Med* 1979;300(20):1155-157.
53. Sutton PP, Pavia D, Bateman JRM, Clarke SW. Chest physiotherapy: a review. *Eur J Respir Dis* 1982;63:188-201.
54. Peters RM, Turnier E,. Physical therapy: indications for and effects in surgical patients. *Am Rev Respir Dis* 1980;122:147-54.
55. Tecklin J, Holsclaw D. Evaluation of bronchial drainage in patients with cystic fibrosis. *Phys Ther* 1975; 55:1081-84.
56. Cotton EK, Abrams G, Van Houtte J, Burrington J. Removal of aspirated foreign bodies by percussion and postural drainage. *Clin Pediatr* 1973;12:270-76.
57. Law D, Kosloske AM. Management of tracheo-bronchial foreign bodies in children: a reevaluation of postural drainage and bronchoscopy. *Pediatrics* 1976;58:362-67.
58. Raghu G, Pierson DJ. Successful removal of an aspirated tooth by chest physiotherapy. *Respir Care* 1986; 31:1099-1101.
59. Tyler ML. Complications of positioning and chest physiotherapy. *Respir Care* 1982;27:458-66.
60. MacKenzie CF, Ciesla N, Imle PC, et al. In: *Chest physiotherapy in the intensive care unit*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1990.
61. Van der Schans CP, Piers DA, Postma DS. Effects of manual percussion on tracheobronchial clearance in patients with chronic airflow obstruction and excessive tracheobronchial secretions. *Thorax* 1986;41:448-52.
62. Shapiro BA, Cane RD, Peterson J, Weber D. Authoritative medical direction can assure cost-beneficial bronchial hygiene therapy. *Chest* 1988;93:1038-42.
63. Eid N, Bucheit J, Neuling M, Phelps H. Chest physiotherapy in review. *Respir Care* 1991;36: 270-82.
64. Centers for Disease Control. Update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health care settings. *MMWR* 1988;37:377-88.

คอลัมน์ ถาม-ตอบ

กรณีศึกษาทางธนาคารเลือด

ปริยานาด วงศ์จันทร์

ประวัติผู้ป่วย

ผู้ป่วยหญิงอายุ 21 ปี จากหอผู้ป่วยนรีเวช ผู้ป่วยมีประจำเดือนมาก และแต่ละครั้งช้วนานถึง 12 วัน ผู้ป่วยมีอาการซีด ตรวจพบรอยช้ำที่แขนขา ผู้ป่วยมีประวัติเลือดหยุดยากเวลาถอนฟัน ต้องมีการเย็บแผลช่วยเพื่อหยุดเลือดออก มักมีรอยช้ำเกิดขึ้นบ่อยโดยไม่ทราบสาเหตุ และทราบว่ามารดาของผู้ป่วยต้องได้รับเลือดเมื่อให้กำเนิดเธอ

การตรวจทางห้องปฏิบัติการครั้งที่หนึ่ง

Hematocrit	33%
WBC	7100/cu.mm
Platelet	425,000/cu.mm
PT	12.5 second (normal <14)
PTT	44 second (normal <40)

การตรวจทางห้องปฏิบัติการครั้งที่สอง

Bleeding time	12 minutes (normal <7)
Ristocetin cofactor assay	25%
FVIII:c level	30%
FVIII:ag level	30%

วิจารณ์

1. เมื่อดูจากประวัติทางคลินิกพบว่าเลือดหยุดยาก มักมีรอยช้ำเกิดขึ้นโดยไม่ทราบสาเหตุ มีประจำเดือนคราวละมากๆ อาการต่างๆ ไม่ได้บ่งบอกว่าเกิดจากเกล็ดเลือดทำงานผิดปกติหรือมีการขาด coagulation protein จะมีก็เพียงผลการตรวจ PT, PTT ซึ่ง prolong เล็กน้อย ผู้ป่วยซีดแต่น่าจะเป็นผลสืบเนื่องจากการมีประจำเดือนคราวละมากๆ เป็นเวลานานทำให้เกิดภาวะ iron deficiency anemia ได้ ผลการ

