



Journal of the Medical Technologist

Association of Thailand

วารสารเทคนิคการแพทย์

Vol. 48 No. 1 April 2020

ปีที่ 48 ฉบับที่ 1 เมษายน 2563

CONTENTS



Review Article

- Medical Technologist Role in Dengue Fever Patients with Disseminated Intravascular Coagulation (DIC) 7205
*Waraporn Somwong
Akemane Pattanapitpaisarn and
Panjit Phothong*

Original Articles

- Genotypic Distribution of Hepatitis C Virus in Human Immunodeficiency Virus-infected Patients in Bamrasnaradura Infectious Diseases Institute 7215
*Somkid Srisopa
Duangnate Pipatsatitpong and
Chareeporn Akekawatchai*
- PRAME Gene Expression in Thai Acute Myeloid Leukemia and Disease Correlations 7227
*Tichayapa Phojanasenee and
Sawang Petvises*
- Prevalence of Colistin Resistance among Third Generation Cephalosporins- or Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Isolated from Clinical Specimens in Ratchaburi Hospital, Thailand 7240
*Puncharat Wongut-sa
Pradchama Khumdee
Worada Samosornsuk
Jiraporn Yansombat and
Seksun Samosornsuk*

- Detection of Yeasts from Cockroaches' Intestine by Polymerase Chain Reaction (PCR) Techniques and DNA Sequencing in Internal Transcribed Spacer 1 and 2 (ITS1-2) 7253
*Patcharee Kammarnjassadakul
Natamon Nooin
Pattaranit Amphornritthisak
Pennapa Chamavit and
Watcharin Rangsipanuratn*
- Effects of Cadmium on Peptide Profiles and Biotyper Score Value of *Escherichia coli* O157:H7 Identified by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass-Spectrometry (MALDI-TOF/MS) 7264
*Kornkanok Wongprasert
Supitcha Pannengetch
Tuangrat Kumar
Pennapaporn Songthong
Nitaya Indrawattana and
Patcharee Isarankura-Na-Ayudhya*
- Evaluation of Blood Chemistry Stability Using Vacuum Blood Collection Tube 7281
*Ornanong Patsri
Nopparat Keawhanam
Kesorn Butruang and
Supasiri Sutthisom*
- The Administration according to McKinsey's 7S Framework of Medical Laboratory in the First-level Hospital, Ministry of Public Health in Health Region 11, Thailand 7296
*Thaveesak Sai-ong
Supreecha Kaewsawat and
Wiyada Kwanhian*



ISSN 0125-2682

**An Official Publication of
The Association of Medical Technologist of Thailand
under the Royal Patronage of HRH Princess Soamsawali
สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย ในพระอุปถัมภ์
พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ**



AEC Healthcare
A 3N HOLDING COMPANY

44/6 Suthisarnvinitchai Rd., Samsennok, Huay Kwang, Bangkok 10310 Tel : (66) 0 2274 8867-9 Fax : (66) 0 2274 8870

CLINICAL CHEMISTRY

IMMUNOASSAY SYSTEM

HEMATOLOGY



sysmex

BX-4000

Throughput : 400 test/h
Sample barcode reader (Basic) : LASER
Sample volume : 2.0 - 35ul (0.1ul step)
Total reaction volume : 150ul ~ 450ul

HISCL-5000

Processing Capacity 200 tests per hour

XN-Series

Automated Hematology Analyzer

อ่านค่าเตือนในจอภาพและเอกสารกำกับเครื่องมือแพทย์ก่อนใช้
หมายเหตุ : โฆษณาต่อผู้ประกอบการวิชาชีพทางการแพทย์ และสาธารณสุข
ใบอนุญาตเลขที่ : สมพ.400/2562

www.aechealthcare.com

[f aechealthcare](https://www.facebook.com/aechealthcare)

[y aechealthcare](https://www.youtube.com/aechealthcare)

info@aechealthcare.com

gibthai
A 3N HOLDING COMPANY

VERSANT kPCR

molecular system

SPECIFICATION

Footprint	~1.4 m ² (16 ft ²)
Sample capacity	89-94
Consumables	Moderate
Ready-to-use reagents	Yes
Manual labor (48 samples)	34 minutes
Open system capability	Yes, with VERSANT MiPLX Software Solution

NOTICE

The warning on the label and accompanying documents before use.



หมายเหตุ : โฆษณาต่อผู้ประกอบการวิชาชีพทางการแพทย์ และสาธารณสุข
ใบอนุญาตเลขที่ : สมพ.429/2562

CONTACT FOR INFORMATION
(66) 0 2274 8331

www.gibthai.com/laboratory

[f gibthai](https://www.facebook.com/gibthai)

[@gibthai](https://www.instagram.com/gibthai)

จัดจำหน่ายและนำเข้าโดย บริษัท กิบทัย จำกัด

อาคาร กรีน โอเดียน เวิลด์ 44/6 ถนนสุขุมวิทซอย 10 แขวงสามเสนนอก เขตห้วยขวาง กรุงเทพฯ 10310



วารสาร เทคนิคการแพทย์

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย
ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

ปีที่ 48 ฉบับที่ 1 เมษายน 2563

วารสารเทคนิคการแพทย์ ขอเรียนเชิญผู้แต่งส่งบทความมาตีพิมพ์ในวารสารเทคนิคการแพทย์ ซึ่งสามารถส่งบทความได้ทั้งรูปแบบภาษาไทยและภาษาอังกฤษ โดยลงทะเบียนเพื่อส่งบทความเข้าสู่ระบบออนไลน์ Thai Journals online (ThaiJo 2) ที่ <https://www.tci-thaijo.org/index.php/jmt-amtt/index> เท่านั้น และเลือก “สำหรับผู้แต่ง” เพื่อศึกษาการเตรียมต้นฉบับบทความประเภทต่างๆ ของวารสารฯ ก่อนเลือก “ส่งบทความ” เข้าสู่ระบบออนไลน์

สำหรับบทความในวารสารฉบับนี้ ประกอบด้วย บทความปริทัศน์ จำนวน 1 เรื่อง คือ เรื่อง “บทบาทของนักเทคนิคการแพทย์ในการดูแลรักษาผู้ป่วยไข้เลือดออกเดงกีที่มีภาวะเลือดแข็งตัวในหลอดเลือดแบบแพร่กระจายร่วมด้วย” บทความนิพนธ์ต้นฉบับ (Original article) จำนวน 7 เรื่อง ซึ่งประกอบด้วย บทความภาษาอังกฤษ 2 เรื่อง และบทความภาษาไทย 5 เรื่อง โดยเนื้อหาของบทความ จัดตามกลุ่มวิชาดังนี้ 1) บทความทางด้านจุลชีววิทยาคลินิก จำนวน 1 เรื่อง 2) บทความทางด้านปรสิตวิทยา จำนวน 1 เรื่อง 3) บทความทางด้านไวรัสวิทยา จำนวน 1 เรื่อง 4) บทความทางด้านเคมีคลินิก จำนวน 2 เรื่อง และ 5) บทความทางด้านบริหารห้องปฏิบัติการ จำนวน 1 เรื่อง

สมชาย วิริยะยุทธกร
บรรณาธิการวารสารเทคนิคการแพทย์



วารสาร โรคติดเชื้อแพทย

สมาคมโรคติดเชื้อแห่งประเทศไทย
ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

ปีที่ 48 ฉบับที่ 1 เมษายน 2563

สารบัญ

บทความปริทัศน์

- บทบาทของนักเทคนิคการแพทย์ในการดูแลผู้ป่วยไข้เลือดออกเดงกี ที่มีภาวะเลือดแข็งตัวในหลอดเลือดแบบแพร่กระจายร่วมกับ
วารกรณ์ สมวงษ์
เอกมณี พัฒนพิทธิไพศาล และ
ปานจิต โพธิ์ทอง 7205

นิพนธ์ต้นฉบับ

- การกระจายตัวของจีโนไทป์เชื้อไวรัสตับอักเสบบีในผู้ติดเชื้อไวรัสเอชไอวีที่เข้ารับการรักษาในสถาบันบำราศนราดูร
สมคิด ศรีโสภา
ดวงเนตร พิพัฒน์สถิตพงศ์ และ
จิรภรณ์ เอกวัฒน์ชัย 7215
- การแสดงออกของยีน PRAME ในผู้ป่วยไทยที่เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันแบบมัยอีลอยด์ และความสัมพันธ์กับโรค
ธิชยาภา พจนเสนี และ
สว่าง เพชรวิเศษ 7227

- ความชุกของการดื้อยาโคลิสตินของแบคทีเรีย *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อ
ยาในกลุ่ม Third Generation Cephalosporins หรือคาร์บาเพนิมที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของ
ผู้ป่วยในโรงพยาบาลราชบุรี
บุญธรรม วัฒนสุธา
ปรัชมา คำดี
วรดา สโมรสสุข
จิราภรณ์ ญาณสมบัติ และ
เสกสรรค์ สโมรสสุข 7240
- การตรวจหาเชื้อยีสต์จากลำไส้ของแมลงสาบโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสและการหาลำดับเบสบริเวณ Internal Transcribed Spacer 1 และ 2 (ITS1-2)
พัชรี กัมมารเจษฎากุล
ณฐมน หนูอินทร์
ภัทรนิษฐ์ อัมพรฤทธิศักดิ์
เพ็ญญา ชมะวิต และ
วัชรินทร์ รัชฎาญรัตน์ 7253



วารสาร เทคนิคการแพทย์

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย
ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

ปีที่ 48 ฉบับที่ 1 เมษายน 2563

สารบัญ

- ผลกระทบของแคดเมียมต่อรูปแบบ 7264
การแสดงออกของเปปไทด์และค่าคะแนน
biotyper ในการวิเคราะห์หาชนิดเชื้อ
Escherichia coli O157:H7 ด้วยเครื่อง
Matrix-Assisted Laser Desorption/
Ionization Time-of-Flight Mass-
Spectrometry (MALDI-TOF MS)
กรกนก วงศ์ประเสริฐ
สุพิชฌาย์ ปั่นเหน่งเพชร
ดวงรัตน์ กุมาร
เพ็ญภาพร ทรงทอง
นิตยา อินทรวัดนา และ
พัชรวิ อิศรางกูร ณ อยุธยา
- การศึกษาความคงทนของผลตรวจ 7281
วิเคราะห์สารชีวเคมีในเลือดโดยใช้หลอด
เก็บเลือดสุญญากาศ
อรอนงค์ พัฒศรี
นพรัตน์ แก้วหามาน
เกษร บุตรเรือง และ
ศุภสิริ สุทธิสม
- การบริหารจัดการองค์กรตามกรอบ 7296
แนวคิด McKinsey's 7S ของห้อง
ปฏิบัติการทางการแพทย์ โรงพยาบาล
ชุมชนสังกัดกระทรวงสาธารณสุข
เขตสุขภาพที่ 11
ทวิศักดิ์ สายอ่อง
สุปรียา แก้วสวัสดิ์ และ
วิดา กวานเทียน



วารสาร เทคนิคการแพทย์

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย
ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

Vol. 48 No. 1 April 2020

CONTENTS

Review Article

- Medical Technologist Role in Dengue 7205
Fever Patients with Disseminated
Intravascular Coagulation (DIC)
Waraporn Somwong
Akemanee Pattanapitpaisarn and
Panjit Phothong

Original Articles

- Genotypic Distribution of Hepatitis 7215
C Virus in Human Immunodeficiency
Virus-infected Patients in Bamrasnara-
dura Infectious Diseases Institute
Somkid Srisopa
Duangnate Pipatsatitpong and
Chareeporn Akekawatchai
- PRAME Gene Expression in Thai 7227
Acute Myeloid Leukemia and Disease
Correlations
Tichayapa Phojanasenee and
Sawang Petvises

- Prevalence of Colistin Resistance 7240
among Third Generation Cephalospor-
ins- or Carbapenem-Resistant
Enterobacteriaceae Isolated from
Clinical Specimens in Ratchaburi
Hospital, Thailand
Puncharat Wongut-sa
Pradchama Khumdee
Worada Samosornsuk
Jiraporn Yansombat and
Seksun Samosornsuk
- Detection of Yeasts from Cockroaches' 7253
Intestine by Polymerase Chain Reaction
(PCR) Techniques and DNA Sequencing
in Internal Transcribed Spacer 1 and
2 (ITS1-2)
Patcharee Kammarnjassadakul
Natamon Nooin
Pattaranit Amphonritthisak
Pennapa Chamavit and
Watcharin Rangspanuratn



วารสาร เทคนิคการแพทย์

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย
ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

Vol. 48 No. 1 April 2020

CONTENTS

- Effects of Cadmium on Peptide Profiles and Biotyper Score Value of *Escherichia coli* O157:H7 Identified by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass-Spectrometry (MALDI-TOF/MS) 7264
Kornkanok Wongprasert
Supitcha Pannengpetch
Tuangrat Kumar
Pennapaporn Songthong
Nitaya Indrawattana and
Patcharee Isarankura-Na-Ayudhya
- Evaluation of Blood Chemistry Stability Using Vacuum Blood Collection Tube 7281
Ornanong Patsri
Nopparat Keawhanam
Kesorn Butruang and
Supasiri Sutthisom
- The Administration according to McKinsey's 7S Framework of Medical Laboratory in the First-level Hospital, Ministry of Public Health in Health Region 11, Thailand 7296
Thaveesak Sai-ong
Supreecha Kaewsawat and
Wiyada Kwanhian



วารสาร เทคนิคการแพทย์

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย
ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

JOURNAL OF THE MEDICAL TECHNOLOGIST ASSOCIATION OF THAILAND

วัตถุประสงค์

1. เป็นสื่อกลางเผยแพร่ความก้าวหน้าทางวิชาการ และผลงานวิจัยด้านเทคนิคการแพทย์และวิทยาศาสตร์การแพทย์สาขาต่างๆ
2. ส่งเสริมการวิจัยจากงานประจำ การค้นคว้าทดลองหาองค์ความรู้ใหม่ และการวิจัยทางการศึกษา เพื่อพัฒนาวิชาชีพเทคนิคการแพทย์
3. เป็นสื่อเชื่อมโยงแลกเปลี่ยนความรู้และประสบการณ์ด้านวิชาชีพระหว่างนักเทคนิคการแพทย์กับบุคลากรทางการแพทย์

Objectives

1. To serve as a medium for propagating advanced knowledge and researches in medical technology and other related medical sciences.
2. To promote research from routine, original research and educational research for enhancing the profession of medical technology.
3. To serve as a medium for interactions and exchanges of academic and professional experiences among medical technologists and other medical professions.

เจ้าของ

สมาคมเทคนิคการแพทย์
แห่งประเทศไทย ในพระอุปถัมภ์
พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี
พระวรราชทินนิตมาตุ

Owner

The Association of Medical Technologist
of Thailand under the Royal Patronage
of HRH Princess Soamsawali

สำนักงานวารสาร

เลขที่ 6 ซอยรามอินทรา 52/1
ถนนรามอินทรา
แขวง/เขต คันนายาว
กรุงเทพมหานคร 10230
โทร. 0-2948-5757-9
โทรสาร 0-2948-5758
อีเมล: jmt.amtt2016@gmail.com
เว็บไซต์: www.jmt-amtt.com

The journal office

6 Soi Ramintra 52/1, Ramintra Road,
Khannayao District, Bangkok 10230,
Thailand.
Tel. 66-2948-5757-9
Fax 66-2948-5758
E-mail: jmt.amtt2016@gmail.com
Website: www.jmt-amtt.com

กำหนดการออก

ปีละ 3 ฉบับ
ฉบับที่ 1 เดือนมกราคม-เมษายน
ฉบับที่ 2 เดือนพฤษภาคม-สิงหาคม
ฉบับที่ 3 เดือนกันยายน-ธันวาคม

Publication

Three issues per year
No. 1 January-April
No. 2 May-August
No. 3 September-December

พิมพ์ที่

โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
99 หมู่ 18 ตำบลคลองหนึ่ง
อำเภอคลองหลวง
จังหวัดปทุมธานี 12121
โทร. 0-2564-3104-6
โทรสาร 0-2564-3119

Printed at

Printing House of Thammasat
University 99 Moo 18
Klongnueng, Klongluang,
Pathum Thani 12121, Thailand
Tel. 66-2564-3104-6 Fax 66-2564-3119



วารสาร เทคนิคการแพทย์

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย
ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

JOURNAL OF THE MEDICAL TECHNOLOGIST ASSOCIATION OF THAILAND

ที่ปรึกษา

รศ. ดร.รัชนา	ศานติยานนท์	ศ. ดร.วีระพงศ์	ปรัชญาสิทธิกุล
ศ. ดร.เวทิน	นพนิตย์	ศ. ดร.วันเพ็ญ	ชัยคำภา
ศ. ดร.วิฑูรย์	ไวยนันท์	ศ. นพ.ยง	ภูววรรณ
ศ. ดร.ประมวญ	เทพชัยศรี	ผศ. เลอสรวง	ชวณิชย์
นายสมชัย	เจตเสริมอนันต์	ดร. สลักจิต	ชุดิพงษ์วิเวท

อดีตนายกสมาคม

ศ. ดร.พรทิพย์	โล่ห์เลขา	รศ. กุลนารี	สิริสาดี
รศ. ดร.ปราณี	ลิ้นจี่ชัย	น.ส. ทศนีย์	สกุลดำรงค์พานิช
รศ. ดร.กำพล	รุจิวิเศษ		

บรรณาธิการ

รศ. สมชาย	วิริยะยุทธกร	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
-----------	--------------	-----------------------

รองบรรณาธิการ

รศ. ดร.ไพโรจน์	ศิริพฤกษ์พงษ์	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ผศ. ดร.นริสา	เก่งตรง บดีรัฐ	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ผศ. ดร.อรุณี	อิงคกุล	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
อ. ดร.สว่าง	เพชรวิเศษ	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ผศ. ดร.เอนก	ภูทอง	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
นายบุญช่วย	เอี่ยมโกศลภ	กรมควบคุมโรค

คณะบรรณาธิการ

ศ. ดร.ศรีสินี คุสมิทธิ	มหาวิทยาลัยมหิดล
ศ. ดร.วัชร กสิณฤกษ์	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ศ. ดร.เพทาย เย็นจิตโสมนัส	มหาวิทยาลัยมหิดล
ศ. ดร.สมพนธ์ วรรณวิมลรักษ์	มหาวิทยาลัยมหิดล
ศ. ดร.ฉัตรเฉลิม อิศรางกูร ณ อยุธยา	มหาวิทยาลัยมหิดล

คณะบรรณาธิการ

ศ. พลตรีหญิง ดร.อ้อยทิพย์ ณ ถลาง	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศ. ดร.วันชัย มาลีวงษ์	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ศ. ดร.สาคร พรประเสริฐ	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ศ. ดร.สุพรรณ ฟู่เจริญ	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
Assoc. Prof. Chuan-Liang Kao	National Taiwan University
รศ. พรรณี พิเดช	มหาวิทยาลัยมหิดล
รศ. พญ.จิราพร สิทธิถาวร	มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
รศ. ดร.สุดา ลุยศิริโรจนกุล	มหาวิทยาลัยมหิดล
รศ. ดร.ภาวพันธ์ ภัทรโกศล	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รศ. ดร.จินตนา จิรถาวร	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รศ. ดร.พิทักษ์ สันตนิรันดร์	มหาวิทยาลัยมหิดล
รศ. อิสยา จันทรวีทยานุชิต	มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
รศ. ดร.กาญจนา สุริยะพรหม	มหาวิทยาลัยรังสิต
รศ. ดร.เกรียงไกร กิจเจริญ	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รศ. ดร.ศิริพร ปรุณวิทยา	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ผศ. พิศิษฐ์ นามจันทรา	มหาวิทยาลัยรังสิต
ผศ. ดร.ปาลนี อัมรานนท์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ผศ. ดร.เทวิน เทนคำเนา	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ผศ. ดร.วิโรจน์ บุญรัตนกรกิจ	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ผศ. ดร.กัญญาณัฐ เปี่ยมงาม	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ผศ. ดร.ดุจดาว ทรงธรรมวัฒน์	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ผศ. ดร.สุดาวดี คงขำ	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ผศ. ดร.ไฉ่มกต์ ช่างศรี	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
อ. ทศนีย์ สกุดดำรงพานิช	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
อ. ดร.พิริยาภรณ์ จงตระกูล	มหาวิทยาลัยมหิดล

ผู้จัดการ

นางรณพร ประสงค์สุข



วารสาร เทคนิคการแพทย์

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย
ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

JOURNAL OF THE MEDICAL TECHNOLOGIST ASSOCIATION OF THAILAND

Advisors

Assoc. Prof. Dr. Rachana Santiyanont
Prof. Dr. Waykin Nopanitaya
Prof. Dr. Vithoon Viyanant
Prof. Dr. Pramuan Tapchaisri Asst.
Mr. Somchai Jeadsermanant

Prof. Dr. Virapong Prachayasittikul
Prof. Dr. Wanpen Chaicumpa
Prof. Dr. Yong Poovorawan
Prof. Lersuang Chavanich
Dr. Salakchit Chutipongvivate

Former Editors

Prof. Dr. Porntip Lolekha
Assoc. Prof. Dr. Pranee Leechanachai
Assoc. Prof. Dr. Kampol Ruchiwit

Assoc. Prof. Kulnaree Sirisalee
Miss Tasanee Sakuldamrongpanich

Editor

Assoc. Prof. Somchai Viriyayudhakorn

Thammasat University

Associate Editor

Assoc. Prof. Dr. Pilaiwan Siripurkpong
Asst. Prof. Dr. Narisa Kengtrong Bordeerat
Asst. Prof. Dr. Arunee Engkagul
Dr. Sawang Petvises
Asst. Prof. Dr. Anek Pootong
Mr. Boonchuay Eampokalap

Thammasat University
Thammasat University
Kasetsart University
Thammasat University
Thammasat University
Department of Diseases Control

Editorial Board

Prof. Dr. Srisin Khusmith
Prof. Dr. Watchara Kasinrerak
Prof. Dr. Pa-thai Yenchitsomanus
Prof. Dr. Sompon Wanwimolruk
Prof. Dr. Chartchalerm Isarankura Na Ayadhya

Mahidol University
Chiang Mai University
Mahidol University
Mahidol University
Mahidol University