ตรวจพบเกล็ดเลือดอยู่ในระดับปกติ ดังนั้นความเป็นไปได้เวลานี้มีสองกรณีคือ Von Willebrand's disease หรือเกล็ดเลือดทำงานผิดปกติ ดังนั้นการตรวจที่น่าจะทำได้ต่อไปคือ bleeding time

2. แม้ว่าอาการที่คลินิกจะคล้ายกัน แต่อุบัติการณ์ว่าเกิดจาก Von Willebrand's disease พบได้มากกว่า ในการยืนยันว่าใช่ ควรตรวจพิเศษเพิ่มเติมคือ Ristocetin cofactor assay และ VIII:c assay หากผลตรวจยืนยันว่าน่าจะใช้ กล่าวคือมีระดับต่ำทั้งสองกรณี ให้ตรวจวัดระดับ FVIII ต่อไป

3. ผู้ป่วยน่าจะถูกจัดให้อยู่ในโรค Von Willebrand's disease Type I ซึ่งเป็นชนิดที่พบมากที่สุดเป็นโรคทางพันธุกรรมถ่ายทอดแบบ autosomal dominant (มีการสร้าง vWF ที่ผิดปกติ จึงไม่สามารถทำหน้าที่ได้) การตรวจยืนยันใช้ระดับของ Ristocetin cofactor assay และ VIII:c บ่งชี้ กล่าวคือมีระดับต่ำ อย่างไรก็ตามเนื่องจากอาจได้รับยีนทั้งแบบ heterozygous หรือ homozygous ดังนั้นบางครั้งผลการตรวจจะไม่ชัดเจน บางทีอาจใช้การตรวจอื่นเพิ่มเติมเช่น การทำ SDS-agarose gel electrophoresis, การตรวจวัด platelet aggregation (ใช้ low-dose ristocetin, cryoprecipitate เป็น stimulant) เพื่อยืนยันโรค ซึ่งไม่จำเป็นต้องทำก็ได้เพราะการรักษาเหมือนกันในทุกแบบอยู่แล้ว

4. การรักษาไม่มีอะไรพิเศษ แต่ควรตรวจวัดความสามารถในการตอบสนองต่อ DDAVP เพื่อการรักษาในอนาคตหากเกิดปัญหาทางคลินิก โดยการให้ DDAVP (Desmopressin ช่วยทำให้ endothelial cell หลั่ง vWF และออกฤทธิ์กระตุ้น plasminogen ด้วย) ในขนาด 0.3 ug/kg ในเวลา 20 นาที หลังจากนั้น 20-30 นาที ตรวจ bleeding time การรักษาระยะยาวที่จำเป็นคือให้เหล็กเพื่อแก้ไขภาวะซีด นอกจากนี้ควรพิจารณาให้การรักษาเพื่อควบคุมระดับฮอร์โมนสำหรับเรื่องการมีประจำเดือนมากผิดปกติ

5. การรักษาเพื่อป้องกันสำหรับผู้ป่วยรายนี้คือไม่จำเป็นต้องให้ส่วนประกอบของเลือดถ้ากรณีผ่าตัดเล็ก เช่น ถอนฟัน แต่สามารถป้องกันเลือดหยุดยากด้วยการให้ DDAVP 0.3 ug/kg (ในขนาดที่สูงกว่านี้ก็ได้แต่ต้องไม่เกิน 24 ug) ผู้ป่วยอาจมีอาการหน้าแดง ปวดศีรษะ มึนงงและคลื่นไส้ได้เมื่อได้รับยา นอกจากนี้อาจให้ Epsilon-amino caproic acid (EACA) ร่วมด้วย (ขนาด 4g