Editorial Board

Prof. Maj Gen Dr. Oytip Na Thalang	Thammasat University
Prof. Dr. Wanchai Maleewong	Khon Kaen University
Prof. Dr. Sakorn Pornprasert	Chiang Mai University
Prof. Dr. Supan Fucharoen	Khon Kaen University
Assoc. Prof. Chuan-Liang Kao	National Taiwan University
Assoc. Prof. Phannee Pidetcha	Mahidol University
Assoc. Prof. Dr. Jiraporn Sitithavorn	Maharakham University
Assoc. Prof. Dr. Suda Louisirirochanakul	Mahidol University
Assoc. Prof. Dr. Parvapan Bhattarakosol	Chulalongkorn University
Assoc. Prof. Dr. Chintana Chirathaworn	Chulalongkorn University
Assoc. Prof. Dr. Pitak Santanirand	Mahidol University
Assoc. Prof. Isaya Janwithayanuchit	Huachiew Chalermprakiet University
Assoc. Prof. Dr. Kanjana Suriyaprom	Rangsit University
Assoc. Prof. Dr. Kriengkrai Kitcharoen	Khon Kaen University
Assoc. Prof. Dr. Siriporn Proungvitaya	Khon Kaen University
Asst. Prof. Pisit Namjuntra	Rangsit University
Asst. Prof. Dr. Palanee Ammaranond	Chulalongkorn University
Asst. Prof. Dr. Tewin Tencomnao	Chulalongkorn University
Asst. Prof. Dr. Viroj Boonyaratanakornkit	Chulalongkorn University
Asst. Prof. Dr. Kanyanat Piumngam	Thammasat University
Asst. Prof. Dr. Dujdao Songthammawat	Thammasat University
Asst. Prof. Dr. Sudawadee Kongkham	Thammasat University
Asst. Prof. Dr. Khaimuk Changsri	Thammasat University
Lecturer Tasanee Sakuldamrongpanich	Chulalongkorn University
Dr. Piriaporn Chongtrakool	Mahidol University

Manager

Mrs. Ranaporn Prasongsook

Editorial Statement:

The statements and opinions made in the articles in this journal are the personal views of the authors and are the sole responsibilities of the authors and not of the Editorial Board of the Journal of the Medical Technologist Association of Thailand and the Association of Medical Technologist of Thailand



วารสาร เทคนิคการแพทย์

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

คณะกรรมการบริหารสมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย พ.ศ. 2561-2564

EXECUTIVE BOARD OF AMTT 2018-2021

นายกสมาคม	ดร.ทพญ.สลักจิต ชุตติพงษ์วิเวท	Dr. Salakchit Chutipongvivate	President
ที่ปรึกษา	รศ.ทพ.สมชาย วิริยะยุทธกร	Assoc. Prof. Somchai Viriyayudhakorn	Consultants
และบรรณาธิการ			and Editor
ที่ปรึกษา	ศ.ดร.เพพาย เย็นจิตโสมนัส	Prof Dr. Pa-thai Yenchitsomanus	Consultants
ที่ปรึกษา	ทพญ.สุจิตรา มานะกุล	Sujitra Manakul	Consultants
ที่ปรึกษา	ทพ.ภาคภูมิ เดชหัสดิน	Parkphum Dejhsutsadin	Consultants
อุปนายกคนที่ 1	รศ.ทพญ.พรรณี พิเดช	Assoc. Prof. Phannee Pidetcha	Vice-president
อุปนายกคนที่ 2	ทพญ.จริยา ผดุงพัฒน์อดม	Jariya Phadungpattanodom	Vice-president
และเหรัญญิก			and Treasurer
เลขาธิการ	ทพญ.สุธาทิพย์ อนันต์	Suthatip Anun	Secretary general
วิชาการ	ศ.ดร.ทพ.สุพรรณ พูเจริญ	Prof. Dr. Supan Fucharoen	Scientific chairman
การเงินและบัญชี	ทพญ.อุมาพร ทรัพย์เจริญ	Umaporn Subcharoen	Finance and Accounting
วิเทศสัมพันธ์	ทพญ.กัลยาณี ศรีสุวรรณ	Kallayanee Treesuwan	International Affairs
นายทะเบียน	ทพญ.เทียมจันทร์ เกี่ยวการค้า	Tiemjan Keowkarnkah	Registrar
สวัสดิการ	ดร.ทพ.มณี เดชวิริยะ	Dr. Manee Tachaviriya	Social welfare
ประชาสัมพันธ์	ดร.ทพ.ชนสาร ศิริรัตน์	Dr. Thanasan Sirirat	Public relations
กรรมการกลาง	พล.ต.หญิง ทพญ.อัครมนต์ บุณสมภพ	Pol Maj Gen Ucharamont Buranasompop	Committee
กรรมการกลาง	ทพ.สุรศักดิ์ มาพฤกษา	Surasak Mapuksa	Committee
กรรมการกลาง	ทพญ.จุไรรัตน์ รัตนเลิศนาวิ	Jurairat Rattanalertnavee	Committee
กรรมการกลาง	ทพ.นิตินันท์ น้อยจันต์	Nitat Noichanad	Committee
กรรมการกลาง	ดร.ทพ.ทรงราชย์ ไชยญาติ	Dr. Songrach Chaiyad	Committee

สมาชิกท่านใด ย้ายที่อยู่ หรือไม่ได้รับเอกสาร กรุณาติดต่อ

สำนักงานสมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย

ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

โทร. 0-2948-5757-9 โทรสาร. 0-2948-5758

Email: ranaporn.pra@gmail.com



วารสาร เทคนิคการแพทย์

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

หนังสือสัญญาลงแจ้งความโฆษณา

วันที่

ข้าพเจ้า (นาย/นาง/นางสาว)

ในนามของ (ห้างหุ้นส่วน/บริษัท)

ตั้งอยู่บ้านเลขที่ ตรอก/ซอย ถนน

ตำบล/แขวง อำเภอ/เขต จังหวัด

โทรศัพท์..... โทรสารโทรศัพท์มือถือ

อีเมล.....

มีความประสงค์จะลงแจ้งความโฆษณาใน “วารสารเทคนิคการแพทย์” เป็นระยะเวลา 1 ปี จำนวน 3 ฉบับ โดยลงแจ้งความโฆษณาประเภท

○ ปกหลังด้านนอกสี	อัตรา 18,000 บาท/ฉบับ	รวม 54,000 บาท/ปี
○ ปกหน้าด้านในสี	อัตรา 12,000 บาท/ฉบับ	รวม 36,000 บาท/ปี
○ ปกหลังด้านในสี	อัตรา 12,000 บาท/ฉบับ	รวม 36,000 บาท/ปี
○ เติมน้ำด้านในสี	อัตรา 9,000 บาท/ฉบับ	รวม 27,000 บาท/ปี

ตั้งแต่ฉบับที่ ปี

รวมทั้งสิ้นเป็นเงิน บาท ตัวอักษร (.....)

จำนวนพิมพ์ครั้งละ 500 ฉบับ

(ลงนาม)

(.....)

(ตำแหน่ง)

หมายเหตุ การชำระค่าโฆษณาให้จ่ายเป็นเช็คในนาม “สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย”

วารสารเทคนิคการแพทย์

ฝ่ายบรรณาธิการ รศ.สมชาย วิริยะยุทธกร สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย

ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

เลขที่ 6 ซอยรามอินทรา 52/1 ถนนรามอินทรา แขวง/เขตคันนายาว กรุงเทพฯ 10230

โทร. 0-2948-5757 โทรสาร 0-2948-5758 โทรศัพท์มือถือ 08-1919-2312, 08-8681-1581

อีเมล: jmt.amtt2016@gmail.com

Medical Technologist Role in Dengue Fever Patients with Disseminated Intravascular Coagulation (DIC)

Waraporn Somwong^{1*} Akemanee Pattanapitpaisarn¹ and Panjit Phothong²

¹*Diagnostic Laboratory, Hospital for Tropical Diseases, Bangkok, Thailand*

²*Department of Nursing, Hospital for Tropical Diseases, Bangkok, Thailand*

Abstract

Dengue fever patients have the potential for disseminated intravascular coagulation (DIC), a condition caused by continuous stimulation of blood clotting process. The fibrin builds up in blood vessels especially small blood vessels (microcirculation) thus causing ischemia of various organs and finally resulting in organ failure. A large amount of platelets used in the clotting process results in lower concentration of blood platelets that contributes to bleeding. Medical technologist is one of the multidisciplinary that is important in the patient care process both in providing laboratory results for the physician and blood and/or blood components for treatment of the patient accurately, safely and quickly including to the surveillance of transfusion reaction's incident.

Keywords: Dengue hemorrhagic fever, Medical technologist, Disseminated intravascular coagulation

*Corresponding author E-mail address: waraporn.som@mahidol.ac.th

บทบาทของนักเทคนิคการแพทย์ในการดูแลผู้ป่วยไข้เลือดออก เดงกี ที่มีภาวะเลือดแข็งตัวในหลอดเลือดแบบแพร่กระจายร่วมด้วย

วรารณณ์ สมวงษ์^{1*} เอกมณี พัฒนพิพิธไพศาล¹ และ ปานจิต โพธิ์ทอง²

¹งานห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชั้นสูง รพ.เวชศาสตร์เขตร้อน กรุงเทพมหานคร

²ฝ่ายการพยาบาล รพ.เวชศาสตร์เขตร้อน กรุงเทพมหานคร

บทคัดย่อ

ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกเดงกีมีโอกาสที่จะเกิดภาวะเลือดแข็งตัวในหลอดเลือดแบบแพร่กระจาย (disseminated intravascular coagulation; DIC) ซึ่งเป็นภาวะที่เกิดจากการกระตุ้นกระบวนการแข็งตัวของเลือดอย่างต่อเนื่องทั่วร่างกาย ทำให้เกิดการสร้างสารไฟบรินเพิ่มมากขึ้นในหลอดเลือด โดยเฉพาะในหลอดเลือดขนาดเล็ก จนอวัยวะต่าง ๆ อยู่ในภาวะขาดเลือด (ischemia) และขาดออกซิเจน การทำหน้าที่ของอวัยวะต่าง ๆ ล้มเหลว เมื่อเกิดภาวะเลือดแข็งตัวจึงมีการนำเกล็ดเลือดไปใช้งาน ทำให้ปริมาณเกล็ดเลือดลดลงจนเกิดปัญหาเลือดออกตามมา บทบาทของนักเทคนิคการแพทย์ซึ่งจัดเป็นหนึ่งในสหวิชาชีพที่สำคัญสำหรับกระบวนการดูแลรักษาผู้ป่วยไข้เลือดออกเดงกีจึงมีความสำคัญในด้านการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการเพื่อให้แพทย์ได้ใช้เป็นข้อมูลประกอบในการรักษาผู้ป่วย และการจัดหาเลือดและ/หรือส่วนประกอบของเลือดได้อย่างถูกต้อง ปลอดภัย และรวดเร็ว ให้กับผู้ป่วยที่มีความจำเป็นต้องได้รับเลือด และ/หรือส่วนประกอบของเลือด ในปริมาณมากและต่อเนื่อง นอกจากนี้ยังต้องเฝ้าระวังการเกิดภาวะแทรกซ้อน หรือปฏิกิริยาไม่พึงประสงค์จากการรับเลือดในผู้ป่วย เช่น การมีไข้หลังรับเลือด มีผื่น แน่นหน้าอกระหว่างการรับหรือหลังรับเลือด

คำสำคัญ: ไข้เลือดออกเดงกี นักเทคนิคการแพทย์ ภาวะเลือดแข็งตัวในหลอดเลือดแบบแพร่กระจาย

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: waraporn.som@mahidol.ac.th

รับบทความ: 25 ตุลาคม 2562

แก้ไขบทความ: 11 ธันวาคม 2562

รับตีพิมพ์บทความ: 24 กุมภาพันธ์ 2563

บทนำ

ไข้เลือดออกเดงกีเป็นโรคที่มีการระบาดมากในประเทศไทยและถือเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญอีกโรคหนึ่ง สาเหตุเกิดจากเชื้อไวรัสเดงกี (dengue virus) ซึ่งมีทั้งหมด 4 สายพันธุ์ (serotypes) คือ DEN1, DEN2, DEN3 และ DEN4 ทั้ง 4 สายพันธุ์มีแอนติเจนร่วมบางชนิด จึงทำให้เกิด cross reaction และ cross protection ได้ในระยะเวลาหนึ่ง เมื่อมีการติดเชื้อไวรัสเดงกีชนิดใดก็จะมีภูมิคุ้มกันต่อไวรัสเดงกีชนิดนั้นตลอด (long lasting homotypic immunity) และจะมีภูมิคุ้มกันแบบ cross protection ต่อชนิดอื่น (heterotypic immunity) ในช่วงระยะเวลาสั้นๆ ประมาณ 6-12 เดือน โรคไข้เลือดออกเดงกีติดต่อกันได้โดยมียุงลาย (*Aedes aegypti*) เป็นพาหะ การติดเชื้อไวรัสเดงกีในคนมีลักษณะทางคลินิกแตกต่างกันมาก ตั้งแต่มีอาการไข้เพียงเล็กน้อย (dengue fever) จนถึงมีอาการมากเป็นโรคไข้เลือดออก (dengue hemorrhagic fever หรือ dengue shock syndrome) ซึ่งทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้จากภาวะช็อกและภาวะเลือดออก โดยอาการของโรคแบ่งเป็น 3 ระยะ คือ ระยะไข้ ระยะวิกฤต/ช็อก และระยะฟื้นตัว ช่วงที่ต้องมีการเฝ้าระวังอย่างใกล้ชิดคือช่วงที่อยู่ในระยะไข้ลด เนื่องจากเป็นช่วงที่จะเข้าสู่ระยะวิกฤต ถ้าไม่ได้รับการดูแลอย่างใกล้ชิด อาจทำให้ผู้ป่วยมีอาการช็อกนาน ส่งผลให้เกิดภาวะความผิดปกติตามมา มีปริมาณเม็ดเลือดขาวลดต่ำลง มีค่าความเข้มข้นของเลือดสูงขึ้น ซึ่งเป็นสิ่งชี้บ่งว่าผู้ป่วยเริ่มมีพลาสมารั่วออกจากหลอดเลือด จำเป็นต้องได้รับสารน้ำชดเชย ผู้ป่วยบางรายอาจมีภาวะเลือดออกภายใน ซึ่งส่วนใหญ่มักเกิดที่ช่องท้อง มีค่าการแข็งตัวของเลือดผิดปกติ ที่สำคัญคือมีเกล็ดเลือดต่ำ ($\leq 50,000$ เซลล์ ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร ในรายที่ช็อก) เกล็ดเลือดทำงานผิดปกติ ส่งผลให้เกิดภาวะเลือดแข็งตัวในหลอดเลือดแบบแพร่กระจาย (disseminated

intravascular coagulation; DIC) ตามมาจนทำให้เสียชีวิตได้ บทความเรื่องนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อนักเทคนิคการแพทย์ตระหนักถึงความสำคัญในการเตรียมเลือดและ/หรือส่วนประกอบของเลือดให้กับผู้ป่วย เข้าใจกลไกในการเกิดภาวะเลือดแข็งตัวในหลอดเลือดแบบแพร่กระจายในผู้ป่วยไข้เลือดออกเดงกี และเพื่อใช้เป็นแหล่งข้อมูลอ้างอิงในการศึกษาต่อไป

1. โรคไข้เลือดออกเดงกี

การติดต่อ โรคไข้เลือดออกเดงกีติดต่อโดยมียุงลาย (*Aedes aegypti*) เป็นพาหะนำโรค โดยยุงลายตัวเมียจะดูดเลือดจากคนที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีอยู่ในกระแสเลือดในช่วงระยะที่มีไข้สูง เชื้อไวรัสจะเพิ่มจำนวนในตัวยุงประมาณ 8-10 วัน โดยเชื้อจะเข้าไปในกระเพาะและเพิ่มจำนวนในเซลล์ผนังกระเพาะ หลังจากนั้นจะกระจายเข้าสู่ต่อมน้ำลาย พร้อมทั้งจะปล่อยเชื้อให้กับคนอื่นต่อไป^(1, 2)

อาการแสดงและการวินิจฉัย องค์การอนามัยโลก (World Health Organization; WHO) ได้แบ่งอาการของโรคเป็น 3 ระยะ คือ ระยะไข้ ระยะวิกฤต/ช็อก และระยะฟื้นตัว⁽³⁾ ดังนี้

1) **ระยะไข้** มีอาการไข้สูงอย่างเฉียบพลัน ส่วนใหญ่ไข้สูงเกิน 38.5 องศาเซลเซียส ผู้ป่วยมักมีหน้าแดง (flushed face) อาจตรวจพบคอแดง (injected pharynx) ได้ เบื่ออาหาร อาเจียน บางรายอาจมีอาการปวดท้องร่วมด้วย มีอาการปวดที่ชายโครงขาในระแวกที่มีตับโต อาการที่พบบ่อยคือพบจุดเลือดออกที่ผิวหนัง (petechiae)

การตรวจทางห้องปฏิบัติการคือการทดสอบทูร์นิเก้ (tourniquet test) ให้ผลบวกได้ตั้งแต่ 2-3 วันแรก และมีผลตรวจ Dengue NS1 Ag เป็นบวก (positive)

2) **ระยะวิกฤต/ช็อก** เป็นระยะที่มีการรั่วของพลาสมา โดยระยะรั่วประมาณ 24-48 ชั่วโมง โดย

พลาสมาจะรั่วไปอยู่ที่ช่องท้อง/ช่องปอดมาก ไม่สามารถจับซีพอร์และวัดความดันได้ (hypovolemic shock) ซึ่งส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นพร้อมๆ กับที่ไข้ลดลงอย่างรวดเร็ว ระยะนี้จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ถ้าไม่ได้รับการรักษาทันทีผู้ป่วยอาจเสียชีวิตได้

การตรวจทางห้องปฏิบัติการ คือ มีระดับฮีมาโตคริต (hematocrit) เพิ่มขึ้นจากเดิมประมาณร้อยละ 20 ระดับเกล็ดเลือดต่ำลงมาก ระดับโปรตีนและระดับอัลบูมินในเลือดลดต่ำลง ค่าอัตราการตกตะกอนของเม็ดเลือดใน 1 ชั่วโมง (erythrocyte sedimentation rate; ESR) ลดต่ำลง ระดับเม็ดเลือดขาวต่ำลง มีการเปลี่ยนแปลงในผลตรวจภาวะการเกิดลิ่มเลือด (coagulogram) โดยจะพบ partial thromboplastin time (PTT) และ thrombin time (TT) ผิดปกติได้ รายที่ช็อกนานอาจมี prothrombin time (PT) ผิดปกติได้ด้วย โดยการเปลี่ยนแปลงของภาวะการเกิดลิ่มเลือดนี้ แสดงว่ามีภาวะเลือดแข็งตัวในหลอดเลือดแบบแพร่กระจาย

3) **ระยะฟื้นตัว** เมื่อการรั่วของพลาสมาหยุด ซีพอร์จะช้าลงและแรงขึ้น ความดันโลหิตปกติ ระยะฟื้นตัวใช้เวลา 2-3 วัน มีปริมาณปัสสาวะมากขึ้น และผู้ป่วยเริ่มมีความอยากรับประทานอาหาร

การตรวจทางห้องปฏิบัติการคือ ระดับฮีมาโตคริตจะลงมากที่

การเปลี่ยนแปลงที่สำคัญทางเลือดในผู้ป่วยโรคไข้เลือดออก เป็นปัจจัยสำคัญมากที่ช่วยในการวินิจฉัย ชี้นำถึงพยาธิสภาพและเป็นกระบวนการสำคัญที่เกี่ยวข้องกับ pathophysiology และ pathogenesis ของภาวะแทรกซ้อนต่างๆ การเปลี่ยนแปลงที่สำคัญอาการแรกพบคือค่าฮีมาโตคริตสูงขึ้น ซึ่งเกิดจากภาวะเลือดข้น โดยจะเริ่มตรวจพบได้ตั้งแต่วันที่ 2-3 ของโรค และเห็นได้ชัดในระยะก่อนช็อกและในระยะช็อกของโรค จากนั้นจะค่อยๆ ลดลงสู่ระดับปกติ สาเหตุที่ผู้ป่วยไข้เลือดออกมีค่าฮีมาโตคริตสูงขึ้นเกิด

จากการที่มีพลาสมารั่วออกไปจากผนังของเส้นเลือดฝอย โดยจะรั่วไปอยู่ในช่องปอด ช่องท้อง และช่องเยื่อหุ้มหัวใจ เป็นจำนวนมาก การตรวจเลือดในวันแรกอาจพบ leukocytosis แต่ต่อมาจะเริ่มต่ำลงในวันที่ 3 หลังมีไข้ หรือ 2 วันก่อนช็อก ในระยะใกล้ช็อกจำนวนเม็ดเลือดขาวอาจลดลงต่ำกว่า $<2,000$ เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร พบจำนวนนิวโทรฟิลลดลงและพบลิมโฟไซต์ โดยจะพบ transformed lymphocyte จำนวนสูงมากประมาณวันที่ 3-4 หรือระยะช็อก ซึ่งจะคงอยู่ประมาณ 3-4 วัน จึงค่อยๆ ลดลงกลับเข้าสู่ภาวะปกติ ส่วนจำนวนเกล็ดเลือดเริ่มลดต่ำลงตามลำดับ และลดลงต่ำสุดในระยะช็อกและเมื่อไข้ลดลง จากนั้นจะกลับสู่ภาวะปกติ สาเหตุเกิดจากการสร้างได้น้อยลงในไขกระดูกและมีการทำลายเกล็ดเลือดมาก ดังนั้นจึงส่งผลให้ผู้ป่วยมีภาวะเลือดออกมาก นอกจากนี้เกล็ดเลือดยังถูกนำไปใช้ในการแข็งตัวของเลือด ในผู้ป่วยที่มีอาการหนักจนกระทั่งมีภาวะเลือดแข็งตัวในหลอดเลือดแบบแพร่กระจาย จะยังทำให้จำนวนเกล็ดเลือดลดต่ำลงไปอีก ความผิดปกติในระบบการแข็งตัวของเลือดเป็นสาเหตุส่งเสริมที่สำคัญอย่างหนึ่งที่ทำให้ผู้ป่วยมีภาวะเลือดออกมาก การทดสอบกรองในกระบวนการแข็งตัวของเลือด (coagulogram screening) พบว่ามี prolonged partial thromboplastin time และ prolonged prothrombin time ส่วน thrombin time ส่วนใหญ่อยู่ในเกณฑ์ปกติ โรคไข้เลือดออกจะมีการกระตุ้นระบบการแข็งตัวของเลือด ซึ่งอาจเกิดจากอิมมูโนคอมเพล็กซ์ไปกระตุ้นผ่านทาง factor XII (Hageman factor) และ platelet factor 3 (PF3) จากการสลายตัวของเกล็ดเลือด ทำให้มีการใช้ factor ต่างๆ ในการแข็งตัวของเลือด⁽⁴⁾

การรักษา ให้การรักษาตามอาการเนื่องจากยังไม่มียาจำเพาะ

ภาวะเลือดแข็งตัวในหลอดเลือดแบบแพร่กระจาย (disseminated intravascular coagulation; DIC) ในผู้ป่วยไข้เลือดออกเดงกี ภาวะเลือดแข็งตัวในหลอดเลือดแบบแพร่กระจายทั่วร่างกายทำให้มีการสร้างไฟบรินเพิ่มมากขึ้นในหลอดเลือด โดยเฉพาะในหลอดเลือดขนาดเล็ก (microcirculation) ก่อให้เกิดความผิดปกติในระบบการไหลเวียนเลือดไปยังอวัยวะต่างๆ ภายในร่างกาย ส่งผลให้การทำงานของอวัยวะล้มเหลว⁽⁵⁾ เกิดภาวะเลือดไปเลี้ยงอวัยวะต่างๆ ไม่เพียงพอซึ่งอาจทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้

ตามรายงานไข้เลือดออกในผู้ป่วยผู้ใหญ่ในประเทศไทยปี พ.ศ. 2518 โดยถนอมศรี ชัยสกุล และคณะ พบผู้ป่วยผู้ใหญ่ 3 ราย อายุ 16-22 ปี มีภาวะแทรกซ้อนรุนแรง คือภาวะเลือดแข็งตัวในหลอดเลือดแบบแพร่กระจายร่วมกับช็อก โดยผู้ป่วย 2 รายถึงแก่กรรม ส่วนอีก 1 ราย รอดชีวิตจากการรักษาด้วย heparin ขนาดต่ำ การวิเคราะห์รายงานของโรงพยาบาลวิชัยยุทธ โดยถนอมศรี ชัยสกุล และคณะ ในระหว่างเดือนมกราคม พ.ศ. 2551 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2553 พบผู้ป่วยผู้ใหญ่ 157 ราย ในจำนวนนี้มีผู้ป่วย 8 รายที่มีภาวะแทรกซ้อนรุนแรง⁽⁶⁾ ตามรายงานของ Funahara และคณะพบว่าในผู้ป่วยผู้ใหญ่ที่มีอาการช็อก และมีเลือดออกมากจะมีภาวะ DIC ชัดเจน โดยตรวจพบว่านอกจากจำนวนเกล็ดเลือดจะต่ำแล้ว ยังพบว่าผู้ป่วยมีระดับไฟบริโนเจนต่ำมาก มี euglobulin lysis time ยาว มีระดับ fibrin degradation products (FDP) สูงมาก⁽⁷⁾ จากรายงานกรณีศึกษาของ Swati C. และคณะ เรื่อง Dengue Hemorrhagic Fever with Disseminated Intravascular Coagulation ได้รายงานว่าผู้ป่วยชายอายุ 23 ปี เป็นโรคไข้เลือดออกเดงกีที่มี DIC ร่วม มีอาการตัววูบ ค่าเกล็ดเลือด $<15,000$, INR 8.4, APTT 52.4sec, DIC score 7 ผู้ป่วยได้รับพลาสมาแช่แข็ง (fresh frozen plasma; FFP) ภายใน

8 ชั่วโมงหลังเข้ารับการรักษา แต่ผู้ป่วยได้เสียชีวิตจากภาวะเลือดออกในสมอง⁽⁸⁾ ข้อมูลสำคัญที่สนับสนุนว่าผู้ป่วยไข้เลือดออกเดงกีมีภาวะ DIC เกิดขึ้นจากกลไกการเปลี่ยนแปลงทางเลือด ในภาวะปกติเซลล์เยื่อบุ (endothelial cell) ของผนังหลอดเลือดฝอย ซึ่งบุผนังด้านในของหลอดเลือดมีสมบัติต่อต้านการเกิดก้อนเลือด (anti-clot) สามารถให้สารที่ต่อต้านการเกิด platelet aggregation การเกิด clot และการสลายก้อน clot ได้ เมื่อถูกเชื้อไวรัสเดงกีเข้าทำลายเซลล์เยื่อบุของผนังหลอดเลือดฝอย ทำให้เกิดพลาสมารั่วออกไปจากผนังเส้นเลือดฝอยที่มีภาวะรั่วมากขึ้น (increased vascular permeability) เข้าสู่ third space อย่างรวดเร็วส่งผลให้เกิดน้ำในเยื่อหุ้มปอด (pleural effusion) เกิดเลือดเข้มข้นขึ้น (hemoconcentration) ส่งผลให้ระดับฮีมาโตคริตสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว และเกิด hypovolemia อย่างรุนแรง นอกจากนี้ยังมีการหลั่งสาร mediator ได้แก่ C3a, C5a ไปกระตุ้นการทำงานของระบบคอมพลีเมนต์ อีกทั้งมีการหลั่งสารไซโตไคน์ต่างๆ ออกมาร่วมด้วย ถ้าได้รับการรักษาไม่ทันเวลาผู้ป่วยจะมีอาการช็อก เกิดเป็น dengue shock syndrome ได้⁽⁹⁾

เกิดการบาดเจ็บต่อหลอดเลือด (vascular injury) ต่อเซลล์เยื่อบุ ส่งผลกระตุ้นการเกิด clot สารที่สำคัญคือ tissue factor ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้น extrinsic pathway ส่วน von Willebrand factor ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด ส่งผลกระตุ้นการเกิด clot อย่างต่อเนื่อง อีกทั้งมีการกระตุ้น Hageman's factor (factor XII) ให้เกิด clot ผ่าน intrinsic pathway⁽¹⁰⁾ ทำให้มีความสามารถในการแข็งตัวของเลือดสูง (hypercoagulability) ตามมา โดยจะตรวจเลือดค่า activated partial thromboplastin time (APTT) และ prothrombin time (PT) เป็น prolonged เกิดเป็นภาวะ DIC นอกจากนั้นการเกิด clot ยังกระตุ้นให้

เกิด fibrinolysis ส่งผลให้ในขณะที่มีการสลายไฟบริน เกิด intermediate product คือ fibrin degradation products (FDP) และ D-dimer ซึ่งสาร FDP มีบทบาทสำคัญในการต่อต้านเกล็ดเลือดต่อต้านการเกิด clot ที่แข็งแรง อีกทั้งยังต่อต้านการเกิด thrombin ส่งผลให้เกิดภาวะเลือดออกผิดปกติ (bleeding abnormality)

กล่าวโดยสรุปคือกลไกการเกิดภาวะเลือดแข็งตัวในหลอดเลือดแบบแพร่กระจายในผู้ป่วยไข้เลือดออกเดงกี เกิดจากหลายกลไก เริ่มจาก endothelial cell injury ทำให้มีการปลดปล่อย tissue factor ส่งผลกระตุ้นการเกิด clot อีกทั้งมีการกระตุ้นเกล็ดเลือดให้หลั่งสารต่างๆ เช่น PF4, PF3, BTG ร่วมกับการเกิด aggregation และ lysis ที่เกิดในหลอดเลือดขนาดเล็ก ทำให้ร่างกายมีปริมาณเกล็ดเลือดลดลง พร้อมทั้งมีปฏิกิริยา immune ที่รุนแรงส่งผลให้มีการหลั่ง tissue factor อีกทั้งเกิดการรั่วของพลาสมาจากหลอดเลือด ทำให้เกิด hypovolemia มีภาวะช็อกร่วมด้วย ทำให้ผู้ป่วยเกิดภาวะเลือดออก

อย่างรุนแรง และอาจทำให้ถึงแก่ชีวิตได้^(9,11) จากการศึกษาวิจัยขององค์การอนามัยโลก พบว่าจำนวนเกล็ดเลือดและระยะของไฟบรินเจนที่ลดลงสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคพร้อมๆ กับระดับของ fibrin degradation product (FDP) ที่เพิ่มขึ้นด้วย⁽⁴⁾

ระบบการให้คะแนนภาวะเลือดแข็งตัวในหลอดเลือดแบบแพร่กระจาย (DIC Scoring System) The subcommittee on DIC of the Scientific and Standardization Committee of the International Society of Thrombosis and Haemostasis (TSTH) ได้เสนอให้ใช้ระบบการให้คะแนน (ISTH DIC scoring system) เพื่อช่วยการวินิจฉัยภาวะเลือดแข็งตัวในหลอดเลือดแบบแพร่กระจาย⁽⁵⁾ ให้ตรงกันมากขึ้นโดยการใช้ผลตรวจทางห้องปฏิบัติการประกอบ ได้แก่ platelet count, prothrombin time, fibrinogen level และ fibrin degradation products/D-dimer โดยวิธีการให้คะแนนจะนำผลแต่ละการทดสอบมาหาคะแนนตาม score ใน Table 1 ผู้ป่วยจะได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น

Table 1 ISTH DIC scoring system

Parameter	Result	Score
1. Platelet count	$>100 \times 10^9/L$	0
	$50-100 \times 10^9/L$	1
	$< 50 \times 10^9/L$	2
2. Prothrombin time (PT)	$<3 \text{ sec}$	0
	$>3 \text{ sec} - <6 \text{ sec}$	1
	$> 6 \text{ sec}$	2
3. Fibrinogen	$>1.0 \text{ g/L}$	0
	$<1.0 \text{ g/L}$	1
4. FDP/D-dime	No increase	0
	$>4 - < 8.2 \text{ ug/mL}$	2
	$>8.2 \text{ ug/mL}$	3

A total score of ≥ 5 = DIC as long as the score is associated with a clinical disorder known to cause DIC. If the score is ≥ 5 you must ring the ward/medic and make them aware of the risk of DIC.

overt DIC ถ้า DIC score ≥ 5 หรือเป็น non- overt DIC ถ้า DIC score < 5 โดยผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น overt DIC มีอัตราการเสียชีวิตสูงกว่าผู้ป่วยที่อยู่ในกลุ่ม non- overt DIC⁽¹²⁾

2. ชนิดของเลือดและส่วนประกอบของเลือด ได้แก่ กลุ่มเกล็ดเลือด กลุ่มพลาสมา

(1) เม็ดเลือดแดงที่มีจำนวนเม็ดเลือดขาวน้อย (leukodepleted packed red blood cells; LDRBC) คือ โลหิตที่แยกเม็ดเลือดขาวออกโดยวิธีการกรองให้เม็ดเลือดขาวเหลืออยู่น้อยกว่า 1×10^6 เซลล์ต่อยูนิต ในร้อยละ 90 ของจำนวนยูนิตที่ทดสอบและเหลือจำนวนเม็ดเลือดแดงมากกว่าร้อยละ 85 ของจำนวนเริ่มต้น

(2) เม็ดเลือดแดงที่แยกเม็ดเลือดขาวออกโดยการปั่น (leukocyte-poor packed red blood cells; LPRC) คือ โลหิตที่แยกเม็ดเลือดขาวออกโดยวิธีการปั่นให้เม็ดเลือดขาวเหลืออยู่น้อยกว่า 1.2×10^9 เซลล์ต่อยูนิต ร้อยละ 75 ของจำนวนยูนิตที่ทดสอบ และมีค่าฮีมาโตคริต ร้อยละ 50-70 ของจำนวนยูนิตที่ทดสอบ

(3) เม็ดเลือดแดงเข้มข้น (packed red blood cells; PRC) คือ โลหิตที่แยกพลาสมาออกโดยการปั่นโลหิตรวม หรือแยกพลาสมาเมื่อเม็ดเลือดแดงตกตะกอนแล้ว RBC จะต้องมียูนิต์ฮีมาโตคริต $\leq$ ร้อยละ 80 และต้องแยกก่อนโลหิตหมดอายุ

(4) เกล็ดเลือดเข้มข้น (platelet concentrate; PC) เตรียมโดยการปั่นแยกจากโลหิตรวม ต้องมีจำนวนเกล็ดเลือดอย่างน้อย 6×10^{10} เซลล์ต่อยูนิต และต้องมีปริมาตรพลาสมามากกว่า 40-70 มิลลิลิตร โดยเมื่อวัดพีเอช ณ วันหมดอายุจะมีค่าเท่ากับหรือมากกว่า 6.2

(5) เกล็ดเลือดเข้มข้นชนิดรวมถุงที่มีจำนวนเม็ดเลือดขาวต่ำ (pooled leukocyte poor platelet

concentrate; LPPC) คือเกล็ดเลือดเข้มข้นที่มีเม็ดเลือดขาวต่ำ ได้จากการนำ buffy coat 4 ยูนิตมารวมกับพลาสมา 1 ยูนิต จากนั้นนำไปปั่นอีกครั้งหนึ่ง โดยต้องมีจำนวนเม็ดเลือดขาวน้อยกว่า 0.2×10^9 เซลล์ต่อยูนิตที่รวมแล้ว

(6) เกล็ดเลือดที่เตรียมจากผู้บริจาครายเดียว (single donor platelet concentrate; SDP) เตรียมโดยใช้เครื่องแยกส่วนประกอบโลหิตอัตโนมัติ ต้องมีจำนวนเกล็ดเลือดอย่างน้อย 3.0×10^{11} เซลล์ต่อยูนิต หรือเทียบเท่า 6 ถุงของเกล็ดเลือดเข้มข้น

(7) พลาสมาสดแช่แข็ง (fresh frozen plasma; FFP) คือพลาสมาที่แยกจากโลหิตรวม เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสหรือต่ำกว่า โดย 1 ยูนิต จะมีแฟกเตอร์ทุกชนิดและมีปริมาณไฟบริโนเจน 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

(8) ไครโอพรีซิปีเตท (cryoprecipitate; AFH) คือตะกอนที่ไม่ละลายในความเย็น ซึ่งแยกจากพลาสมาสดแช่แข็ง ต้องมีปริมาณแฟกเตอร์ VIII มากกว่า หรือเท่ากับ 70 IU ต่อยูนิต และไฟบริโนเจนมากกว่า หรือเท่ากับ 140 มิลลิกรัมต่อยูนิต

3. บทบาทนักเทคนิคการแพทย์ในการเตรียมเลือดและส่วนประกอบของเลือดสำหรับผู้ป่วยไข้เลือดออกเดงกี

นักเทคนิคการแพทย์มีหน้าที่จัดเตรียมเลือดและ/หรือส่วนประกอบของเลือด ได้แก่ กลุ่มเกล็ดเลือด กลุ่มพลาสมา สำหรับผู้ป่วยที่มีความจำเป็นต้องใช้อย่างปลอดภัยและทันเวลาที่สุด อีกทั้งมีหน้าที่ตรวจวิเคราะห์ทางธนาการเลือด รวมถึงกำกับดูแลปริมาณเลือดและ/หรือส่วนประกอบของเลือดให้เพียงพอกับความต้องการของผู้ป่วย เนื่องจากในผู้ป่วยไข้เลือดออกเดงกีที่มีภาวะเลือดแข็งตัวในหลอดเลือดแบบแพร่กระจายร่วมด้วย เกล็ดเลือดจะถูกนำไปใช้ในปริมาณมากจนลดต่ำลง และเกิดการสลาย

ไฟบริน (fibrinolysis) เพื่อต่อต้านการแข็งตัวของเลือด ผลที่ตามมาคือเกิดภาวะเลือดออก (bleeding) ซึ่งรุนแรงมากหรือน้อย ขึ้นกับการสลายสารไฟบริน ทำให้มีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องได้รับเลือดและหรือส่วนประกอบของเลือดในปริมาณมากและต่อเนื่อง รวมทั้งต้องมีการเฝ้าระวังการเกิดภาวะแทรกซ้อนหรือปฏิกิริยาไม่พึงประสงค์จากการรับเลือดในผู้ป่วย เช่น การมีไข้หลังรับเลือด มีผื่น แขนหน้าอกระหว่างการรับหรือหลังรับเลือด

3.1 การเตรียมเลือดและหรือ/ส่วนประกอบของเลือดสำหรับผู้ป่วย

ข้อบ่งชี้การให้เลือดตามแนวทางการวินิจฉัยและการรักษาโรคไข้เลือดออกเดงกี ฉบับเฉลิมพระเกียรติสำหรับแพทย์ กรมการแพทย์ ได้กำหนดแนวทางไว้ดังนี้ ผู้ป่วยมีเลือดออกมากเกินร้อยละ 10 ของปริมาตรเลือดทั้งหมดในร่างกาย (total blood volume) ปริมาณเลือดที่ให้พิจารณาตามเลือดที่ออก ส่วนการให้เกล็ดเลือด (platelet transfusion) ในผู้ป่วยไข้เลือดออกเดงกีในรายที่มีเลือดออกมาก และมีเกล็ดเลือดต่ำมาก ๆ และ/หรือมีภาวะ DIC ร่วมด้วย ถ้าไม่สามารถหาเกล็ดเลือดได้ การให้เลือดในปริมาณที่ต้องการก็อาจเป็นการเพียงพอแล้ว เนื่องจากเกล็ดเลือดเป็น adjunct therapy อาจจะช่วยให้อาการเลือดออกน้อยลงได้บ้าง แต่ไม่สามารถแก้ไขภาวะเนื้อเยื่อขาดออกซิเจนต่ำ (tissue hypoxia) ของผู้ป่วยได้ โดยในผู้ป่วยผู้ใหญ่อาจพิจารณาการให้เกล็ดเลือดในกรณีผู้ป่วยมีโรคความดันโลหิตสูง โรคหัวใจและรับประทานยาแอสไพริน หรือยา anti-platelet, anti-coagulant และมีเกล็ดเลือดต่ำกว่า 10,000 เซลล์ ต่อลูกบาศก์ มิลลิเมตร ส่วนการพิจารณาให้พลาสมาสดแช่แข็งในผู้ป่วยที่มีภาวะ advanced DIC จะต้องให้ในปริมาณมาก 40-50 มิลลิตรต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม สำหรับผู้ป่วยที่มีเลือดออกมาก⁽³⁾

3.1.1 การเตรียมการให้เกล็ดเลือด (platelet transfusion) ในกรณีการมีเกล็ดเลือดที่หมู่เลือดไม่ตรงกับหมู่เลือดผู้ป่วย ห้องปฏิบัติการธนาคารเลือดสามารถรายงานแพทย์ พิจารณารับเกล็ดเลือดต่างหมู่ ดังนี้ โดยเลือกหมู่เลือดที่มี compatible plasma กับผู้ป่วยก่อน แต่ต้องมีเม็ดเลือดแดงปนเปื้อนน้อยที่สุด ดังนี้

- 1) ผู้ป่วยหมู่ O สามารถรับเกล็ดเลือดหมู่ B หรือ A หรือ AB
- 2) ผู้ป่วยหมู่ A สามารถรับเกล็ดเลือดหมู่ AB
- 3) ผู้ป่วยหมู่ B สามารถรับเกล็ดเลือดหมู่ AB

ในกรณีที่ไม่มีหมู่เลือดที่เป็น compatible plasma และผู้ป่วยต้องใช้ด่วน จำเป็นต้องให้เป็น incompatible plasma กับผู้ป่วยแต่ควรปั่นแยกพลาสมาออกให้เหลือน้อยลง ดังนี้

- 1) ผู้ป่วยหมู่ A สามารถรับเกล็ดเลือดหมู่ O หรือ B
- 2) ผู้ป่วยหมู่ B สามารถรับเกล็ดเลือดหมู่ O หรือ A
- 3) ผู้ป่วยหมู่ AB สามารถรับเกล็ดเลือดหมู่ A หรือ B หรือ O

กรณีนี้ถ้าต้องใช้เม็ดเลือดแดงต้องพิจารณา

- 1) ผู้ป่วยหมู่ A หรือ B สามารถรับเม็ดเลือดแดงหมู่ O
- 2) ผู้ป่วยหมู่ AB สามารถรับเม็ดเลือดแดงหมู่ A หรือ B

อาจมีผู้ป่วยบางรายที่เกิด platelet refractoriness ซึ่งเป็นภาวะที่พบได้เสมอในผู้ป่วยที่ต้องรับเกล็ดเลือดเป็นระยะ ๆ ภาวะนี้อาจทำให้เกิดความรุนแรงถึงแก่ชีวิตหากไม่สามารถหาเกล็ดเลือดที่เหมาะสมให้กับผู้ป่วยได้ โดยแพทย์จะต้องคำนวณจาก

ค่าเฉลี่ยของจำนวนเกล็ดเลือดหลังได้รับ (corrected count increment; CCI) ซึ่งมักพบในผู้ป่วยที่ติดเชื้อรุนแรง ผู้ป่วยที่มีภาวะ DIC โดยแพทย์จะต้องปรับมาให้เกล็ดเลือดที่เตรียมจากผู้ป่วยบริจาครายเดียว (apheresis platelet concentrates) ที่มีผล human leukocyte antigen (HLA) เข้ากันได้กับผู้ป่วย

3.1.2 การเตรียมการให้เม็ดเลือดแดง (RBC transfusion) ผู้ป่วย Dengue shock syndrome (DSS) ที่เกิด DIC ในสิ่งส่งตรวจสำหรับการทดสอบหาความเข้ากันได้ของเลือด (cross-matching) โดยวิธี tube method ต้องใช้เป็น EDTA tube แทน clotted blood เนื่องจากถ้าใช้เป็น clotted blood จะไม่ clot เนื่องจากในภาวะ DIC จะมี fibrin ปริมาณมากส่งผลให้เกิดปัญหาระหว่างการทดสอบโดยจะเกิดเป็น fibrin ในระหว่างขั้นตอนการบ่ม (incubate) ที่ 37 องศาเซลเซียส ทำให้ต้องเสียเวลาเริ่มต้นทำการทดสอบใหม่ ส่งผลให้ผู้ป่วยได้รับเลือดล่าช้าลงไปอีกในการเลือกเม็ดเลือดแดงที่อายุไม่เกิน 7 วันให้กับผู้ป่วย

3.1.3 การเตรียมพลาสมาสดแช่แข็ง (fresh frozen plasma; FFP) และไครโอพรีซิปีเตท (cryoprecipitate) จะเตรียมให้ในกรณีที่ผู้ป่วยมีค่า PT prolong, APTT prolong พบว่าผู้ป่วย DSS ส่วนใหญ่จะมีภาวะน้ำเกิน แพทย์จึงให้ในระหว่างการทำ dialysis จะได้เป็นการกำจัดน้ำส่วนที่เกินออก

3.1.4 การเตรียมเลือดสำหรับการเปลี่ยนถ่ายเลือด (exchange transfusion) ในกรณีที่ผู้ป่วยมีอาการทางสมองเฉื่อยชัลดจน หรือผู้ป่วยมี acute renal failure และไม่มีปัสสาวะออก ต้องพิจารณาการเปลี่ยนถ่ายเลือดโดยด่วน ไม่ควรช้าเกิน 6-8 ชั่วโมงหลังจากที่ไม่มีปัสสาวะออก การทำใช้เลือดเท่ากับ total blood volume (60-80 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) ระหว่างทำต้องให้ Ca สลับกับ NaHCO_3