ทุก 4 ชั่วโมง) ซึ่งจะช่วยลดอาการเลือดออก หากเป็นการผ่าตัดใหญ่หรือการคลอดบุตร พิจารณาให้ cryoprecipitate เพื่อป้องกันการขาด vWF โดยการตรวจวัดระดับ FVIII:c ก่อน เพื่อการพิจารณาปริมาณ cryoprecipitate ที่เหมาะสม ก็ระดับระดับให้อยู่ในช่วง 40-70% ระหว่างผ่าตัด พบว่าระดับจะลดลงได้อีกหลังการผ่าตัด

หรือหลังคลอดคือลดลงเป็น 30-40% ภายในหนึ่งสัปดาห์ และลดลงอีกเป็นประมาณ 10-15% เมื่อแผลหายสนิทดี สำหรับผ่าตัดเล็กหรือถอนฟัน ถ้าจำเป็นต้องได้รับ cryoprecipitate ให้พิจารณาให้ในปริมาณที่รักษาระดับอยู่ในช่วง 20-50% ในสัปดาห์แรกหลังผ่าตัด

คำแนะนำสำหรับผู้เขียน

วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ เป็นวารสารทางวิชาการของคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ยินดีพิจารณาบทความด้านเทคนิคการแพทย์ รังสีเทคนิค กิจกรรมบำบัด กายภาพบำบัด และด้านอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับงานด้านวิทยาศาสตร์สุขภาพ ซึ่งไม่เคยตีพิมพ์ในวารสารอื่นใดมาก่อน เพื่อลงตีพิมพ์ในวารสารนี้ สำหรับบทความที่ตีพิมพ์ในวารสารนี้แล้ว ถือว่าเป็นลิขสิทธิ์ของวารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ ดังนั้นเพื่อให้เกิดการตีพิมพ์ ดำเนินการไปได้อย่างรวดเร็วถูกต้อง ขอให้ผู้เขียนปฏิบัติ ดังนี้

ประเภทของบทความที่ลงตีพิมพ์ แบ่งเป็น 8 ประเภท คือ :-

1. บทบรรณาธิการ (EDITORIAL) เป็นบทความซึ่งวิเคราะห์ผลงานทางวิทยาศาสตร์ใหม่ๆ ที่มีความสำคัญในวิชาชีพเทคนิคการแพทย์ รังสีเทคนิค กิจกรรมบำบัด กายภาพบำบัด หรือวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องหรืออาจเป็นบทความซึ่งมีข้อเสนอแนะทางวิชาการโดยตรง แต่เป็นความคิดเห็นเพื่อประโยชน์ของการยกระดับวิชาชีพให้สูงขึ้น
2. นิพนธ์ต้นฉบับ (RESEARCH ARTICLE) เป็นรายงานผลงานวิจัยทางด้านที่เกี่ยวข้องโดยที่บทความนั้นยังไม่เคยตีพิมพ์ หรืออยู่ในระหว่างการตีพิมพ์ในวารสารอื่นใด
3. รายงานเทคนิคทางห้องปฏิบัติการ กายภาพบำบัด กิจกรรมบำบัด และรังสีเทคนิค (SHORT TECHNICAL REPORT) เป็นรายงานการประยุกต์ใช้เทคนิคการตรวจในห้องปฏิบัติการ หรือเทคนิคทางกายภาพบำบัด กิจกรรมบำบัด และรังสีเทคนิค โดยแสดงรายละเอียดทั้งวิธีการ และผลการให้เทคนิคนั้นๆ เปรียบเทียบกับวิธีเดิม รวมถึงการวิจารณ์และสรุปผล
4. นิพนธ์ปริทัศน์ (REVIEW ARTICLE) เป็นบทความที่รวบรวมเอาผลงานในเรื่องใดเรื่องหนึ่งโดยเฉพาะ ซึ่งเคยลงตีพิมพ์แล้วนำมาวิเคราะห์ วิจารณ์ เปรียบเทียบเพื่อให้เกิดความกระจ่างในเรื่องนั้นยิ่งขึ้น
5. บทความทั่วไป (GENERAL ARTICLE) เป็นบทความที่มีวิชาการเฉพาะทางรวมอยู่ค่อนข้างน้อย เขียนเพื่อให้บุคคลทั่วไปสามารถอ่านเข้าใจตลอด
6. บันทึก (NOTE) เป็นบทความ หรือรายงานผลงานวิจัยคล้ายข้อ 1 และข้อ 2 แต่มีความกะทัดรัดกว่าทั้งในเนื้อหาและรายละเอียด
7. ปกิณกะ (MISCELLANY) เป็นบทความทั่วไปที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมทางด้านวิทยาศาสตร์สุขภาพ เช่น การวิจารณ์ผลเวชศาสตร์ชั้นสูง การตอบปัญหาทางด้านเวชศาสตร์ชั้นสูง เป็นต้น
8. จดหมายถึงบรรณาธิการ (LETTER TO THE EDITOR) เป็นบทความทางวิชาการ หรืออื่นๆ ที่เป็นบันทึกสั้นๆ ในรูปของจดหมายถึงบรรณาธิการ เพื่อแสดงความคิดเห็น และประสบการณ์ในทางวิชาการ
9. ย่อเอกสาร (ABSTRACT) เป็นเรื่องย่อของบทความที่น่าสนใจและได้รับการตีพิมพ์แล้วในวารสารต่างๆ