ในทุกๆ 100 มิลลิลิตร ของเลือดที่เข้า-ออก เลือดถุงที่ใหม่ที่สุดควรเก็บไว้ทำถุงสุดท้าย เลือดที่สำรองมาควรใช้ทำเป็นอันดับแรก อาจต้องเปลี่ยนถ่ายเลือดซ้ำอีก 1-2 ครั้งจนกว่าผู้ป่วยจะมีอาการดีขึ้น

3.2 ข้อควรระวังในการให้เกล็ดเลือดและ/หรือ ส่วนประกอบของเลือดในผู้ป่วย Dengue ทุกระยะต่าง ๆ

ผู้ป่วยที่มีภาวะตับวาย ไตวายและภาวะน้ำเกินร่วมด้วยในการให้ packed red blood cell (PRC) หรือ fresh frozen plasma (FFP) หรือ cryoprecipitate ต้องพิจารณาความเสี่ยงและผลที่ได้รับ (risk-benefit) อย่างถี่ถ้วน เนื่องจากการให้ในปริมาณมากมักทำให้ผู้ป่วยมีภาวะน้ำเกินมากยิ่งขึ้น ซึ่งการให้ในผู้ป่วยเหล่านี้จะทำได้ในกรณีที่มีการรักษาด้วยการฟอกเลือดด้วยเครื่องไตเทียม (renal replacement therapy) ที่มีการกำจัดน้ำส่วนเกินออกไปจากผู้ป่วย เช่นการทำ peritoneal dialysis, Continuous Veno-Venous Hemofiltration (CVVH), Continuous arteriovenous hemofiltration (CAVH), และ Continuous Renal Replacement Therapies (CRRT)

4. สรุป

บทความเรื่องนี้ได้รวบรวมความรู้เกี่ยวกับลักษณะพยาธิสภาพของโรคไข้เลือดออก Dengue ตลอดจนกลไกการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญทางเลือดในผู้ป่วยโรคไข้เลือดออก และบทบาทความสำคัญของนักเทคนิคการแพทย์ในการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการรวมทั้งการเตรียมเลือดและส่วนประกอบของเลือดสำหรับผู้ป่วย เพื่อประโยชน์ในการตรวจรักษาของแพทย์ต่อไป ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับคือทำให้เกิดความเข้าใจตรงกันในการดูแลผู้ป่วยแบบสหสาขาวิชาชีพ โดยเฉพาะสำหรับการดูแลผู้ป่วยโรคไข้เลือดออก Dengue

ที่มีภาวะเลือดแข็งตัวในหลอดเลือดแบบแพร่กระจาย (disseminated intravascular coagulation; DIC) เพื่อให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาอย่างถูกต้องและทันเวลาที่

เอกสารอ้างอิง

1. Kanlayanaruj S, Wangraweewong M, Watcharaseri W, editors. Guidelines for Diagnosis and Treatment of Dengue Fever Version HM the Queen's 80th Birthday Anniversary. Queen Sirikit National Institute of Child Health. Bangkok: The War Veterans Organization of Thailand; 2013. (in Thai)
2. National Blood Centre, Thai Red Cross Society. Standards for Blood Banks and Transfusion Services. 4th edition. Bangkok: National Blood Centre, Thai Red Cross Society; 2015. (in Thai)
3. World Health Organization. National Guidelines for Clinical Management of Dengue Fever. India: World Health Organization; 2015.
4. World Health Organization. Guidelines for Treatment of Dengue Fever/Dengue Haemorrhagic Fever in Small Hospitals. New Delhi: World Health Organization; 1999.
5. Suwanwiboon B. Disseminated Intravascular Coagulation (DIC): where are we now?. J Hematol Transfus Med 2010; 20: 7-10. (in Thai)
6. Srichaikul T. Dengue Fever in Adult: The different and severe complications are problems urgently need attention. J Hematol Transfus Med 2010; 1: 303-8. (in Thai)
7. Srichaikul T. Hematology Changes in Dengue Fever. J Hematol Transfus Med 2003; 3: 195-208. (in Thai)
8. Aundhakar SC, Shah BS, Roy SS. Dengue hemorrhagic fever with disseminated intravascular coagulation. IJSR 2016; 5: 1635-6.
9. Srichaikul T, Punyagupta S, Nitiyanan P, *et al.* Disseminated intravascular coagulation in adult dengue hemorrhagic fever. Report of three cases. J Med Assoc Thailand 1975; 6: 106-14.
10. Srichaikul T. Disseminated Intravascular Coagulation. J Hematol Transfus Med 1998; 4: 303-7. (in Thai)
11. Chairulfatah A, Setiabudi D, Agoes R, Colebunders R. Thrombocytopenia and Dengue Shock Syndrome. Dengue Bulletin 2003; 27: 138-43.
12. Srichaikul T, Nimmannity S. Haematology in dengue and dengue haemorrhagic fever. Bailliere Clin Haematol 2000; 13: 261-76.

การกระจายตัวของจีโนไทป์เชื้อไวรัสตับอักเสบบีในผู้ติดเชื้อไวรัสเอชไอวีที่เข้ารับการรักษานในสถาบันบำราศนราดูร

สมคิด ศรีโสภา^{1,2} ดวงเนตร พิพัฒน์สถิตพงศ์³ และ จริกรณ เอศวินชัย^{3*}

¹บัณฑิตศึกษา สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี

²สถาบันบำราศนราดูร กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี

³ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี

บทคัดย่อ

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีพบได้บ่อยในกลุ่มผู้ติดเชื้อไวรัสเอชไอวี และผลกระทบของจีโนไทป์ไวรัสตับอักเสบบีต่อการดำเนินโรคติดเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดและการตอบสนองต่อการรักษาโรคไวรัสตับอักเสบบี โดยเฉพาะในยุคที่ผู้ติดเชื้อส่วนใหญ่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านไวรัสเอชไอวียังต้องมีการศึกษาอีกมาก การวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการกระจายตัวของจีโนไทป์ไวรัสตับอักเสบบี รวมทั้งความสัมพันธ์กับลักษณะทางคลินิกที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสทั้งสองชนิด ในกลุ่มผู้ติดเชื้อร่วมกัน ที่เข้ารับการรักษานในสถาบันบำราศนราดูร ระหว่างเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2560 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2561 การศึกษาครั้งนี้เป็นแบบภาคตัดขวาง ทำในผู้ติดเชื้อไวรัสเอชไอวีร่วมกับไวรัสตับอักเสบบี จำนวน 73 ราย ซึ่งเกือบทั้งหมดได้รับการรักษาด้วยยาต้านไวรัสเอชไอวี และมีความชุกของไวรัสตับอักเสบบีจีโนไทป์ 1, 3 และ 6 เท่ากับร้อยละ 54.8, 37.0 และ 8.2 ตามลำดับ จากการทดสอบด้วย Chi-square และ Fisher's exact test พบว่า ไม่มีความสัมพันธ์ระหว่าง จีโนไทป์ของไวรัสตับอักเสบบีกับลักษณะทางคลินิกที่ทดสอบ และไม่พบความแตกต่างระหว่างค่ามัธยฐานของอายุ ระยะเวลาตั้งแต่ได้รับการวินิจฉัยว่าติดเชื้อไวรัสเอชไอวีและไวรัสตับอักเสบบี ระดับ HCV viral load ก่อนการรักษา ปริมาณ CD4 รวมทั้งระดับเอนไซม์ aspartate aminotransferase (AST) และ เอนไซม์ alanine aminotransferase (ALT) ที่พบในผู้ติดเชื้อจีโนไทป์ 3 และ 6 เปรียบเทียบกับในผู้ติดเชื้อจีโนไทป์ 1 ($p > 0.05$) การศึกษาครั้งนี้ ได้รายงานการกระจายตัวจีโนไทป์ของไวรัสตับอักเสบบี ซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญในการกำหนดแนวทางการรักษาไวรัสตับอักเสบบี โดยเฉพาะในกลุ่มผู้ที่ติดเชื้อร่วมกับไวรัสเอชไอวี

คำสำคัญ: ไวรัสเอชไอวี ไวรัสตับอักเสบบี จีโนไทป์ไวรัสตับอักเสบบี

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: cakekawatchai@gmail.com

รับบทความ: 20 มิถุนายน 2562

แก้ไขบทความ: 14 กรกฎาคม 2562

รับตีพิมพ์บทความ: 24 กุมภาพันธ์ 2563

Genotypic Distribution of Hepatitis C Virus in Human Immunodeficiency Virus-infected Patients in Bamrasnaradura Infectious Diseases Institute

Somkid Srisopa^{1, 3}, Duangnate Pipatsatitpong² and Chareeporn Akekawatchai^{2 *}

¹*Graduate Program in Medical Technology, Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Pathum Thani Province, Thailand*

²*Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Pathum Thani Province, Thailand*

³*Bamrasnaradura Infectious Diseases Institute, Ministry of Public Health, Nonthaburi Province, Thailand*

Abstract

Hepatitis C virus (HCV) infection is common in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients. The effect of HCV genotypes on HIV and HCV disease progression and responsiveness to hepatitis C therapy, particularly in the era of anti-retroviral therapy for HIV infection, still requires more clarification. The present study was aimed to investigate distribution of HCV genotypes and their association with clinical characteristics related to HIV and HCV infection in the HIV/HCV-coinfected patients attending Bamrasnaradura Infectious Diseases Institute, Thailand, between November 2016 and December 2017. A cross-sectional study was conducted in 73 HIV/HCV-coinfected patients mostly receiving combined antiretroviral therapy (ART). Prevalence of HCV genotypes 1, 3 and 6 were 54.8%, 37.0% and 8.2% respectively. The Chi-square and Fisher's exact tests indicated no statistically significant association of HCV genotypes with clinical features tested in the HIV/HCV-coinfected group, consistent with no difference in median age, duration of HIV and HCV diagnosis, pretreatment HCV RNA viral load, CD4⁺ cell count and levels of aspartate (AST) and alanine aminotransferases (ALT), observed in the patients infected with HCV genotype 3 and 6, compared to those with genotype 1 ($p > 0.05$). This study provides HCV genotypic distribution which is essential for management of HCV treatment regimens especially in HIV/HCV coinfecting patients.

Keywords: Human immunodeficiency virus (HIV), Hepatitis C virus (HCV), HCV genotypes

*Corresponding author E-mail address: cakekawatchai@gmail.com

Introduction

Hepatitis C virus (HCV) coinfection is common among human immunodeficiency virus (HIV)-infected individuals due to shared common routes of transmission⁽¹⁾. The Asian cohort study reported that there were up to 15.2% of HCV coinfection in HIV-infected patients⁽²⁾, and studies in HIV-infected Thais also indicated the high prevalence approximately of 7-11%⁽³⁻⁵⁾. Accumulating studies suggested pathological roles of HIV/HCV coinfection in both HIV- and HCV-induced disease progression leading to more complicated treatment and care⁽⁶⁾. Moreover, advancement in management of HIV-infected patients with combined antiretroviral therapy (ART) in the last decade adds more complexity to understanding of HCV- and HIV-associated diseases. Presently, an impact of HCV infection on the disease progression and therapeutic response of HIV/HCV coinfecting patients who are on combined ART requires much more investigation.

HCV is a positive single-stranded RNA virus belonging to the genus *Hapacivirus* in the family *Flaviviridae*, and presently classified into seven major genotypes or clades⁽¹⁻⁷⁾ and 67 subtypes⁽⁷⁾. Recently, a novel HCV genotype 8 has also been identified⁽⁸⁾. Distribution of HCV genotypes and subtypes differ substantially across the globe because of differences in modes of HCV transmission and the rapid spread of some common strains⁽⁹⁾. Whereas genotypes 1, 2 and 3 are prevalent widely,

some other genotypes distribute in certain regions. For instance, genotypes 5 and 6 are endemic in South Africa and South East Asia respectively⁽¹⁰⁾. In Thailand, the epidemiological report in 2015 indicated that HCV genotype 1 was prevalent throughout Thailand, while genotype 3 was more common in the south and genotype 6 prevailed in the north and northeast⁽¹¹⁾. There have also been reports in certain populations including intravenous drug users (IVDUs), HIV-infected individuals and blood donors in central and northern Thailand, suggesting genotypes 1, 3 and 6 as common strains prevalent in these groups⁽¹²⁻¹⁵⁾. While data on distribution patterns of HCV genotypes and subtypes are required for hepatitis C therapeutic strategies especially duration of treatment, responsive rates to therapy and the need for adjuvant interferon and ribavirin with the new direct acting antivirals (DAAs)⁽¹⁶⁾, molecular epidemiology of HCV infection specifically in Thai HIV-infected patients is still limited.

Therefore, this cross-sectional study aimed to investigate distribution of HCV genotypes and their association with clinical characteristics-related to HIV and HCV infection in Thai HIV-infected patients. The study provides epidemiological data of HCV coinfection in HIV-infected individuals who are on combined ART supporting understanding of HIV/HCV coinfection in the era of ART.

Materials and Methods

Study design and population

A pilot cross-sectional study was conducted in 73 HIV patients coinfecting with HCV in Bamrasnaradura Infectious Diseases Institute, Thailand, from November 2016 to December 2017. Patients aged 20 years or older with documented HIV and HCV infection, and availability of clinical and laboratory data particularly HCV genotype, were recruited. Subjects were excluded according to documented HBV infection, active opportunistic infections, alcohol consumption, herbal medicine use, steroid and paracetamol medication. All subjects provided written informed consent and the study protocol was reviewed and approved by the human Ethics Committees No. 3, Thammasat University (Project no. 070/2560) and Bamrasnaradura Infectious Diseases Institute (Project no. R005/60).

Clinical data and laboratory investigation

Clinical data were obtained from patient's medical records including age, gender, diagnosed HIV, HBV and HCV infection, duration of HCV and HIV diagnosis, duration of antiretroviral therapy (ART), currently used antiretroviral (ARV) regimens, baseline HCV RNA viral load and HCV genotype, and opportunistic infection. HIV infection was previously diagnosed based on the three different HIV antibody detection test algorithm comprising ARCHITECT HIV1/2 Ag/Ab

Combo chemiluminescent microparticle assay (CMIA) (Abbott, USA), Determine HIV1/HIV2 immunochromatography (Inverness Medical Japan, Japan) and One Step Anti-HIV1&2 TriLine immunochromatography (InTecProducts, China). HCV infection was determined through anti-HCV screening CMIA (Abbott, USA) and subsequent detection of HCV RNA viral load (Roche Molecular Diagnostics, Switzerland). HCV genotyping was performed by VERSANT® HCV Genotype 2.0 line probe assay (LiPA 2.0 assay) (Siemens Healthcare Diagnostics, USA) for hepatitis C virus genotypes 1–6. At enrollment, data on alcohol consumption, herbal medicine, steroid and paracetamol drug intake were collected from questionnaire administration. The enrolled patients underwent clinical examination and routine blood tests including aspartate and alanine aminotransferases (AST and ALT) (Roche Diagnostics, Switzerland), CD4⁺ cell count (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and HIV viral load (Roche Molecular Diagnostics, Switzerland).

In this study, sustained virologic response (SVR) was defined as negative HCV RNA at 6-month after completing HCV therapy^(16, 17). Transaminitis was assessed by an increase level from the normal upper limit (ULNs) of AST or ALT (>40 U/L)⁽³⁾.

Statistical Analysis

Prevalence of HCV genotypes in HIV/HCV coinfecting participants was analyzed

by descriptive statistics and presented as percentages. Chi-square and Fisher's exact tests were used to determine the association of HCV genotypes with categorical variables, whereas a Mann-Whitney U test was used to analyze those with continuous variables. *P* values > 0.05 were considered as statistically significant. The PASW statistic 18 software (SPSS Inc.) was used for statistical analysis.

Results

A total of 73 HIV/HCV coinfecting patients, 64 males (87.7%) and 9 females (12.3%), with the median age of 47 [range, 27-67] and median duration of HIV diagnosis of 10 [2-25] years, were recruited. Characteristics and clinical features of the HIV/HCV coinfecting patients were summarized in Table 1. Among patients documented as HCV infected, the

Table 1 Characteristics and clinical features of HIV/HCV coinfecting patients at Bamrasnaradura Infectious Diseases Institute (n = 73)

Characteristics	n (%)	Median (range)
Male	64 (87.7)	-
Age (years)	-	47 (27-67)
CD4 ⁺ cell count (cells/ μ L)	-	529.0 (190.0-1,748.0)
HIV viral load < 20 copies/mL	69 (94.5)	-
Duration of HIV diagnosis (years)	-	10 (2-25)
Antiretroviral therapy (ART) (n = 71)		
2NRTIs and NNRTI	54 (76.0)	-
2NRTIs and PI	6 (8.5)	-
Others	11 (15.5)	-
Duration of ART (years) (n = 72)	-	9 (2-19)
HCV genotypes		
G1	40 (54.8)	-
G3	27 (37.0)	-
G6	6 (8.2)	-
Pretreatment HCV viral load (log) (n = 67)	-	6.1 (2.8-8.0)
Duration of HCV diagnosis (years) (n = 72)	-	5 (1-19)
Naïve to HCV therapy (n = 72)	29 (40.3)	-
Transaminitis (AST and/or ALT > ULN (40 U/L))	51 (69.9)	-

NRTI = nucleoside reverse transcriptase inhibitor, NNRTI = non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor, PI = protease inhibitor, SVR = sustained virologic response

median time since initial diagnosis was 5 [1-19] years and median pretreatment HCV RNA viral load was 6.1 [2.8-8.0] log IU/mL. There were 29 out of 72 (39.7%) patients remained naïve to HCV therapy and 51 of 73 (69.9%) patients were evaluated as having transaminitis. Prevalence of HCV genotypes 1, 3 and 6 were 54.8% (40/73), 37.0% (27/73) and 8.2% (6/73) respectively (Table 1). Of these 73 patients, there were 42 (57.5%) patients with availability of subtyping data for genotypes 1 and 3. The rates of patients infected with the subtypes 1a, 1b, 1c, 3a, 3b were 61.9% (26/42), 9.5% (4/42), 2.4% (1/42), 23.8% (10/42) and 2.4% (1/42) respectively. No mixed infection was observed in this study.

In this study, effect of HCV genotypes on clinical features of HIV/HCV coinfecting patients was examined. Association between HCV genotypes and the clinical characteristics was analyzed by Chi-square and Fisher's exact tests (Table 2). All characteristics and clinical features of patients infected with HCV genotypes 1, 3 and 6 including gender, age, CD4⁺ cell count, duration of HIV diagnosis, antiretroviral drug regimens, duration of ART, pretreatment HCV viral load, duration of HCV diagnosis, transaminitis and HCV treatment status, were similar ($p > 0.05$) as analyzed by Chi-square and Fisher's exact tests, consistent with the Mann-Whitney U analysis in Table 3 demonstrating that the medians of age, duration of HIV and HCV diagnosis, pretreatment HCV RNA viral load, CD4⁺ cell count, levels of

AST and ALT, in the patients infected with genotype 1, 3 and 6 were not significantly different ($p > 0.05$). Notably, although there was a trend, HCV genotypes were not significantly associated with levels of pretreatment HCV RNA viral load ($p = 0.057$), and no difference between the median HCV viral loads in patients infected with genotype 3 and 6, and those with genotype 1 ($p = 0.072$ and $p = 0.339$, respectively). The data analysis indicated no statistically significant association of HCV genotypes with any of the clinical characteristics tested.

Discussion

This cross-sectional study reported that major HCV genotypes 1, 3 and 6 were prevalent in Thai HIV/HCV coinfecting patients mostly receiving long-term combined ART. Most patients presented undetectable levels of HIV RNA viral loads with relatively high levels of CD4⁺ cell count status. The patients were diagnosed as HIV infected and mostly on suppressive ART for up to 9-10 years, whereas duration of HCV diagnosis was around 5 years and only 59.7 % of the patients received HCV therapy. There were up to 69.9% of this patient group assessed as having transaminitis, indicating their high potentials to develop liver disease. In this study, our statistical analysis suggested no statistically significant association of HCV genotypes with any of clinical features related to both HIV and HCV infection, potentially suggesting no influence

Table 2 General characteristics and clinical features of Thai HIV/HCV coinfectd patients according to HCV genotypes (n = 73)

Characteristics	All patients (n = 73) n (%)	HCV genotypes			p
		Genotype 1 (n = 40)	Genotype 3 (n = 27)	Genotype 6 (n = 6)	
Gender					
Male	64 (87.7)	35 (87.5)	24 (88.9)	5 (83.3)	1.000 ^a
Female	9 (12.3)	5 (12.5)	3 (11.1)	1 (16.7)	
Age (years)					
≤ 40	19 (26.0)	14 (35.0)	4 (14.8)	1 (16.7)	0.157 ^a
41-50	29 (39.7)	14 (35.0)	12 (44.4)	3 (50.0)	
> 50	25 (34.2)	12 (30.0)	11 (40.7)	2 (33.3)	
CD4 ⁺ cell count (cells/uL)					
> 500.0	43 (58.9)	25 (62.5)	14 (51.9)	4 (66.7)	0.665 ^a
≤ 500.0	30 (41.1)	15 (37.5)	13 (48.1)	2 (33.3)	
Duration of HIV diagnosis (years)					
≤ 10.0	38 (52.1)	20 (50.0)	14 (51.9)	4 (66.7)	0.823 ^a
>10.0	35 (47.9)	20 (50.0)	13 (48.1)	2 (33.3)	
Antiretroviral therapy (ART) (n = 71)					
2NRTIs and NNRTI	54 (76.1)	28 (71.8)	21 (80.8)	5 (83.3)	0.611 ^a
2NRTIs and PI	6 (8.4)	5 (12.8)	1 (3.8)	0 (0.0)	
Others	11 (15.5)	6 (15.4)	4 (15.4)	1 (16.7)	
Duration of ART (years) (n = 72)					
≤ 10.0	45 (62.5)	25 (62.5)	16 (61.5)	4 (66.7)	1.000 ^a
> 10.0	27 (37.5)	15 (37.5)	10 (38.5)	2 (33.3)	
Pretreatment HCV Viral load (log IU/mL) (n = 67)					
< 6.00	23 (34.3)	8 (22.2)	12 (46.2)	3 (60.0)	0.057 ^a
≥ 6.00	44 (65.7)	28 (77.8)	14 (58.8)	2 (40.0)	
Duration of HCV diagnosis (years) (n = 72)					
≤ 5.0	37 (51.4)	21 (53.8)	15 (55.5)	1 (16.7)	0.235 ^a
> 5.0	35 (48.6)	18 (46.2)	12 (44.5)	5 (83.3)	
Transaminitis					
AST and/or ALT ≤ ULN (40 U/L)	22 (30.1)	10 (25.0)	9 (33.3)	3 (50.0)	0.423 ^a
AST and/or ALT > ULN (40 U/L)	51 (69.9)	30 (75.0)	18 (66.7)	3 (50.0)	
HCV therapy (n = 72)					
Naïve to HCV therapy	29 (40.3)	19 (48.7)	9 (33.3)	1 (16.7)	0.115 ^a
on HCV therapy	8 (11.1)	3 (7.7)	5 (18.5)	0 (0.0)	
Non SVR	6 (8.3)	5 (12.8)	1 (3.7)	0 (0.0)	
SVR	29 (40.3)	12 (30.8)	12 (44.5)	5 (83.3)	

^a Fisher-exact test

NRTI = nucleoside reverse transcriptase inhibitor, NNRTI = non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor, PI = protease inhibitor, ART = antiretroviral therapy, AST = aspartate aminotransferase, ALT = alanine aminotransferase, SVR = sustained virologic response

Table 3 Medians of age, duration of HIV and HCV infection, pretreatment HCV viral load, CD4⁺ cell count stratified by HCV genotypes in HIV/HCV coinfectd Thais (n = 73)

Characteristics	Genotype 1 N = 40	Genotype 3 N = 27	Genotype 6 N = 6	P ¹	P ²	P ³
Age (years)	43.5 (27.0-67.0)	48.0 (34.0-63.0)	47.0 (37.0-61.0)	0.086	0.352	0.963
Duration of HIV diagnosis (years)	10.5 (3.0-25.0)	9.0 (2.0-25.0)	9.5 (4.0-15.0)	0.320	0.870	0.690
Duration of HCV diagnosis (years) (n = 72)	5.0 (1.0-19.0)	4.0 (2.0-11.0)	8.0 (4.0-9.0)	0.613	0.174	0.099
Pretreatment HCV viral load (log IU/mL) (n = 67)	6.3 (2.82-8.02)	6.0 (4.63-7.50)	5.95 (4.96-7.08)	0.072	0.339	0.936
CD4 ⁺ cell count (cells/uL)	529.0 (249.0-1748.0)	525.0 (190.0-1288.0)	561.0 (338.0-764.0)	0.668	0.992	0.963
AST (U/L)	58.5 (19.0-188.0)	48.0 (17.0-420.0)	52.0 (18.0-109.0)	0.697	0.858	0.591
ALT (U/L)	54.5 (14.0-436.0)	41.0 (15.0-235.0)	44.0 (11.0-100.0)	0.428	0.289	0.559

P¹, P², and P³ are P values of the Mann-Whitney U test for differences between the patients with genotype 1 and genotype 3, genotype 1 and genotype 6, and genotype 3 and genotype 6 respectively.

of HCV genotypes on HIV and HCV infection status in this study group.