คำแนะนำสำหรับการเตรียมต้นฉบับ

1. ภาษาที่ใช้ มี 2 ภาษาคือ ภาษาไทยและ/หรือภาษาอังกฤษ ต้นฉบับภาษาไทย ควรใช้ถ้อยคำและศัพท์ภาษาไทยให้มากที่สุดเท่าที่จะทำได้ โดยใช้ตามพจนานุกรมศัพท์แพทย์อังกฤษ-ไทยฉบับราชบัณฑิตยสถานเป็นบรรทัดฐาน คำศัพท์ภาษาอังกฤษที่บัญญัติเป็นภาษาไทยแล้วแต่ยังไม่เป็นที่ทราบกันอย่างแพร่หลาย หรือแปลแล้วเข้าใจยาก ให้ใส่ภาษาเดิมกำกับไว้ในวงเล็บหรืออนุโลมให้ใช้ภาษาอังกฤษได้
2. ต้นฉบับ ใช้กระดาษสีขาวขนาดค่อนข้างหนา ขนาด 8.5x11 นิ้ว พิมพ์หน้าเดียว เว้นระยะห่างระหว่างบรรทัด 2 ช่วง (2 spaces) ใช้โปรแกรมและตัวพิมพ์มาตรฐาน มีเลขที่หน้ากำกับทุกหน้า
3. ชื่อเรื่อง ให้มีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษเป็นข้อความสั้นๆ และสื่อความหมาย บ่งชี้ให้เห็นสาระสำคัญของเนื้อหาในบทความไม่ควรใช้คำย่อนอกจากคำย่อที่เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไป
4. ชื่อผู้แต่ง ให้ใส่ชื่อตัวและชื่อสกุลเต็มทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ กรณีที่ผู้แต่งหลายคนให้เรียงตามลำดับความสำคัญในงานนั้นๆ และให้ชื่อและสถานที่ติดต่อพร้อมหมายเลขโทรศัพท์, โทรสาร, หรือ E-mail address ของผู้รับผิดชอบบทความเพื่อการติดต่อได้สะดวก
5. นิพนธ์ต้นฉบับ ให้มีบทคัดย่อ (Abstract) ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ความยาวไม่เกิน 200 คำ โดยแบ่งเป็น 5 หัวข้อดังนี้ วัตถุประสงค์ ตัวอย่างทดสอบ วิธีการ ทดสอบ และสรุป ทั้งนี้ให้มีคำรหัส (Key word) ไม่เกิน 5 คำ
6. การจัดลำดับเนื้อเรื่องสำหรับนิพนธ์ต้นฉบับให้เรียงตามลำดับตามหัวข้อ ดังนี้ :-
 - * บทนำ (Introduction) ซึ่งรวมถึงวัตถุประสงค์หรือสมมติฐานในการศึกษา
 - * วัสดุและวิธีการ (Materials and Methods)
 - * ผล (Results)
 - * วิจารณ์ผล (Discussion)
 - * กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)
 - * เอกสารอ้างอิง (References)
7. กรณีที่งานวิจัยนั้น ได้รับทุนวิจัย ให้ระบุแหล่งที่มาของทุนวิจัยนั้นด้วย
8. การอ้างอิงเอกสารในเนื้อเรื่อง ให้อ้างอิงเรียงตามลำดับเลขที่ ของเอกสารอ้างอิงซึ่งอยู่ท้ายเรื่อง โดยใช้ตัวเลขแบบ superscript ต่อท้ายข้อความนั้นๆ