Globally, HCV genotypes 1 and 3 are the first and second most common strains, respectively and others are found in smaller proportions and in certain geographic regions, particularly genotype 6 is commonly found in China and South East Asia^(10, 18, 19). In Thailand, distribution of HCV genotypes varies with geographic areas and major strains reported in several previous studies were genotype 1, 3 and 6^(11-15, 20). Similar to the previous reports, our study indicated that HCV genotype 1 was

the most predominant (54%), followed by genotype 3 (37.0%) and 6 (8.2%). Notably, subtyping data suggested subtypes 1a and 3a as predominant strains. However, this finding is relatively inconsistent with data from the previous study particularly in HCV-monoinfected and HIV/HCV-coinfectd patients suggesting the most prevalent genotype 3 (47%) and smaller proportions of genotype 1 (34%) and 6 (17%)⁽¹⁵⁾. The different distribution pattern of HCV genotype observed in our study is possibly due to the smaller sample size, study design and patient popula-

tion. Our study reported prevalence of HCV genotypes specifically in the HIV/HCV coinfecting patient group mostly receiving combined ART.

Accumulating studies have revealed an impact of HCV infection on the natural history of HIV and HCV diseases^(6, 21, 22). Before the era of ART, HCV genotypes were demonstrated to affect HIV disease progression. Hemophilic patients with HCV genotype 1 infection experienced acceleration of progression to acquired immunodeficiency syndrome (AIDs) and death⁽²³⁾. In the hemophilic group with a low proportion of patients initiating ART, patients infected with HCV genotype 1 presented lower mean CD4⁺ cell count and percentage of CD4⁺ T cells than those infected with non-genotype 1, and were at risk for progression to AIDs-associated mortality⁽²⁴⁾. However, in the patient group with higher proportion of patients receiving ART, HCV genotypes appeared to have no impact on the levels of HIV RNA viral load and CD4⁺ cell numbers⁽²⁵⁾. Consistent with the later report, our data analysis in the patients who are on standard combined ART indicated no significant correlation between HCV genotypes and levels of CD4⁺ cell count, and no difference in median CD4⁺ cell numbers observed in patients infected with HCV genotype 1, 3 and 6. Several previous studies also suggested an influence of HCV genotypes in HCV disease status. Patients infected with different genotypes of HCV had significantly

different levels of HCV RNA^(15, 24), probably correlated with our data indicating that there was non-significant trend of association between HCV genotypes and pretreatment HCV RNA ($p = 0.057$). However, there was no significant difference in median HCV RNA viral loads among patients infected with HCV genotypes. The previous study in untreated HCV-infected patients indicated difference in levels of ALT and degree of hepatic fibrosis among patients infected with genotype 1, 3 and 6, and infection of genotype 6 was less likely to develop advanced liver fibrosis⁽¹⁵⁾. In contrast, our data analyzed in the group with relatively high percentages of the treated patients achieving SVR (41.7%) indicated that there was no statistically significant association between HCV genotypes and transaminitis, and no difference in the medians of AST and ALT detected in patients infected with genotype 3 and 6, compared to those with genotype 1. Moreover, our analysis did not show a significant association of HCV genotypes with HCV treatment status in this studied group, while many previous studies have clearly demonstrated an impact of HCV genotypes and subtypes on responsiveness to HCV treatment^(6, 16). With conventional interferon (IFN)-based therapy, genotypes 2 and 3 are more responsive than genotypes 1 and 4, however genotype 3 appears to be the most challenging to eradicate with the new DAA regimens. HCV genotyping and subtyping continues to be a critical aspect of HCV

treatments in the era of IFN-free DAAs^(6, 16).

Limitations of the study should be mentioned. Firstly, our sample size is small and may not be representative of Thai HIV/HCV-coinfected individuals. This may also limit statistical significance for the variables tested. For example, very low number of patients achieving non-SVR and SVR may affect statistical analysis for association of HCV genotypes with HCV treatment status. Secondly, clinical data were obtained from retrospective review with unavailability of liver fibrosis assessment and drug regimens for hepatitis C therapy that may be required for further prospective cohort studies in this HIV/HCV coinfecting group. However, this preliminary data report distribution of HCV genotypes and subtypes and their association with clinical status involving HIV and HCV infection in HIV/HCV-infected Thais attending Bamrasnaradura Infectious Diseases Institute that are critical for management of hepatitis C treatment in the HIV/HCV coinfecting Thai patients.

Conclusion

This pilot cross-sectional analysis provides frequencies of HCV genotypes and subtypes in Thai HIV population and demonstrated a lack of association of the HCV genotypes with HIV- and HCV- associated clinical status. A further analysis in a larger sample size may be required to verify this finding. The study provides preliminary data

which are essential for development of hepatitis C treatment strategies in the HIV/HCV-coinfected group.

Acknowledgements

Special thanks are due to patients in Bamrasnaradura Infectious Diseases Institute, Thailand, who participated in this study. Somkid Srisopa was a graduate student in Graduate Program in Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, and a recipient of the Research Grant for Graduate Studies from the National Research Council of Thailand (Fiscal year 2018).

References

1. Joshi D, O'Grady J, Dieterich D, *et al.* Increasing burden of liver disease in patients with HIV infection. *Lancet* 2011; 377: 1198-209.
2. Chen M, Wong WW, Law MG, *et al.* Hepatitis B and C Co-Infection in HIV Patients from the TREAT Asia HIV Observational Database: Analysis of Risk Factors and Survival. *PloS One* 2016; 11: e0150512.
3. Akekawatchai C, Sretapunya W, Pipatsatitpong D, *et al.* Hepatitis B or C virus coinfection in and risks for transaminitis in human immunodeficiency virus - infected Thais on combined antiretroviral therapy. *Asian Biomed* 2015; 9: 353-61.

4. Law WP, Dore GJ, Duncombe CJ, *et al.* Risk of severe hepatotoxicity associated with antiretroviral therapy in the HIV-NAT Cohort, Thailand, 1996-2001. *AIDS* 2003; 17: 2191-9.
5. Sungkanuparph S, Wongprasit P, Manosuthi W, *et al.* Compliance with hepatitis B and hepatitis C virus infection screening among HIV-1 infected patients in a resource-limited setting. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2008; 39: 863-6.
6. Sohrab SS, Suhail M, Ali A, *et al.* Consequence of HIV and HCV co-infection on host immune response, persistence and current treatment options. *VirusDis* 2018; 29: 19-26.
7. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, *et al.* Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology* 2014; 59: 318-27.
8. Borgia SM, Hedskog C, Parhy B, *et al.* Identification of a Novel Hepatitis C Virus Genotype From Punjab, India: Expanding Classification of Hepatitis C Virus Into 8 Genotypes. *J Infect Dis* 2018; 218: 1722-9.
9. Hajarizadeh B, Grebely J, Dore GJ. Epidemiology and natural history of HCV infection. *Nat Rev Gastro Hepat* 2013; 10: 553-62.
10. Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, *et al.* Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2015; 61: 77-87.
11. Wasitthankasem R, Vongpunsawad S, Siripon N, *et al.* Genotypic distribution of hepatitis C virus in Thailand and Southeast Asia. *PloS One* 2015; 10: e0126764.
12. Apichartpiyakul C, Apichartpiyakul N, Urwijitaroon Y, *et al.* Seroprevalence and subtype distribution of hepatitis C virus among blood donors and intravenous drug users in northern/northeastern Thailand. *Jpn J Infect Dis* 1999; 52: 121-3.
13. Verachai V, Phutiprawan T, Theamboonlers A, *et al.* Prevalence and genotypes of hepatitis C virus infection among drug addicts and blood donors in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2002; 33: 849-51.
14. Jutavijittum P, Jiviriyawat Y, Yousukh A, *et al.* Genotypic distribution of hepatitis C virus in voluntary blood donors of northern Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2009; 40: 471-9.
15. Avihingsanon A, Jitmitraparp S, Tangkijvanich P, *et al.* Advanced liver fibrosis by transient elastography, fibrosis 4, and alanine aminotransferase/platelet ratio index among Asian hepatitis C with and without human immunodeficiency virus infection: role of vitamin D levels. *J Gastroenterol Hepatol* 2014; 29: 1706-14.

16. Cloherty G, Talal A, Collier K, *et al.* Role of Serologic and Molecular Diagnostic Assays in Identification and Management of Hepatitis C Virus Infection. *J Clin Microbiol* 2016; 54: 265-73.
17. Panel AIHG. Hepatitis C guidance: AASLD-IDSA recommendations for testing, managing, and treating adults infected with hepatitis C virus. *Hepatology* 2015; 62: 932-54.
18. Zhou K, Hu F, Wang C, *et al.* Genotypic distribution and hepatic fibrosis among HIV/HCV co-infected individuals in Southern China: a retrospective cross-sectional study. *BMC Infect Dis* 2015; 15: 401.
19. Cheng CH, Lin CC, Chen HL, *et al.* Genotype distribution and treatment response among incarcerated drug-dependent patients with chronic hepatitis C infection. *PloS One* 2018; 13: e0191799.
20. Martin M, Vanichseni S, Leelawiwat W, *et al.* Hepatitis C virus infection among people who inject drugs in Bangkok, Thailand, 2005-2010. *WHO South East Asia J Public Health* 2019; 8: 50-5.
21. Vallet-Pichard A, Pol S. Natural history and predictors of severity of chronic hepatitis C virus (HCV) and human immunodeficiency virus (HIV) co-infection. *J Hepatol* 2006; 44 (1 Suppl): S28-34.
22. Wyles DL, Sulkowski MS, Dieterich D. Management of Hepatitis C/HIV Coinfection in the Era of Highly Effective Hepatitis C Virus Direct-Acting Antiviral Therapy. *Clin Infect Dis* 2016; 63 (Suppl 1): S3-11.
23. Sabin CA, Telfer P, Phillips AN, *et al.* The association between hepatitis C virus genotype and human immunodeficiency virus disease progression in a cohort of hemophilic men. *J Infect Dis* 1997; 175: 164-8.
24. Yoo TW, Donfield S, Lail A, *et al.* Effect of hepatitis C virus (HCV) genotype on HCV and HIV-1 disease. *J Infect Dis* 2005; 191: 4-10.
25. Wolff FH, Fuchs SC, Barcellos NN, *et al.* Co-infection by hepatitis C virus in HIV-infected patients in southern Brazil: genotype distribution and clinical correlates. *PloS One* 2010; 5: e10494.

การแสดงออกของยีน PRAME ในผู้ป่วยไทยที่เป็น มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันแบบมัยอีลอยด์ และความสัมพันธ์กับโรค

ธัชยาภา พจนเสนี^{1, 3} และ สว่าง เพชรวิเศษ^{1, 2*}

¹บัณฑิตศึกษา สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี

²ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี

³ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร

บทคัดย่อ

ยีน preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) เป็นยีนที่สัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งหลายชนิดในมนุษย์ ทั้งมะเร็งชนิดก้อนและมะเร็งเม็ดเลือด และมีรายงานว่า การแสดงออกของยีน PRAME มีความสัมพันธ์กับผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งชนิดรุนแรง จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นตัวชี้วัดการดำเนินของโรค ติดตามการรักษา และพัฒนาการรักษาโรคมะเร็งแบบมุ่งเป้า อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับยีน PRAME ในกลุ่มผู้ป่วยไทยที่เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันแบบมัยอีลอยด์ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน PRAME และความสัมพันธ์กับโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันแบบมัยอีลอยด์ในผู้ป่วยไทยจำนวน 50 ราย และคนปกติที่มีสุขภาพดี จำนวน 30 ราย โดยใช้วิธี real time quantitative reverse transcription PCR (real time RT-qPCR) ผลการศึกษาพบว่า ผู้ป่วยไทยที่เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันแบบมัยอีลอยด์มีความถี่ของการแสดงออกของยีน PRAME ร้อยละ 58 และไม่พบการแสดงออกของยีน PRAME ในคนปกติ โดยการแสดงออกของยีน PRAME ในกลุ่มผู้ป่วยไม่สัมพันธ์กับปัจจัยเพศ จำนวนเม็ดเลือดขาวในกระแสเลือด ปริมาณฮีโมโกลบิน ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น จำนวนเกล็ดเลือด และจำนวนร้อยละของ blast ในไขกระดูกของผู้ป่วย ($p = 0.704, 0.094, 0.764, 0.438$ และ 0.598 ตามลำดับ) โดยสรุป การศึกษานี้เป็นครั้งแรกที่มีการตรวจพบและรายงานความถี่การแสดงออกของยีน PRAME ในผู้ป่วยไทยที่เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันแบบมัยอีลอยด์ ซึ่งจะส่งผลดีต่อการพัฒนาวิธีการรักษาแบบมุ่งเป้า โดยใช้ยีน PRAME เป็นเป้าหมายหลักของการรักษาด้วยวิธีเซลล์และภูมิคุ้มกันบำบัด (cellular immunotherapy) รวมทั้งอาจเป็นประโยชน์ในการใช้เป็นตัวบ่งชี้ร่วมกับตัวบ่งชี้อื่นเพื่อติดตามการรักษาหรือการจัดแนวทางในการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันแบบมัยอีลอยด์

คำสำคัญ: PRAME, RT-qPCR, มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันแบบมัยอีลอยด์

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: sawang.petvises@gmail.com

PRAME Gene Expression in Thai Acute Myeloid Leukemia and Disease Correlations

Tichayapa Phojanasenee^{1, 3} and Sawang Petvises^{1, 2*}

¹Graduate Program in Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University,
Pathum Thani Province, Thailand

²Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University,
Pathum Thani Province, Thailand

³Department of Medicine, Faculty of Medicine Ramathibodhi Hospital,
Mahidol University, Bangkok, Thailand

Abstract

Preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) is a tumor-associated antigen overexpressed in a wide variety of solid tumors and hematologic malignancies. Previous studies have shown high expression of PRAME in solid tumors with high potential as a prognostic marker and candidate target for immunotherapy. The PRAME expression in acute myeloid leukemia (AML) patients in Thailand has not yet been assessed. This study aimed to investigate the expression of PRAME gene in newly diagnosed Thai AML and its correlations with the disease. The real time quantitative reverse transcription PCR (real time RT-qPCR) was used to measure PRAME gene expression in 50 newly diagnosed Thai AML and 30 healthy control samples. The results revealed that 58% of AML samples expressed PRAME gene, while healthy control individuals showed no expression of the gene. PRAME expression levels in this study were not correlated with gender, white blood cell count, hemoglobin, hematocrit, platelet and number of blasts in the bone marrow of AML samples ($p = 0.704, 0.094, 0.764, 0.438$ and 0.598 , respectively). This study is the first to reveal PRAME gene expression in Thai AML. The result showing the presence of PRAME at high proportion in AML could be advantageous for developing targeted cellular immunotherapy against this type of hematologic malignancy.

Keywords: PRAME, RT-qPCR, Acute myeloid leukemia

*Corresponding author E-mail address: sawang.petvises@gmail.com

Introduction

Preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) is a 509 amino acid protein encoded by PRAME gene located on chromosome 22q11, firstly characterized in 1977⁽¹⁾. The PRAME gene expression is high in primary lesion and metastatic melanoma. The human PRAME protein is absent in normal adult tissues and cells of hematologic origin, except testis, adrenal gland, ovary and endometrium⁽²⁾. The profound overexpression of PRAME gene in cancers has led PRAME protein antigen to be classified as a member of cancer testis antigen (CTA) which is highly expressed in several types of solid tumors and hematologic malignancies. PRAME is highly expressed in small cell lung carcinoma, breast carcinoma, renal cell carcinoma, head and neck cancers, Hodgkin lymphoma, Wilm's tumor, medulloblastoma and neuroblastoma⁽⁴⁻⁹⁾. The high expression of PRAME is associated with disease progression and severity in some cancer types⁽¹⁰⁻¹⁴⁾.

The mechanism underlying PRAME gene expression in cancers remains unknown. Several studies have proposed that PRAME expression could be induced by prior oncogenic protein such as BCR-ABL1 and RUNX1-RUNX1T1. The activation of BCR-ABL1 gene following the chromosome translocation t(9;22)(q43;q11.2) in chronic myeloid leukemia and the activation of RUNX1-RUNX1T1 following the chromosome translocation t(8;21)(q22;q22) in acute myeloid

leukemia (AML) can lead to the induction of PRAME gene overexpression^(6, 10, 11). Another possible mechanism of PRAME gene expression is the hypomethylation status in cancer cells. The hypomethylation present in whole genomic site of cancers enable the activation of PRAME gene and finally lead to the presence of abundant protein antigen in cancer tissues^(15, 16).

PRAME antigen was also found in myeloid and lymphoid malignancies. The expression of PRAME was reported in acute lymphoblastic leukemia (ALL) which shows relation to disease progression and severity^(18, 19). This might lead to the use of PRAME as biomarker for disease management and intervention. The PRAME gene expression in myeloid leukemia was less mentioned in terms of its disease correlations, particularly in Thai AML patients. The understanding of PRAME gene expression in AML would be more beneficial to the therapeutic approaches and intervention.

This study aimed to investigate the expression of PRAME gene in newly diagnosed Thai AML patients by using real time quantitative reverse transcription PCR techniques. The expression of PRAME in AML samples was compared to that in the normal healthy individuals as controls. The prevalence of expression and possible correlations of PRAME and disease parameters was assessed to gain more insight information and further application of new findings into

the development of novel therapy to combat the AML and other type of deadly cancers.

Material and methods

AML samples

A total of 50 samples (peripheral blood or bone marrow samples) were obtained from Thai AML patients (32 males and 18 females). The age of AML patients ranged from 16 to 89 years (median age; 56 years). The AML diagnosis was made in accordance with standard leukemic blasts morphology, cytochemistry, immunophenotype of blasts and cytogenetic analysis. EDTA blood samples collected from 30 healthy individuals with no obvious illness and diseases were used as controls along with the study of PRAME gene expression. The study has been approved by the Institute

Biosafety Committee and Human Ethics of Thammasat University (064/2561).

RNA extraction and cDNA synthesis

RNA extraction was achieved by using QIAmp RNA blood mini kit (Qiagen, Germany). Reverse transcription was performed by iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad, USA). The primers specific for PRAME were obtained from the Primer-Blast program. The forward sequence of PRAME gene primer was 5'-ACATCCATGCATCTTCCTAC-3' and the reverse primer sequence was 5'-GGTTTCCAAGGGGTTCATCA-3'. The primers specific for ACTIN gene were obtained from the study of Baraka and colleagues⁽²²⁾ (Table 1). The final concentration of primers was 10 μM. The RNA was stored prior to the quantitative analysis by real time PCR.

Table 1 PRAME and ACTIN primer sequences used in the study. The 20 bps of forward and reverse sequences of PRAME and ACTIN genes are listed. The product size of PRAME and ACTIN genes were 173 and 285 bps, respectively

Primer	Sequence	Nucleotide (bp)	Tm (°C)	Product size (bp)
<i>PRAME forward</i>	5'-ACATCCATGCATCTTCCTAC-3'	20	56	173
<i>PRAME reverse</i>	5'-GGTTTCCAAGGGGTTCATCA-3'	20	58	
<i>Actin forward</i>	5'-AGCGAGCATCCCCAAAGTT-3'	20	60	285
<i>Actin reverse</i>	5'-GGGCACGAGGGCTCATCATT-3'	20	61	

Real time quantitative reverse transcription PCR (real time RT-qPCR)

The qPCR reaction mix was prepared by addition of 10 μ L Luna Universal qPCR Mix (New England Biolabs Inc., USA), 0.5 μ L forward primer, 0.5 μ L reverse primer, 5 μ L cDNA template and nuclease-free water to a final volume of 20 μ L. The qPCR reactions for PRAME and ACTIN were incubated at 95°C for 1 minute as initial denaturation, followed by 40 cycles of 15 seconds at 95°C and 30 seconds at 57°C as annealing and extension steps. For result interpretation, the transcription levels of PRAME as target gene were normalized with ACTIN as reference gene to calculate the variable cDNA concentration in each sample. The threshold cycle value (Cq) of PRAME gene in each reaction less than 40 cycles was considered as positive for PRAME gene expression. The delta Cq was calculated by subtraction of Cq values for the reference gene from Cq values of the target gene to demonstrate the level of PRAME gene expression. To test for positivity of the test detection system, the cDNA of SH-Sy-5y neuroblastoma cell line was used as positive control for PRAME gene expression in this study.

Statistical analysis

Data were analyzed by using SPSS version 18 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Numerical data were shown as mean, median

and standard deviation. Qualitative data were shown as frequency and percentage. Chi-square test was used to analyze characteristic variables of studied groups. Spearman-rho method was used to test correlation between numerical variables. The p -value < 0.05 was considered as statistically significance.

Results

General characteristics of AML patients

AML has been classified as hematologic malignancy with high severity. The main causes of AML involve cytogenetic abnormality and gene mutations occurring simultaneously. This study investigated the presence of PRAME gene, a subgroup of cancer testis antigen (CTA) found in several types of cancers. The expression of PRAME gene by quantitative real time PCR have been tested in 50 newly diagnosed AML blood and bone marrow samples. These consisted of 32 males and 18 females, the age ranged between 16 to 89 years (median age; 56 years). The WBC counts ranged from 1.19 to 556.2×10^9 cells/L (median range; 46.3×10^9 cells/L) and blast count ranged from 30 to 95% (median range; 80%). The majority of AML patients were anemic as shown by the low hematocrit (median range; 23.8%) and hemoglobin level (median range; 7.95 g/dL). Thrombocytopenia was very common in AML patients as highlighted by the low platelet counts (median range; 39.5×10^9 /L). (Table 2)

Table 2 General characteristics of Thai AML patients. The gender, age, white blood cell count (WBC), hemoglobin (Hb), hematocrit (Hct), platelet count and the number of blasts of AML patients are listed with the range, mean and median

Characteristics	Patient (N)		
Gender			
Male	32		
Female	18		
Characteristics	Patient		
	Range	Mean $\pm$ SD	Median
Age (year)	16 - 89	55.04 $\pm$ 16.7	56
Male	16 - 89	56.31 $\pm$ 18.96	57
Female	28 - 73	52.78 $\pm$ 11.84	55
WBC ($\times 10^9/L$)	1.19 - 556.2	94.28 $\pm$ 118.73	46.3
Hb (g/dL)	4.2 - 11.8	7.85 $\pm$ 1.78	7.95
Hct (%)	11.3 - 37.9	23.71 $\pm$ 5.29	23.8
Platelet ($\times 10^9/L$)	3.0 - 370	76.66 $\pm$ 802.42	39.5
BM Blast (%)	30 - 95	71 $\pm$ 0.22	80

PRAME gene expression in Thai AML samples

The detection of PRAME gene expression in 50 Thai AML samples by real time RT-qPCR was performed simultaneously with 30 healthy controls. The results showed that 29 out of 50 AML samples (58%) were positive for PRAME gene expression, the threshold cycles (Cq) ranged from 25.26 to 36.00 (mean Cq; 31.27, median Cq; 31.90). The melting temperature (Tm) for PRAME gene detection was 83.00. The Cq for ACTIN reference gene ranged from 13.08 to 21.68

(mean Cq; 18.00, median Cq; 18.52) (Table 3). The amplification curve of positive PRAME gene samples and positive control (SH-Sy-5y) are shown in Fig. 1. There was no PRAME gene expression in peripheral blood collected from healthy control individuals indicating the cancer specific characteristic of PRAME gene. Randomly selected 5 PRAME gene positive samples were confirmed by DNA sequencing. All 5 PRAME positive samples were shown 100% identity to Homo sapiens PRAME mRNA covered all of 11 variants (data not shown).

Table 3 The threshold cycle (Cq) of PRAME gene expression in 50 Thai AML samples

Sample	Threshold cycle, Cq (n)		
	<i>PRAME</i> (Cq target)	<i>Actin</i> (Cq reference)	Cq (Cq target – Cq reference)
P01	30.24	19.20	11.04
P02	27.71	16.69	11.02
P03	31.65	16.53	15.12
P04	27.70	16.69	15.12
P05	27.91	20.43	7.48
P06	29.43	15.69	13.74
P07	N/A	18.17	-
P08	29.88	19.22	10.66
P09	32.23	17.13	15.10
P10	25.26	20.06	5.2
P11	N/A	21.66	-
P12	N/A	19.65	-
P13	29.46	15.26	14.2
P14	30.13	18.91	11.22
P15	N/A	18.70	-
P16	N/A	19.93	-
P17	N/A	20.22	-
P18	34.31	15.53	18.78
P19	33.76	18.28	15.48
P20	N/A	21.00	-
P21	N/A	19.61	-
P22	N/A	16.92	-
P23	N/A	21.41	-
P24	N/A	21.68	-
P25	28.94	21.36	7.58
P26	32.43	17.24	15.19

Table 3 The threshold cycle (Cq) of PRAME gene expression in 50 Thai AML samples (Continued)

Sample	Threshold cycle, Cq (n)		
	<i>PRAME</i> (Cq target)	<i>Actin</i> (Cq reference)	Cq (Cq target – Cq reference)
P27	26.29	18.72	7.57
P28	N/A	19.52	-
P29	N/A	17.64	-
P30	N/A	18.62	-
P31	33.60	21.00	12.60
P32	32.36	19.46	12.90
P33	36.00	16.11	19.89
P34	33.94	15.30	18.64
P35	32.90	16.30	16.60
P36	N/A	18.87	-
P37	31.90	14.30	17.60
P38	N/A	18.19	-
P39	N/A	20.35	-
P40	33.40	15.39	18.01
P41	N/A	19.67	-
P42	34.04	13.08	20.96
P43	34.75	13.89	20.86
P44	N/A	18.42	-
P45	33.15	13.22	19.93
P46	N/A	20.14	-
P47	34.13	15.35	18.78
P48	N/A	15.97	-
P49	29.95	19.42	10.53
P50	29.37	13.77	15.60
Range	25.26 – 36.00	13.08 – 21.68	5.20 – 20.96
Mean ± SD	31.27 ± 2.75	18.00 ± 2.36	14.25 ± 4.39
Median	31.90	18.52	15.10

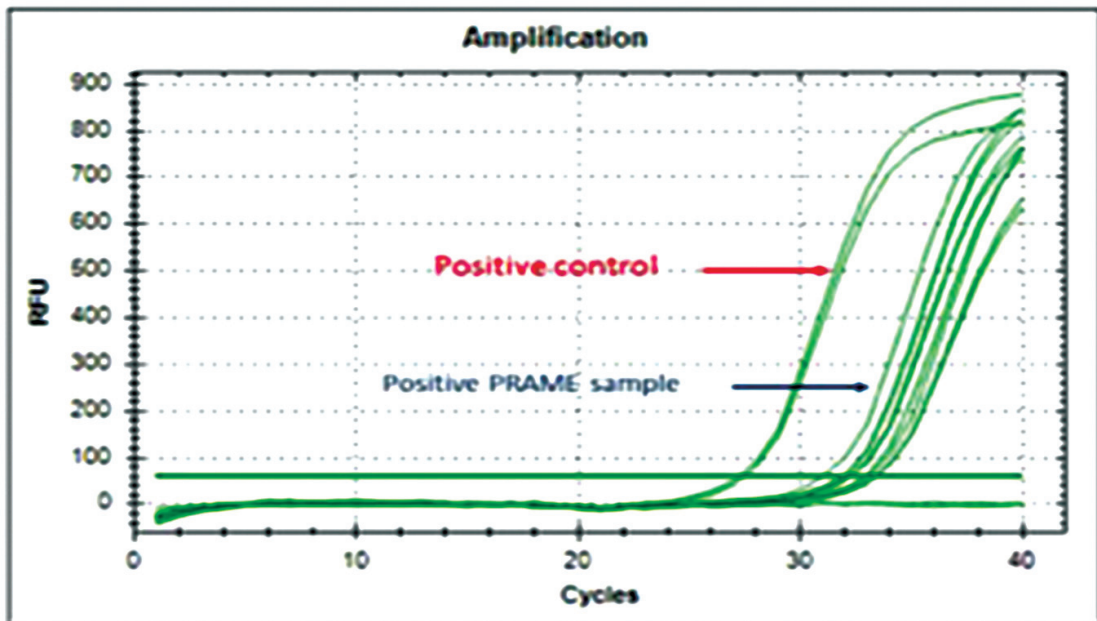


Fig. 1 The amplification curve of PRAME gene. The Cq of positive PRAME samples and positive control are depicted in amplification curves

PRAME gene expression and disease correlations

PRAME gene expression was revealed in 29 AML samples (58%) in this study. The correlation with general characteristic and hematologic parameters was conducted by using statistic tools to assess the significant level. There were 16 males and 13 females who were positive for PRAME gene expression. The *p*-values for gender and PRAME in male and female AML samples were 0.242 and 0.668, respectively. The expression of PRAME gene was also tested for its correlation with WBC counts, hemoglobin, hematocrit, platelet and number of blasts in bone marrow. Comparative statistical *p*-values between PRAME and WBC counts, hemoglobin, hematocrit, platelet and

bone marrow blasts were 0.704, 0.094, 0.764, 0.438 and 0.598, respectively (Table 4). There were no significant correlations between PRAME gene expression and WBC counts, hemoglobin, hematocrit, platelet and number of blasts in bone marrow.

Discussion

PRAME gene is a member of cancer testis antigen (CTA) expressed in a wide variety of cancers including melanoma, breast cancers, head and neck cancers, Wilm's tumors, medulloblastoma, Hodgkin lymphoma, neuroblastoma, myeloid and lymphoid leukemia. The expression of PRAME has been related to disease progression, prognostic marker and severity in several types of

Table 4 The PRAME gene expression and its correlations with gender, WBC counts, hemoglobin, hematocrit, bone marrow blasts and platelet status

Parameter	PRAME (+) N (%)	PRAME (-) N (%)	p-value
Patient (N = 50)	29 (58)	21 (42)	
Gender			
Male (N = 32)	16 (50)	16 (50)	0.242
Female (N = 18)	13 (72.22)	5 (27.78)	
WBC ($\times 10^9/L$)			
≤ 50 (N = 26)	14 (53.85)	12 (46.15)	0.704
> 50 (N = 24)	15 (62.50)	9 (37.5)	
Hb (g/dL)			
≤ 8 (N = 26)	18 (69.23)	8 (30.77)	0.094
> 8 (N = 24)	11 (45.83)	13 (54.17)	
Hct (%)			
≤ 20 (N = 13)	8 (61.54)	5 (38.46)	0.764
> 20 (N = 37)	21 (56.76)	16 (43.24)	
BM Blast (%)			
20 – 40 (N = 7)	5 (71.43)	2 (28.57)	0.598
41 – 60 (N = 12)	7 (58.33)	5 (41.67)	
61 – 80 (N = 10)	5 (50)	5 (50)	
81 – 100 (N = 21)	12 (57.14)	9 (42.86)	
Platelet status			
Thrombocytopenia (N = 43)	24 (55.81)	19 (44.19)	0.438
Adequate (N = 7)	5 (71.43)	2 (28.57)	

malignancies. These highlight the beneficial of PRAME in terms of therapeutic intervention and management to get the best treatment of choice for deadly cancers. This study showed,

for the first time, the expression of PRAME gene in newly diagnosed Thai AML patients. Amongst the 50 AML samples, PRAME gene expression was detected in 29 samples,

representing 58% of total AML patients. The expression of PRAME in our study is consistent with the finding of Epping MT *et al.* in which the role of PRAME in cancers was described⁽⁷⁾. The expression of PRAME in larger proportion of Thai AML would be advantageous for the development of targeted therapy in AML. Since the expression of PRAME is restricted to the cancerous tissues^(15, 17, 19 - 21) the use of PRAME as candidate antigen for adoptive immunotherapy is very prominent and possible, for instance, PRAME-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL), engineered chimeric antigen receptor T cells (CAR T cells), and the development of specific antibodies target the PRAME antigen.

The correlation between PRAME and general characteristics of Thai AML patients has also been investigated to gain more understanding of gene expression and disease status. The 50 Thai AML patients in the study were mostly anemic as shown by the low level of hematocrit and hemoglobin. The majority of AML patients were thrombocytopenic with a variety of leukocytosis. These demonstrated that the Thai AML patients were at high risk of severe anemia, bleeding tendency and more prone to infection due to loss of normal functional blood cells. The correlations between PRAME and gender, peripheral blood hematological parameters and bone marrow blasts were determined by statistical tools^(2, 3, 10). There was no correlation between PRAME and patient gender, WBC counts,

hemoglobin, hematocrit, platelet number and bone marrow blasts. These might be due to the preferentially low sample size of the study. Since the annual occurrence of AML in Thailand is not high enough, the accumulation of patient samples is limited. Further studies need to be conducted for better outcome.

Overall, our study revealed, for the first time, the expression of PRAME in newly diagnosed AML in Thailand. Even though the proportion of PRAME gene expression in Thai AML patients did not differ when compared with the other ethnic and races, the expression of PRAME has shown a promising tumor target antigen that can be further explored⁽²²⁾. The proportionally high expression of PRAME in AML patients might lead to the development of novel treatment to fight the course of hematologic malignancies. By virtue of PRAME being the most privilege CTA together with the capacity to be recognized by MHC II molecules, this would enable the recognition by cytotoxic T lymphocytes and other immune cells resulting in the functional immune response against PRAME positive cancers. These would ultimately lead to the adoptive use of PRAME as target antigen for cellular immunotherapy via different strategies. Furthermore, to gain more information on PRAME expression in AML, prospective studies equipped with more advanced scientific tools would be necessary to pursue for better beneficiary outcome in the field of cancer research.

References

- Ikeda H, Lethé B, Lehmann F, *et al.* Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity* 1997; 6: 199-208.
- Van Baren N, Chambost H, Ferrant A, *et al.* PRAME, a gene encoding an antigen recognized on a human melanoma by cytolytic T cells, is expressed in acute leukaemia cells. *Br J Haematol* 1998; 102: 1376-9.
- Wadelin F, Fulton J, McEwan PA, Spriggs KA, Emsley J, Heery DM. Leucine-rich repeat protein PRAME: expression, potential functions and clinical implications for leukaemia. *Mol Cancer* 2010; 9: 226.
- Matsushita M, Ikeda H, Kizaki M, *et al.* Quantitative monitoring of the PRAME gene for the detection of minimal residual disease in leukaemia. *Br J Haematol* 2001; 112: 916-26.
- Kiyoshi W, Arinobu T, Tokiko N, *et al.* Identification of a melanoma antigen, PRAME, as a BCR/ABL-inducible gene. *FEBS* 2000: 367-71.
- Thierry P, Julio C. V, Takeshi N, *et al.* Upregulation of *SOX9* inhibits the growth of human and mouse melanomas and restores their sensitivity to retinoic acid. *J Clin Invest* 2009; 119: 954-63.
- Epping MT, Bernards R. A causal role for the human tumor antigen preferentially expressed antigen of melanoma in cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 10639-42.
- Oberthuer A, Hero B, Spitz R, Berthold F, Fischer M. The tumor-associated antigen PRAME is universally expressed in high-stage neuroblastoma and associated with poor outcome. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4307-13.
- van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, *et al.* Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002; 415: 530-6.
- Steinbach D, Hermann J, Viehmann S, Zintl F, Gruhn B. Clinical implications of PRAME gene expression in childhood acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2002; 133: 118-23.
- Paydas S, Tanriverdi K, Yavuz S, Seydaoglu G. PRAME mRNA levels in cases with chronic leukemia: Clinical importance and review of the literature. *Leuk Res* 2007; 31: 365-9.
- Ercolak V, Paydas S, Bagir E, *et al.* PRAME expression and its clinical relevance in Hodgkin's lymphoma. *Acta Haematol* 2015; 134: 199-207.
- Andrade VC, Vettore AL, Felix RS, *et al.* Prognostic impact of cancer/testis antigen expression in advanced stage multiple myeloma patients. *Cancer Immun* 2008; 8: 2.

14. Epping MT, Wang L, Edel MJ, Carlée L, Hernandez M, Bernards R. The human tumor antigen PRAME is a dominant repressor of retinoic acid receptor signaling. *Cell* 2005; 122: 835-47.
15. Tanaka N, Wang YH, Shiseki M, Takanashi M, Motoji T. Inhibition of PRAME expression causes cell cycle arrest and apoptosis in leukemic cells. *Leuk Res* 2011; 35: 1219-25.
16. Tajeddine N, Gala JL, Louis M, Van Schoor M, Tombal B, Gailly P. Tumor-associated antigen preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) induces caspase-independent cell death in vitro and reduces tumorigenicity in vivo. *Cancer Res* 2005; 65: 7348-55.
17. Kawano R, Karube K, Kikuchi M, *et al.* Oncogene associated cDNA microarray analysis shows PRAME gene expression is a marker for response to anthracycline containing chemotherapy in patients with diffuse-large B cell lymphoma. *J Clin Exp Hematop* 2009; 49: 1-7.
18. Quintarelli C, Dotti G, De Angelis B, *et al.* Cytotoxic T lymphocytes directed to the preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) target chronic myeloid leukemia. *Blood* 2008; 112: 1876-85.
19. Rezvani K, Yong AS, Tawab A, *et al.* Ex vivo characterization of polyclonal memory CD8+ T-cell responses to PRAME-specific peptides in patients with acute lymphoblastic leukemia and acute and chronic myeloid leukemia. *Blood* 2009; 113: 2245-55.
20. Schenk T, Stengel S, Goellner S, Steinbach D, Saluz HP. Hypomethylation of PRAME is responsible for its aberrant overexpression in human malignancies. *Genes Chromosomes Cancer* 2007; 46: 796-804.
21. Khorshed AM, Mossallam GI, Assem MM, Hamid TMA, Basset GA, Shafik RE. Expression of PRAME gene in Egyptian adult acute myeloid leukemia and its correlation with clinical response. *Life Science* 2012; 9: 1117-21.
22. Baraka A, Hashem ME, Elshorbagy S, Hassanein M, Elsayed SF. Clinical importance of PRAME gene expression in acute myeloid leukemia. *J Blood Disord Transfus* 2016; 7: Report No.: 1000373.

Prevalence of Colistin Resistance among Third Generation Cephalosporins- or Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Isolated from Clinical Specimens in Ratchaburi Hospital, Thailand

Puncharat Wongut-sa^{1,2}, Pradchama Khumdee³, Worada Samosornsuk³,
Jiraporn Yansombat³ and Seksun Samosornsuk^{3*}

¹Microbiology Division, Department of Medical Technology and Clinical Pathology, Ratchaburi Hospital, Ratchaburi Province, Thailand

²Graduate Program in Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Pathum Thani Province, Thailand

^{3*}Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Pathum Thani Province, Thailand

Abstract

Currently, carbapenem and colistin resistant Gram negative bacilli are increasingly reported worldwide. Moreover, *mcr-1*, a plasmid-mediated colistin resistant gene, has recently been reported. The finding has brought clinical concern because colistin is the last-resort antibiotic for the treatment of extensively drug-resistant Gram-negative bacterial infections. Therefore, the prevalence data of colistin-resistant bacteria in different areas of the country can be used to support the prevention and control measures of these organisms. The objectives of this research were to determine the prevalence of colistin resistance and investigate the *mcr-1* genes among third generation cephalosporin-or carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolated from patients in Ratchaburi Hospital during June 2016 to May 2017. A total of 243, non-duplicated and non-intrinsic resistance to colistin, clinical isolates of third generation cephalosporins- or carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* were used in this study. The bacterial isolates were screened for colistin resistance using Mueller-Hinton agar containing 2 µg/mL of colistin. The colistin resistant isolates were determined the MIC of colistin using

*Corresponding author E-mail address: seksun@hotmail.com

broth microdilution and the *mcr-1* gene was investigated using PCR assay. Forty (16.5 %) of 243 third generation cephalosporins- or carbapenem-resistant isolates were resistant to colistin. These strains were mostly detected in surgery, medicine and ICU wards at 45.0, 37.5 and 10.0 %, respectively. Urine, sputum and pus/swab were the top three sources where 42.5, 27.5 and 15.0 %, respectively, of colistin-resistant isolates were detected. The colistin MICs of these isolates ranged from 4 to > 64 µg/mL. The *mcr-1* gene was detected in 6 isolates, 5 from surgery and 1 from a medicine ward, in 3 pus/swab, 2 sputum and a blood sample, all of which were identified as *Escherichia coli*. The colistin MICs of the *mcr-1* positive isolates ranged from 4 to 16 µg/mL. In conclusion, the prevalence of colistin resistance and the existence of *mcr-1* gene in third generation cephalosporins- or carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* among patients in Ratchaburi Hospital would raise the awareness and proper use of antibiotics. The information could also be used as an input for prevention and control of the hospital spreading of these resistant organisms.