9. การเตรียมตาราง แผนภูมิ รูปภาพประกอบ

- ตาราง แผนภูมิ รูปภาพประกอบ ให้แยกไว้ต่างหาก โดยใช้กระดาษ 1 แผ่น ต่อ 1 ตาราง หรือ 1 แผนภูมิหรือ 1 รูปภาพ
- รูปถ่าย ให้ใช้ภาพถ่ายขาวดำ ขนาดโปสการ์ด (3"x5") ผิวหน้าเรียบ
- ภาพเขียน ให้เขียนด้วยหมึกดำอินเดีย (Indian ink) บนกระดาษอาร์ตที่หนาพอสมควร

- * คำอธิบายรูป ให้พิมพ์แยกไว้ต่างหาก ไม่พิมพ์ลงในรูปนั้นๆ และให้เขียนหมายเลขกำกับ ไว้ด้านหลังรูปด้วยดินสอ เนาๆ

บรรณาธิการวารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่

คณะเทคนิคการแพทย์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

โทรศัพท์ : (053) 945080 ต่อ 17

โทรสาร : (053) 946042

E-mail : preyanat@chiangmai.ac.th

สำเนาพิมพ์ (Reprint)

บทความที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารนี้ ผู้เขียนบทความจะได้รับวารสาร 1 เล่ม พร้อมสำเนาพิมพ์ (Reprint) จำนวน 5 ชุด

การเขียนเอกสารอ้างอิง

การเขียนเอกสารอ้างอิง ให้ใช้ตามระบบของที่ประชุมแวนคูเวอร์ (Vancouver) ดังต่อไปนี้ :-

เอกสารที่เป็นวารสาร

* เอกสารที่เป็นวารสาร ถ้าผู้นิพนธ์น้อยกว่า 6 คน ให้ใส่ชื่อผู้นิพนธ์ทุกคน ถ้าผู้นิพนธ์มากกว่า 6 คน ให้ใส่ชื่อ 3 คนแรกแล้วตามด้วย *et al* (ตัวเอียง) การเขียนชื่อผู้นิพนธ์ และเครื่องหมายวรรคตอน เป็นดังตัวอย่าง

Sorter NA, Wasterman TI, Austen KF. Cold urticaria : release into the circulation of histamine and eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis during cold challenge. N Engl J Med 1976; 294: 687-90.

* เอกสารที่เป็นวารสาร และมีผู้นิพนธ์เป็นกลุ่ม ให้เขียนดังตัวอย่าง

The Committee on Enzymes of the Scandinavian Society for Clinical Chemistry and Clinical Physiology. Recommended method for the determination of gamma-glutamyl transferase in blood. Scand J Clin Lab Invest 1976; 36: 119-25.

เอกสารที่เป็นหนังสือ

* สำหรับหนังสือที่มีผู้นิพนธ์คนเดียว ให้เขียนตัวอย่าง

Oaler AG. Complement Mechanisms and Functions. Englewood Cliffs : Prentice Hall, 1976.

* หนังสือที่มีผู้นิพนธ์หลายคน และมีบรรณาธิการ หรือหัวหน้าในการเขียน ให้เขียนดังตัวอย่างนี้

Rhodes AJ, van Rooyan CE (eds). Textbook of Virology for Students and Practitioners of Medicine and Their Health Sciences. 5th ed, Baltimore : Williams and Wilkins, 1967.

* หนังสือที่มีผู้นิพนธ์เป็นกลุ่มในหน่วยงาน ให้เขียนดังตัวอย่าง

American Medical Association Department of Drugs. AMA Drug Evaluations. 3rd ed, Littleton : Publishing Sciences Group, 1977.

* การอ้างเฉพาะบทใดบทหนึ่งในหนังสือ ให้เขียนดังตัวอย่าง

Weinstein L, Swartz MN. Pathogenic properties of invading microorganisms. In : Sodeman WA Jr, Sodeman WA (eds), Pathologic Physiology: Mechanisms of Disease. Philadelphia : WB Saunders, 1974: 457-72.

* รายงานของหน่วยงานที่ตีพิมพ์เป็นปกติ ให้เขียนดังตัวอย่าง

National Center of Health Statistics. Acute conditions : Incidence and associated disability, United States, July 1968-June 1969.

National Center for Health Statistics. 1972. (Vital and health statistics. Series: 10: Data from the National Health Survey No: 69) (DHEW publication No (HSM) 72-1037).

* หนังสือรายเดือน รายปี ให้เขียนดังตัวอย่าง

Roueché B. Annals of Medicine : The Santa Claus culture. The New Yorker 1971. Sept 4: 66-81.

* หนังสือพิมพ์รายวัน ให้เขียนดังตัวอย่าง

Shaffer RA. Advances in chemistry are starting to unlock mysteries of the brain : discoveries could help cure alcoholism and insomnia, explain mental illness. How the messengers works. Wall Street Journal 1977. Aug 12: 1 (col 1), 10 (col 1).

ข้อมูลจาก Web Site ให้เขียนดังตัวอย่าง

The National Association for Proton Therapy (NAPT). 2000. "Background of Proton Therapy". (online). 22 March. Available [http://www.proton-therapy.org/\(7November 2000\)](http://www.proton-therapy.org/(7November 2000)).

ข้อคิดเห็นใดๆ ในบทความ หรือเรื่องที่ตีพิมพ์ในวารสารนี้ เป็นข้อคิดเห็นส่วนตัวของผู้เขียนมิได้เกิดจาก

บรรณาธิการ หรือผู้จัดทำ แต่อย่างใด

**ใบบอกรับเป็นสมาชิก
วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่**

ที่.....

วันที่.....

ถึง บรรณาธิการวารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่

ข้าพเจ้ายินดีบอกรับเป็นสมาชิกวารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่

โปรดจัดส่งวารสารถึงข้าพเจ้า ดังนี้

นาม.....สำนักงาน.....

บ้านเลขที่.....ถนน.....

ตำบล.....อำเภอ.....

จังหวัด.....

ข้าพเจ้าได้ส่งเงิน จำนวน.....บาท (.....)

สำหรับเป็นค่าบำรุงสมาชิก () รายปี () ตลอดชีพ ส่งจ่ายในนามเหรียญกฐนวารสารเทคนิคการแพทย์
เชียงใหม่ ปณ. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ มาพร้อมกับแบบฟอร์มนี้แล้ว

ลงชื่อ.....

(.....)

หมายเหตุ	ค่าบำรุงสมาชิกรายปี	200	บาท
	ค่าบำรุงสมาชิกตลอดชีพ	1,000	บาท