Keywords: Colistin resistant *Enterobacteriaceae*, *mcr-1*

ความชุกของการดื้อยาโคลิสตินของแบคทีเรีย *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม Third Generation Cephalosporins หรือคาร์บาเพนิมที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของ ผู้ป่วยในโรงพยาบาลราชบุรี

บุญธรรม วัชรอุตสาห^{1,2} ปรัชมา คำดี³ วรดา สโมสรสุข³ จิราภรณ์ ญาณสมบัติ³ และ
เสกสรรค์ สโมสรสุข^{3*}

¹งานจุลชีววิทยา กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลราชบุรี จังหวัดราชบุรี

²บัณฑิตศึกษา สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี

³ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี

บทคัดย่อ

ปัจจุบันมีรายงานแบคทีเรียแกรมลบดื้อยากลุ่มคาร์บาเพนิม (carbapenems) ร่วมกับการดื้อยาโคลิสติน (colistin) เพิ่มขึ้นทั่วโลก และมีรายงานพบยีน *mcr-1* ซึ่งเป็นยีนสัมพันธ์กับการดื้อยาโคลิสตินบนพลาสมิด จึงต้องให้ความสำคัญเป็นอย่างยิ่งกับการศึกษาวิจัยแบคทีเรียเหล่านี้ เนื่องจากโคลิสตินเป็นยาลำดับท้าย ๆ สำหรับรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อต่อยาเกือบทุกขนาน ดังนั้น ความรู้เกี่ยวกับแบคทีเรียดื้อยาโคลิสติน ในพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศ จะช่วยสนับสนุนมาตรการการควบคุมและป้องกันการแพร่กระจายเชื้อดื้อยาเหล่านี้ได้ การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาความชุกของการดื้อยาโคลิสติน และหายีน *mcr-1* ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม third generation cephalosporins และหรือคาร์บาเพนิม ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจที่ส่งตรวจเพาะเชื้อที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โรงพยาบาลราชบุรี ตั้งแต่เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2559 ถึงเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2560 ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียแกรมลบวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อยากลุ่ม third generation cephalosporins หรือคาร์บาเพนิมที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ ซึ่งเป็นตัวอย่างจากผู้ป่วยไม่ซ้ำรายและไม่เป็นเชื้อที่ดื้อยา colistin โดยกำเนิด (intrinsic resistance) จำนวนทั้งสิ้น 243 ตัวอย่างถูกนำมาคัดกรองการดื้อต่อยา colistin โดยใช้ Mueller Hinton agar ที่มีโคลิสติน 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้น นำเชื้อที่ดื้อต่อยาโคลิสติน จากการคัดกรอง มาทดสอบหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ต่อโคลิสตินด้วยวิธี broth microdilution และตรวจหายีน *mcr-1* ด้วยวิธี

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: seksun@hotmail.com

รับบทความ: 22 มิถุนายน 2562

แก้ไขบทความ: 17 สิงหาคม 2562

รับตีพิมพ์บทความ: 24 กุมภาพันธ์ 2563

polymerase chain reaction (PCR) จากการศึกษาพบว่า ในเชื้อแกรมลบ *Enterobacteriaceae* ดื้อต่อยากลุ่ม third generation cephalosporins หรือคาร์บาเพนิม จำนวน 243 ตัวอย่าง พบเชื้อดื้อยาโคลิสติน จำนวน 40 ตัวอย่าง (ร้อยละ 16.5) โดยพบมากที่สุดจากผู้ป่วยแผนกศัลยกรรม แผนกอายุรกรรม และแผนกผู้ป่วยระยะวิกฤต (intensive care unit, ICU) คิดเป็นร้อยละ 45.0, 37.5 และ 10.0 ตามลำดับ ชนิดของสิ่งส่งตรวจที่พบเชื้อดื้อยาโคลิสตินมากที่สุด ได้แก่ ปัสสาวะ เสมหะ และหนองหรือไม้ป้าย (swab) คิดเป็นร้อยละ 42.5, 27.5 และ 15.0 ตามลำดับ โดยค่า MIC ต่อยาโคลิสตินพบอยู่ในช่วง 4 ถึง >64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพบเชื้อที่ให้ผลบวกต่อยีน *mcr-1* จำนวน 6 ตัวอย่าง ซึ่งเป็น *Escherichia coli* ทั้งหมด เชื้อที่พบยีน *mcr-1* ได้จากผู้ป่วยแผนกศัลยกรรม 5 ตัวอย่าง และอายุรกรรม 1 ตัวอย่าง โดยแยกได้จากสิ่งส่งตรวจชนิดหนองหรือไม้ป้าย 3 ตัวอย่าง เสมหะ 2 ตัวอย่าง และเลือด 1 ตัวอย่าง และมีค่า MIC ต่อยาโคลิสตินอยู่ในช่วง 4 ถึง 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสรุปความชุกของการดื้อยาโคลิสติน และการพบยีน *mcr-1* ในเชื้อ *Enterobacteriaceae* ดื้อต่อยากลุ่ม third generation cephalosporins หรือคาร์บาเพนิมที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลราชบุรี จะเป็นข้อมูลให้แก่แพทย์และบุคลากรทางการแพทย์ที่เกี่ยวข้องตระหนักในการเลือกใช้ยารักษา ตลอดจนใช้ประกอบการจัดทำมาตรการป้องกันและควบคุมการแพร่กระจายเชื้อในโรงพยาบาล

คำสำคัญ: *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อโคลิสติน, ยีน *mcr-1*

บทนำ

ปัจจุบันปัญหาการดื้อยาของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคมิแนวนโนสูงชัน มีการติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะปีละกว่า 100,000 คน สาเหตุสำคัญมาจากการใช้ยาต้านจุลินทรีย์มากขึ้น ทั้งการใช้ยาที่ไม่จำเป็นและเกินความจำเป็น โดยมูลค่าการใช้ยาปฏิชีวนะของประชากรไทยมากกว่า 10,000 ล้านบาทต่อปี และมีการติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะปีละกว่า 100,000 คน ทำให้ยาปฏิชีวนะชนิดเก่าที่เคยใช้ไม่ได้ผลเท่าที่ควร ผู้ป่วยบางรายต้องเปลี่ยนใช้ยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าและมีราคาแพง⁽¹⁾ การรักษาเชื้อดื้อยาบางชนิด ไม่มียารักษาที่มีประสิทธิภาพดีและปลอดภัยทำให้ค่าใช้จ่ายในการรักษาเพิ่มขึ้น ใช้เวลารักษานานขึ้นและโอกาสเสียชีวิตสูง นอกจากนั้นแบคทีเรียเหล่านี้สามารถถ่ายทอดรหัสพันธุกรรมดื้อยาไปสู่แบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ ทำให้ปัญหาการดื้อยาทวีความรุนแรงยิ่งขึ้น ทั้งนี้จากศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาด้านจุลินทรีย์แห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ระบุว่าอัตราความชุกของแบคทีเรียดื้อยาเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง แบคทีเรียแกรมลบวงศ์ *Enterobacteriaceae* ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumoniae*⁽²⁾ ซึ่งการดื้อยาของเชื้อแกรมลบวงศ์นี้เป็นปัญหามากที่สุด คือการดื้อยากลุ่มคาร์บาเพนิม (carbapenem) ซึ่งถือว่าเป็นยากลุ่มที่มีฤทธิ์กว้างที่สุด ดังนั้นการรักษาโรคติดเชื้อจากเชื้อกลุ่มนี้จึงมีความจำเป็นต้องใช้ยาอื่นที่ยังคงมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ เช่น ยาโคลิสติน (colistin)

ยาโคลิสติน หรือ polymyxin E เป็นยาในกลุ่ม polymyxins มีโครงสร้างเป็นสารโพลีเปปไทด์ที่เชื่อมต่อกับกรดไขมัน ผลิตโดยเชื้อ *Bacillus polymyxa* subspecies *colistinus* มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียโดย cationic polypeptide ของยาโคลิสตินทำปฏิกิริยากับ anionic lipopolysaccharide (LPS)

ที่เยื่อหุ้มชั้นนอก (outer membrane) ของแบคทีเรียแกรมลบ ทำให้ยาเข้าแทนที่แมกนีเซียม (Mg^{+2}) และแคลเซียม (Ca^{+2}) ทำให้เกิดการเพิ่ม permeability ของผนังเซลล์ ทำให้ cytoplasmic membrane แยกออกจากกัน ส่งผลให้เซลล์แบคทีเรียตาย⁽³⁾ อย่างไรก็ตาม มีรายงานการดื้อยาโคลิสตินในแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งมีกลไกสำคัญคือการดัดแปลง LPS จากการกลายพันธุ์ของ two-component regulatory system (TCS) ได้แก่ PhoP/PhoQ TCS และ PmrA/PmrB TCS การกลายพันธุ์ของ MgrB ซึ่งทำหน้าที่กดการทำงาน (negative feedback) ของ PhoP/PhoQ TCS การกลายพันธุ์เหล่านี้ทำให้มีการเพิ่มของโมเลกุล 4-amino-4-deoxy-L-arabinose (L-Ara4N) และ phosphoethanolamine (PEtN) ซึ่งมีประจุบวกบน lipid A จึงไปลดปฏิกิริยาระหว่าง cationic polypeptide ของโคลิสติน กับ anionic lipopolysaccharide (LPS) ทำให้เชื้อดื้อยาโคลิสติน หรือการสร้าง efflux pump เพื่อขับยาออกนอกเซลล์ซึ่งพบในเชื้อ *K. pneumoniae* เกิดจากยีน *acrAB* และ *kpnEF* ซึ่งกลไกการดื้อยาโคลิสตินเหล่านี้เป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นในโครโมโซม (chromosomally-mediated)^(4,5) ในปี พ.ศ. 2558 นักวิจัยจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ภาคใต้ของจีน รายงานพบเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อยาโคลิสตินในเนื้อสุกร จากยีน *mcr-1* (plasmid-mediated colistin resistance) บนพลาสมิดของแบคทีเรียเป็นครั้งแรก ซึ่งพลาสมิดที่มียีนนี้สามารถถ่ายทอดไปสู่แบคทีเรียชนิดอื่นได้⁽⁶⁾ และมีข้อมูลที่บ่งชี้ว่าอุบัติการณ์เชื้อดื้อยาโคลิสตินสายพันธุ์ที่มียีน *mcr-1* มีการแพร่กระจายในหลาย ภูมิภาคทั่วโลก ต่อมา Xavier และคณะ จากประเทศเบลเยียมศึกษาการดื้อยาโคลิสตินของเชื้อ *E. coli* พบว่าเกิดจากยีน *mcr-2* ที่พบอยู่บนพลาสมิดของแบคทีเรียเช่นเดียวกับยีน *mcr-1*⁽⁷⁾ สำหรับประเทศไทย เริ่มมีรายงานครั้งแรกจากสถาบันวิจัย

วิทยาศาสตร์สาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี โดยศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาด้านจุลชีพแห่งชาติ เมื่อเดือนเมษายน พ.ศ. 2559 โดยตรวจพบ *E. coli* ที่ดื้อต่ยาโคลิสติน มียีนดื้อยา *mcr-1* จากตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาตัวที่โรงพยาบาลเพชรบูรณ์ และพบอีก 4 ราย จากตัวอย่างของผู้ป่วยจังหวัดนนทบุรี จันทบุรี และนครศรีธรรมราช จากอุบัติเหตุการดังกล่าว ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาแบคทีเรียแกรมลบวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่ยาโคลิสติน ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลราชบุรี เนื่องจากยาโคลิสติน ถูกนำมาใช้สำหรับการรักษาการติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจาก multidrug resistant Gram negative bacilli และการติดเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่ยาคาร์บาพีเนมเมส (carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*; CRE) ซึ่งปัจจุบันพบว่าโรงพยาบาลราชบุรีพบเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่ยาคาร์บาพีเนมเพิ่มขึ้นเป็นลำดับ คือ ในปี พ.ศ. 2557 พบ 58 ราย ปี พ.ศ. 2558 พบ 63 ราย และในปีพ.ศ. 2559 พบ 108 ราย แพทย์จำเป็นต้องใช้ยาโคลิสตินมากขึ้น ทำให้มีโอกาสพบเชื้อดื้อยาโคลิสตินมากขึ้น และจากนโยบายการเฝ้าระวังเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่ยาโคลิสติน ของกระทรวงสาธารณสุข แต่ยังมีข้อจำกัดในการทดสอบการดื้อต่ยาโคลิสติน คือไม่สามารถใช้วิธี disk diffusion หรือ modified Kirby-Bauer หรือการทดสอบด้วย E-test ต้องใช้วิธี broth dilution เท่านั้น และเนื่องจากโรงพยาบาลราชบุรีมีข้อจำกัดในการทำ MIC ด้วยวิธี broth dilution เป็นเหตุให้ไม่มีข้อมูลผลการทดสอบความไวของเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* ต่อยาโคลิสตินในโรงพยาบาลราชบุรี ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาหาความชุกของการดื้อต่ยาโคลิสติน ของเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม third generation cephalosporins หรือคาร์บาพีเนม และศึกษาหายีน *mcr-1* ในตัวอย่าง

สิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในโรงพยาบาลราชบุรี ผลการศึกษาครั้งนี้จะเป็นข้อมูลในการศึกษาทางระบาดวิทยา เพื่อกำหนดมาตรการควบคุมเชื้อดื้อยาและเป็นข้อมูลในการเฝ้าระวังการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาด้านจุลชีพในโรงพยาบาลราชบุรีต่อไป

วัสดุและวิธีการ

1. ตัวอย่างเชื้อ

ตัวอย่างเชื้อที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม third generation cephalosporins หรือคาร์บาพีเนม ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยไม่ซ้ำราย และผ่านการทดสอบยืนยันชนิดเชื้อด้วยการทดสอบทางชีวเคมี (biochemical test) ของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โรงพยาบาลราชบุรี ทั้งนี้ตัวอย่างเชื้อที่ใช้ในการศึกษาไม่ใช่เชื้อที่ดื้อต่ยาโคลิสตินโดยกำเนิด ประกอบด้วย *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Morganella morganii* และ *Serratia* spp. เก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2559 ถึงเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2560 จำนวนทั้งสิ้น 243 ตัวอย่าง ตัวอย่างเชื้อถูกเก็บรักษาใน glycerol stock ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส โดยทำการเพาะเชื้อบน MacConkey agar (Becton Dickinson, USA) และนำไปบ่มที่ตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 33-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ก่อนนำมาใช้ในการทดสอบ

2. การตรวจคัดกรองเชื้อดื้อยาโคลิสติน โดยวิธี agar screening

เจือจางเชื้อตัวอย่างใน normal saline solution (NSS) ปริมาตร 3 มิลลิตร และปรับความขุ่นให้เทียบเท่ากับ McFarland standards No. 0.5 จากนั้น นำเชื้อปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar (MHA)

(Becton Dickinson, USA) ที่มียาโคลิสติน 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) หลังจาก บ่มที่อุณหภูมิ 33-37 องศาเซลเซียส นาน 16-20 ชั่วโมง นำเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อมาทดสอบหาค่า MIC และนำไปสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจหายีน *mcr-1* ต่อไป

3. การทดสอบความไวแบบปริมาณวิเคราะห์ของเชื้อต่อยาโคลิสติน ด้วยวิธี broth microdilution

นำเชื้อที่ขึ้นบน screening agar มาทดสอบหาค่า MIC ด้วยวิธี broth microdilution^(8, 9) ที่ระดับความเข้มข้นของยาโคลิสติน เท่ากับ 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 16, 32 และ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และควบคุมคุณภาพการทดสอบด้วยเชื้ออ้างอิงมาตรฐาน *E. coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *E. coli* NCTC 13846 (colistin resistant strain) นำค่า MIC ที่ได้มาแปลผลการทดสอบตามที่กำหนดโดยมาตรฐานของ European Committee on

Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST 2018)⁽¹⁰⁾ ซึ่งแปลผลการดื้อยาโดยใช้ค่า MIC break-point >2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4. การตรวจหายีน *mcr-1* ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

เตรียม boiled DNA template โดยเฉพาะเชื้อที่เจริญบน screening agar ใน Tryptic soy broth (Bacto™, France) บ่มที่อุณหภูมิ 33-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาผสมกับ TE buffer 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ 13,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนใส (supernatant) ทิ้งแล้วเติม TE buffer 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปเข้า heat box ที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็ง 3 นาที นำไปปั่น 13,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที และดูดเก็บส่วนใส นำไปตรวจหายีน *mcr-1* ด้วย PCR โดย primer ที่เลือกใช้ แสดงใน Table 1

Table 1 Primers used for amplification of the *mcr-1* gene

Target gene	Primer sequences	Amplicon size (bp)	Reference
<i>mcr-1</i>	CLR F 5'CGGTCAAGTCCGTTTGTTC'3 CLR R 5'CTTGGTCGGTCTGTAGGG'3	309	Liu et al., 2015

ปฏิกิริยา PCR ในปริมาตรทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dNTP ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์, primer แต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์, DNA Taq polymerase ที่ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร และ boiled DNA template ปริมาตร 2 ไมโครลิตร สำหรับ PCR condition ที่ใช้ประกอบด้วย initial denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที denaturation

ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที annealing ที่ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที เป็นจำนวน 35 รอบ และ final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นของเจลเท่ากับร้อยละ 2.0 (w/v)

ผลการวิจัย

1. ผลการตรวจคัดกรองหาเชื้อดื้อยาโคลิสติน ที่ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และผลตรวจยืนยันด้วย MIC

จากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อยากลุ่ม third generation cephalosporins หรือ คาร์บาพีเนม จำนวน 243 ตัวอย่าง พบเป็น *E. coli* 146 ตัวอย่าง *K. pneumoniae* 86 ตัวอย่าง *Enterobacter cloacae* complex 8 ตัวอย่าง *Klebsiella aerogenes* 2 ตัวอย่าง และ *Salmonella* spp. 1 ตัวอย่าง เมื่อนำมาทดสอบคัดกรองการดื้อยาโคลิสติน โดยวิธี agar screening พบว่าให้ผลบวกจำนวน 48 ตัวอย่าง และเมื่อนำไปตรวจหาค่า MIC ต่อยาโคลิสตินด้วยวิธี

broth microdilution พบว่าเชื้อดื้อต่อยาโคลิสติน จำนวน 40 ตัวอย่าง (ร้อยละ 16.4) โดยเป็น *E. coli* 21 ตัวอย่าง และ *K. pneumoniae* 19 ตัวอย่าง

เมื่อจำแนกเชื้อดื้อยาทั้ง 40 ตัวอย่างตามแผนกผู้ป่วยและชนิดสิ่งส่งตรวจ พบว่าแหล่งหลักของเชื้อดื้อต่อยาโคลิสตินคือผู้ป่วยแผนกศัลยกรรมและแผนกอายุรกรรม ซึ่งครอบคลุมกว่าร้อยละ 80 ของเชื้อดื้อยาที่พบ (Table 2) และเมื่อจำแนกตามประเภทสิ่งส่งตรวจพบว่า เชื้อส่วนใหญ่พบมากที่สุดจากสิ่งส่งตรวจจากปัสสาวะร้อยละ 42.5 (17/40) รองลงมาเป็นเชื้อที่พบจากเสมหะ ร้อยละ 27.5 (11/40) และจากหนองหรือไขข้อ ร้อยละ 15 (6/40) (Table 3)

Table 2 Distribution of colistin resistant *Enterobacteriaceae* in different departments

Department	Colistin resistant <i>Enterobacteriaceae</i> (n)		Total (n)	%
	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>		
Surgery	13	5	18	45.0
Internal medicine	6	9	15	37.5
Intensive care unit	0	4	4	10.0
Pediatrics	1	0	1	2.5
Physical medicine and rehabilitation	0	1	1	2.5
Outpatient	1	0	1	2.5
Total (n)	21	19	40	100

Table 3 Distribution of colistin resistant *Enterobacteriaceae* in different clinical specimens

Specimens	Colistin resistant <i>Enterobacteriaceae</i> (n)		Total (n)	%
	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>		
Urine	10	7	17	42.5
Sputum	3	8	11	27.5
Pus/Swab	5	1	6	15.0
Blood	2	3	5	12.5
Body fluid	1	0	1	2.5
Total (n)	21	19	40	100

2. ผลการทดสอบความไวแบบปริมาณวิเคราะห์ ของเชื้อต่อยาโคลิสติน ด้วยวิธี broth microdilution

ผลทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียแกรม
ลบต่อยาโคลิสติน จำนวน 40 ตัวอย่าง พบค่า MIC

ต่อยาโคลิสติน ของ เชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* มีค่าตั้งแต่ 4 ถึง >64 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร
(Table 4)

Table 4 Minimal inhibitory concentrations (MICs) for colistin of *Enterobacteriaceae* resistant to colistin

Organism	Colistin MIC						Total (n)
	4 µg/mL	8 µg/mL	16 µg/mL	32 µg/mL	64 µg/mL	>64 µg/mL	
<i>Escherichia coli</i>	5	10	5	0	0	1	21
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	1	5	9	1	2	19
Total (n)	6	11	10	9	1	3	40

3. ผลการตรวจหายีนดื้อยา *mcr-1* ด้วยวิธี PCR

จากผลตรวจหายีนดื้อยาชนิด *mcr-1* ด้วยวิธี PCR ในเชื้อที่ให้ผลดื้อต่อยาโคลิสติน จำนวน 40 ตัวอย่าง พบเชื้อที่ให้ผลบวกต่อยีน *mcr-1* จำนวน 6 ตัวอย่าง โดยพบเป็นเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม

third generation cephalosporins ทั้งหมด ซึ่งเชื้อที่พบยีน *mcr-1* แยกได้จากผู้ป่วยแผนกศัลยกรรม 5 ตัวอย่าง และอายุรกรรม 1 ตัวอย่าง โดยมีค่า MIC ต่อยาโคลิสติน อยู่ในช่วง 4-16 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร (Table 5)

Table 5 Demographics of colistin resistant *Enterobacteriaceae* carrying *mcr-1* gene

Strains	Sample collection date	Department	Ward	Specimen	Organism	Drug resistance	Colistin MIC (µg/mL)
RBH037	Oct 14, 2015	Surgery	Male surgical ward-2	Sputum	<i>E. coli</i>	3 rd generation cephalosporin	8
RBH049	Oct 18, 2015	Surgery	Pediatric surgical ward	Pus/Swab	<i>E. coli</i>	3 rd generation cephalosporin	16
RBH056	Nov 15, 2015	Surgery	Orthopaedic surgical ward	Pus/Swab	<i>E. coli</i>	3 rd generation cephalosporin	8
RBH134	Feb 21, 2016	Surgery	Female surgical ward	Pus/Swab	<i>E. coli</i>	3 rd generation cephalosporin	16
RBH135	Feb 6, 2016	Internal medicine	Male medical ward-1	Blood	<i>E. coli</i>	3 rd generation cephalosporin	8
RBH162	Mar 27, 2016	Surgery	Male surgical ward-1	Sputum	<i>E. coli</i>	3 rd generation cephalosporin	4

วิจารณ์และสรุป

งานวิจัยครั้งนี้เลือกศึกษาเฉพาะในเชื้อแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* เนื่องจากเป็นเชื้อที่ก่อโรคได้หลายระบบ และเป็นเชื้อที่พบได้ในระบบทางเดินอาหารของคนทั่วไป จึงทำให้สามารถแพร่กระจายเกิดการระบาดได้ ดังนั้นหากเชื้อได้รับการถ่ายทอดยีนดื้อยาแล้ว จะทำให้การรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อทำได้ยาก เนื่องจากเชื้อมักจะดื้อต่อยาหลายกลุ่ม ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้

จากการศึกษาครั้งนี้พบการดื้อยาโคลิสตินในเชื้อ *K. pneumoniae* และ *E. coli* เท่านั้น โดยพบในเชื้อ *K. pneumoniae* ร้อยละ 22.1 และ *E. coli* ร้อยละ 14.4 ซึ่งมีอัตราใกล้เคียงกับการศึกษาของ Moosavian และ Emam⁽¹¹⁾ ที่ได้รายงานการดื้อยาโคลิสตินในเชื้อ *K. pneumoniae* ร้อยละ 21.8 (26/119) และ *E. coli* ร้อยละ 10.8 (38/351) ที่แยกได้จากตัวอย่างผู้ป่วยในประเทศอิหร่าน

เมื่อจำแนกตามแผนกของผู้ป่วย พบเชื้อที่ดื้อต่อยาโคลิสตินมากในผู้ป่วยแผนกศัลยกรรม อายุรกรรม และแผนกผู้ป่วยระยะวิกฤต ตามลำดับ เนื่องจากเป็นแผนกที่ผู้ป่วยได้รับยาต้านจุลชีพมาก และเป็นประจำ จึงทำให้เกิดโอกาสพบเชื้อสายพันธุ์ที่ดื้อยามากขึ้น แต่เมื่อแยกตามหอผู้ป่วยพบว่าพบต่างหอผู้ป่วยกันโดยที่แต่ละหอผู้ป่วยไม่ได้อยู่ในพื้นที่ใกล้เคียงกัน และช่วงเวลาที่พบเชื้อส่วนใหญ่อยู่ในเดือน ตุลาคม พ.ศ. 2559 และเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2560 แสดงว่าอาจมีการระบาดแบบกระจายอยู่ทั่วไปในโรงพยาบาล และเมื่อจำแนกตามชนิดของสิ่งส่งตรวจพบว่าเชื้อที่ดื้อต่อยาโคลิสติน ส่วนใหญ่จะเป็นตำแหน่งที่มีเชื้อประจำถิ่น จึงทำให้พบในตัวอย่างปัสสาวะและเสมหะมากกว่าตัวอย่างชนิดอื่นที่เป็นเลือดและสารถน้ำในร่างกายน และเมื่อทดสอบหาค่า MIC ต่อยาโคลิสตินพบว่าเชื้อ *K. pneumoniae* มีค่า MIC สูงกว่าเชื้อ *E. coli*

ผลการนำเชื้อที่ดื้อต่อยาโคลิสตินทั้งหมดจำนวน 40 ตัวอย่าง มาตรวจหา ยีน พบว่ามียีน *mcr-1* ซึ่งพบในเชื้อ *E. coli* เท่านั้น โดยไม่พบในเชื้อ *K. pneumoniae* และค่า MIC ต่อยาโคลิสตินมีค่า 4 ถึง 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Bianco และคณะ⁽¹²⁾ ที่ได้สำรวจหา ยีน *mcr-1* ถึง *mcr-5* ของเชื้อแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* ใน Romagna ทางตอนเหนือของอิตาลี ในช่วงเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2559 ถึงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2560 พบว่าการดื้อต่อยาโคลิสตินที่เกิดจาก *mcr-1* พบ 26 ตัวอย่าง จาก 19,053 ตัวอย่าง (ร้อยละ 0.14) เป็นเชื้อ *E. coli* ทั้งหมด ซึ่งค่า MIC ต่อยาโคลิสตินมีค่า 4 ถึง 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สอดคล้องกับการศึกษาของเอี่ยม ฟังพรและคณะ⁽¹³⁾ ที่ได้ศึกษาหา ยีน *mcr-1* ในตัวอย่างเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* ที่ดื้อต่อยาโคลิสตินในตัวอย่างจากประเทศไทย ช่วงปี พ.ศ. 2557 พบ

ว่าการดื้อต่อยาโคลิสตินที่เกิดจาก *mcr-1* พบในเชื้อ *E. coli* มากกว่า ซึ่งพบ 11 ตัวอย่าง (ร้อยละ 29.7) และค่า MIC ต่อยาโคลิสตินของเชื้อ *E. coli* ที่พบยีน *mcr-1* มีค่า 4-32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเชื้อ *E. coli* ทั้งหมดที่พบว่ามียีน *mcr-1* เป็นเชื้อที่มีการดื้อต่อยาในกลุ่ม third generation cephalosporins แต่มีความไวของยาในกลุ่มคาร์บาเพนิม ข้อมูลสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Kawahara และคณะ⁽¹⁴⁾ ที่พบยีน *mcr-1* จำนวน 31 ตัวอย่าง ในเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยา cefotaxime แต่มีความไวต่อยากลุ่มคาร์บาเพนิม ในตัวอย่างอุจจาระของประชากรในหมู่บ้านประเทศเวียดนาม ดังนั้นการที่พบยีน *mcr-1* ไม่จำเป็นต้องมีการดื้อต่อยากลุ่มคาร์บาเพนิม ซึ่งเป็นยากลุ่มที่มีฤทธิ์กว้างที่สุดในการรักษาเชื้อแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* หรือการได้รับยาโคลิสติน แต่อาจเกิดจากการได้รับเชื้อจากการรับประทานเนื้อสัตว์ที่เป็นห่วงโซ่อาหาร เนื่องจากปัจจุบันมีการนำยาโคลิสตินมาใช้ในการเลี้ยงสัตว์จำนวนมาก ดังนั้นอาจต้องมีการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างสัตว์ คน และสิ่งแวดล้อม เพื่อที่จะได้ควบคุมและป้องกันการระบาดของยีน *mcr-1*

สำหรับเชื้อที่มีการดื้อต่อยาโคลิสติน แต่ไม่พบยีน *mcr-1* อาจมีการดื้อยาที่เกิดจากยีนดื้อยาอื่นๆ ซึ่งไม่ได้เกิดจากยีน *mcr-1* เช่น *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* หรือ *mcr-5* เนื่องจาก Wise MG และคณะ⁽¹⁵⁾ ได้สำรวจความชุกของยีน *mcr-1-mcr-5* ที่เก็บจากเชื้อแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยาโคลิสตินทั่วทุกทวีปในช่วง พ.ศ. 2557 พบเชื้อดื้อต่อยาโคลิสติน 908 ตัวอย่าง โดยพบเชื้อดื้อต่อยาโคลิสตินที่เกิดจากยีน *mcr-1* และ *mcr-3* จำนวน 29 ตัวอย่าง เป็นยีน *mcr-1* จำนวน 25 ตัวอย่าง และ *mcr-3* จำนวน 4 ตัวอย่าง ยีน *mcr-3* ที่พบเป็นตัวอย่างจากประเทศไทยทั้งหมด โดยแยกได้จากเชื้อ *E. coli* 3 ตัวอย่าง และเชื้อ

K. pneumoniae 1 ตัวอย่าง หรือการดื้อยาโคลิสติน อาจไม่ได้เกิดจากยีน *mcr* แต่อาจเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนในโครโมโซม โดยเฉพาะเชื้อ *K. pneumoniae* ที่เกิดการกลายพันธุ์ของโปรตีน MgrB ทำให้ดื้อต่อยาโคลิสติน⁽¹⁶⁾ ดังนั้นควรศึกษากลไกการดื้อยาในเชื้อเหล่านี้ต่อไป

การศึกษารังนี้มมีข้อจำกัดในเรื่องตัวอย่าง เนื่องจาก เชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่พบส่วนใหญ่เป็นเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* ส่วนตัวอย่างที่เป็นเชื้อชนิดอื่น เช่น *Enterobacter* spp. และ *C. freundii* ยังมีจำนวนน้อย ทำให้การทดสอบไม่ครอบคลุมเชื้อที่มี colistin heteroresistance ซึ่งมีค่า MIC ต่ำ⁽¹⁷⁻¹⁸⁾

จะเห็นว่าข้อมูลที่ได้จากการศึกษาเชื้อแกรมลบวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยาโคลิสตินที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในโรงพยาบาลราชบุรี แสดงให้เห็นการเกิดอุบัติการณ์การดื้อต่อยาโคลิสติน ซึ่งจะเป็นประโยชน์แก่แพทย์และบุคลากรทางการแพทย์ที่เกี่ยวข้องให้ตระหนักในการเลือกใช้ยารักษา ทั้งนี้ ผลทดสอบอนุชีววิทยาทำให้ทราบถึงกลไกการดื้อยาโคลิสตินที่เกิดจากยีนดื้อยาคชนิด *mcr-1* ซึ่งจะเป็นความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับกลไกการดื้อยา และสถานการณ์การดื้อยาของโรงพยาบาลเพื่อการควบคุมการแพร่กระจายเชื้อต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการทำกิจกรรมสนับสนุนการวิจัยประเภททุนบัณฑิตศึกษาจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2561

เอกสารอ้างอิง

1. Research and Development Committee for the Control and Prevention of Antimicrobial Resistance in Thailand. Control and Antimicrobial resistance. [Internet]. 2014. Available from: <https://sites.google.com/site/amr-thailand-net>. (in Thai).
2. Health Systems Research Institute. There are research documents indicating that the antibiotic resistance problem is a national crisis, if we do not solve this problem, it will ruin national economy and our life. [Internet]. 2015. Available from: <http://www.hsri.or.th/news/939>. (in Thai).
3. Koomanachai P, Colistin. In: Asavabhokhi N, Tantawichien T, Phiboon T, editors. Important Antimicrobial Agents1. Bangkok: VG printing; 2015. p. 601-8. (in Thai).
4. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. Front Microbiol 2014; 5: 643.
5. Pragasa AK, Shankar C, Veeraraghavan B, et al. Molecular mechanisms of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* causing bacteremia from India - A first report. Front Microbiol 2016; 7: 2135.
6. Liu Y, Wang Y, Walsh T, et al. Emergence of plasmid mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis 2015; 16: 161-8.

7. Xavier BB, Lammens C, Ruhel R, *et al.* Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. Euro Surveill 2016; 21. <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.27.30280>.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. M07-A9 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition. Wayne, PA: CLSI; 2012.
9. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. Pennsylvania: CLSI; 2018.
10. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.0, 2018.
11. Moosavian M, Emam N. The first report of emerging mobilized colistin-resistance (*mcr*) genes and ERIC-PCR typing in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in southwest Iran. Infect Drug Resist 2019; 12: 1001-10.
12. Del Bianco F, Morotti M, Pedna MF, Farabegoli P, Sambri V. Microbiological surveillance of plasmid mediated colistin resistance in human Enterobacteriaceae isolates in Romagna (Northern Italy): August 2016-July 2017. Int J Infect Dis 2018; 69: 96-8.
13. Eiamphungporn W, Yainoya S, Jundarma C, Tan-arsuwongkula R, Tiengrima S, Thamlikitkul V. Prevalence of the colistin resistance gene *mcr-1* in colistin-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from humans in Thailand. J Glob Antimicrob Resist 2018; 15: 32-5.
14. Kawahara R, Khong DT, Le HV, *et al.* Prevalence of *mcr-1* among cefotaxime-resistant commensal *Escherichia coli* in residents of Vietnam. Infect. Drug Resist 2019; 12: 3317-25.
15. Wise MG, Estabrook MA, Sahm DF, Stone GG, Kazmierczak KM, Prevalence of *mcr*-type genes among colistin-resistant *Enterobacteriaceae* collected in 2014-2016 as part of the INFORM global surveillance program. PLoS One 2018; 13: e0195281.
16. Chen L, Zhang J, Wang J, *et al.* Newly identified colistin resistance genes, *mcr-4* and *mcr-5*, from upper and lower alimentary tract of pigs and poultry in China. PLoS One 2018; 13: e0193957.
17. Landman D, Salamera J, Quale J. Irreproducible and uninterpretable polymyxin B MICs for *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. J Clin Microbiol 2013; 51: 4106-11.
18. Jayol A, Nordmann P, Brink A, Poirel L. Heteroresistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae* associated with alterations in the PhoPQ regulatory system. Antimicrob Agents Chemother. 2015; 59: 2780-4.

Detection of Yeasts from Cockroaches' Intestine by Polymerase Chain Reaction (PCR) Techniques and DNA Sequencing in Internal Transcribed Spacer 1 and 2 (ITS1-2)

Patcharee Kammarnjassadakul^{1*}, Natamon Nooin², Pattaranit Amphonritthisak³,
Pennapa Chamavit¹ and Watcharin Rangspanuratr¹

¹Faculty of Medical Technology, Hauchiew Chalermprakiet University, Samut Prakan Province, Thailand

²Bangkok IVF Center, Bangkok, Thailand

³Division of Pathology, Fort Somdej Phranaresuan Maharaj Hospital, Phitsanulok Province, Thailand

Abstract

Cockroaches are omnivore that are capable of transmitting many human pathogens. The major habitat is dwellings, so there is a high possibility that pathogens are acquired by cockroaches. This research aimed to explore the yeasts in gut of cockroaches collected from Bangphli housing, Bang Sao Thong District, Samut Prakan province. Polymerase chain reaction (PCR) method was used to amplify the internal transcribed spacer 1 and 2 region (ITS1-2) followed by DNA sequencing to compare the findings with NCBI database. The results revealed that 75% of the yeasts were opportunistic pathogens in human classified as *Candida tropicalis* (40%), *C. glabrata* (20%), *C. nivariensis* (5%), *C. palmiophila* (5%), *Pichia kudriavzevii* (5%) and the other 25% were non-pathogenic yeasts. These pathogenic yeasts can cause serious infections in immunocompromised patients and have been recognized to have high incidence of drug resistance especially to the azole group. The data from this study emphasized the significance of cockroaches as potential vectors of medically important yeasts in community environments.

Keywords: Cockroach, Polymerase chain reaction (PCR), Internal transcribed spacer, Yeasts

*Corresponding author E-mail address: kpatcharee@gmail.com

การตรวจหาเชื้อยีสต์จากลำไส้ของแมลงสาบโดยเทคนิค ปฏิกิริยาถูกลูโซพอลิเมอร์เรสและการหาลำดับเบสบริเวณ Internal Transcribed Spacer 1 และ 2 (ITS1-2)

พัชรี กัมมารเจษฎากุล^{1*} ณฐมน หนูอินทร์² ภัทรนิษฐ์ อัมพรฤทธิศักดิ์³
เพ็ญญา ชมะวิต¹ และ วชิรินทร์ รังษิภาณูรัตน์¹

¹คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสมุทรปราการ

²บริษัทบางกอก อินฟอร์ทีลิตี้ เซ็นเตอร์ จำกัด (สาขา 2) กรุงเทพมหานคร

³แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายสมเด็จพระนเรศวรมหาราช จังหวัดพิษณุโลก

บทคัดย่อ

แมลงสาบเป็นพาหะนำเชื้อโรคหลากหลายชนิด มีนิสัยกินอาหารได้ทุกประเภท พบมากในบริเวณที่สกปรกของมนุษย์ ดังนั้นจึงมีโอกาสที่จะนำเชื้อยีสต์ก่อโรคมานุษย์ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิดของเชื้อยีสต์ที่อยู่ในลำไส้ของแมลงสาบจากบริเวณห้องชุดที่สกปรกในชุมชนเคหะบางพลี อำเภอบางเสาธง จังหวัดสมุทรปราการ โดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาถูกลูโซพอลิเมอร์เรส (PCR) บริเวณ internal transcribed spacer 1 และ 2 (ITS1-2) และหาลำดับเบสโดยการทำให้ sequencing เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI ผลการวิจัยพบเชื้อยีสต์ที่สามารถก่อโรคในมนุษย์ร้อยละ 75 ได้แก่ *Candida tropicalis*, *C. glabrata*, *C. nivariensis*, *C. palmiophila*, *Pichia kudriavzevii* (ร้อยละ 40, 20, 5, 5 และ 5 ตามลำดับ) และเชื้อยีสต์ที่ไม่พบรายงานการก่อโรคในมนุษย์ร้อยละ 25 สำหรับเชื้อยีสต์ที่ก่อโรคในมนุษย์พบรายงานการก่อโรคในกลุ่มเสี่ยง อีกทั้งยังพบอุบัติการณ์การดื้อยาต้านเชื้อราในกลุ่ม azole มากขึ้นในปัจจุบัน ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าแมลงสาบเป็นพาหะที่สำคัญของยีสต์ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ในสิ่งแวดล้อมของชุมชน

คำสำคัญ: แมลงสาบ เทคนิคปฏิกิริยาถูกลูโซพอลิเมอร์เรส Internal transcribed spacer ยีสต์

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: kpatcharee@gmail.com

รับบทความ: 9 ตุลาคม 2562

แก้ไขบทความ: 12 กุมภาพันธ์ 2563

รับตีพิมพ์บทความ: 24 กุมภาพันธ์ 2563

บทนำ

แมลงสาบ (cockroaches) เป็นแมลงที่อยู่ใน order Blattodea มีการเจริญเติบโตแบบไม่สมบูรณ์ (incomplete metamorphosis) เป็นสัตว์ที่ออกหากินในเวลากลางคืน ตัวเต็มวัยมีขนาดประมาณ 1-5 เซนติเมตร แมลงสาบกินอาหารและสิ่งปฏิกูลได้หลายประเภท เช่น พืช สัตว์ น้ำลาย เสมหะ และอุจจาระ สายพันธุ์ของแมลงสาบที่พบได้ตามที่พักอาศัยและแหล่งชุมชนต่างๆ มากที่สุด 5 อันดับคือ American cockroach (*Periplaneta americana*), German cockroach (*Blattella germanica*), Brown-banded cockroach (*Supella longipalpa*), Australian cockroach (*Periplaneta australasiae*) และ Large brown cockroach (*Periplaneta brunnea*) ตามลำดับ⁽¹⁾ ถิ่นอาศัยของแมลงเหล่านี้มักพบใกล้ชิดกับมนุษย์ เช่น อาคารพาณิชย์ บ้านที่พักอาศัย และท่อน้ำทิ้ง/น้ำเสีย แมลงสาบเป็นแหล่งสะสมเชื้อโรค การที่อยู่ใกล้ชิดกับมนุษย์ประกอบกับนิสัยการกินของแมลงสาบซึ่งขณะกินมักจะขับถ่ายออกมาด้วยทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อโรคตามสิ่งแวดล้อมทั่วไป เมื่อมนุษย์กินอาหารที่แมลงสาบสัมผัสอาจได้รับเชื้อก่อโรคได้ เช่น *Salmonella* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ และนอกจากเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแล้ว แมลงสาบยังเป็นพาหะของ ปรสิตร ไวรัส และราอีกด้วย^(2, 3)

ในปี พ.ศ. 2550 Salehzadeh A และคณะ⁽⁴⁾ รายงานการพบแบคทีเรีย ปรสิตร และราที่บริเวณผิวหนังนอกและภายใน รวมถึงภายในลำไส้ของแมลงสาบที่เก็บตัวอย่างจากโรงพยาบาล และที่พักอาศัยในเมืองฮามาเดน ประเทศอิหร่าน โดยแบคทีเรียที่พบมากที่สุดคือ *Enterobacter* spp. ปรสิตรที่พบมากที่สุดคือ ตัวเต็มวัยของ *Enterobius vermicularis* และไข่ของ *Ascaris* spp. เชื้อราที่พบมากที่สุดคือ

Candida spp. ซึ่งเชื้อที่พบส่วนใหญ่เป็นเชื้อที่มีความสำคัญทางการแพทย์ อีกทั้งยังเพิ่มโอกาสเสี่ยงในการติดเชื้อในโรงพยาบาลของผู้ป่วยอีกด้วย ต่อมาในปี พ.ศ. 2551 Saichau P. และคณะ⁽⁵⁾ พบว่าผิวหนังของแมลงสาบที่อาศัยอยู่บริเวณหอผู้ป่วยใน ของโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ พบเชื้อยีสต์ *Candida* spp. ที่สามารถก่อโรคในมนุษย์ และอาจนำเชื้อยีสต์มาสู่ผู้ป่วยได้ ต่อมาในปี พ.ศ. 2557 ในประเทศอิรัก Hussein AN ได้ศึกษาเชื้อ *Candida* spp. จากผิวหนังของแมลงสาบและแมลงวันจากหลากหลายบริเวณ เช่น ห้องน้ำ ห้องรับแขก ห้องครัว และห้องนอน จากการสุ่มเก็บบริเวณบ้านพักอาศัยใน Al-Diwaniya city โดยแยกเชื้อโดยวิธีทางฟิโนไทป์และจีโนไทป์ สรุปพบเป็น *Candida albicans* (ร้อยละ 44.6), *C. glabrata* (ร้อยละ 23), *C. krusei* (ร้อยละ 19.6), *C. tropicalis* (ร้อยละ 7.4), *C. dubliniensis* (ร้อยละ 3.6) และ *C. parapsilosis* (ร้อยละ 1.8) ผลทดสอบความไวต่อยาต้านเชื้อรา พบว่าเชื้อเหล่านี้มีความไวต่อยา nystatin (ร้อยละ 98) fluconazole (ร้อยละ 89.3) และคีโตโคนาโซล ketoconazole (ร้อยละ 16) นอกจากนี้ยังสรุปได้ว่าพบเชื้อจากแมลงสาบมากกว่าจากแมลงวันอีกด้วย⁽⁶⁾

ข้อมูลข้างต้น ทำให้เห็นว่าแมลงสาบเป็นแมลงที่สำคัญและเกี่ยวข้องกับมนุษย์ โดยเฉพาะด้านสุขภาพ เพราะมีโอกาสเป็นพาหะในการนำเชื้อก่อโรคมารสู่มนุษย์ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาชนิดของยีสต์ที่อยู่ในลำไส้ของแมลงสาบจากบริเวณห้องชุดที่พักอาศัย ในชุมชนเคหะบางพลี ตำบลบางเสาธง อำเภอบางเสาธง จังหวัดสมุทรปราการ โดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR และการหาลำดับเบสบริเวณ internal transcribed spacer 1 และ 2 (ITS1-2) region⁽⁷⁾

วัสดุและวิธีการ

1. ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา

ใช้ตัวอย่างแมลงสาบจำนวน 55 ตัว จากบริเวณห้องชุดที่พักอาศัย ในชุมชนเคหะบางพลี ตำบลบางเสาธง อำเภอบางเสาธง จังหวัดสมุทรปราการ เก็บตัวอย่างโดยสวมถุงมือแล้วใส่ในถุงพลาสติกเจาะรูเพื่อให้มีการถ่ายเทอากาศ นำมาเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และใช้ดีเอ็นเอเชื้อ *Cryptococcus neoformans* (*C. neoformans*) เป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control) สำหรับการทำ PCR บริเวณ ITS1-2 region

2. การเตรียมและเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์จากลำไส้ของแมลงสาบ

นำแมลงสาบแช่แข็งมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5-15 นาที จำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะภายนอกของแมลงสาบ หลังจากนั้นแช่ใน 70% alcohol เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น ใช้มีดผ่าตัดกรีดบริเวณด้านข้างของท้องแมลงสาบ แล้วใช้ forceps คีบส่วนลำไส้ของแมลงสาบใส่ใน glass plate ที่มี 0.85% normal saline บดให้ละเอียด ใช้ไซริงจ์ดูดน้ำที่ได้จากการบดลำไส้แมลงสาบทั้งหมดใส่ในหลอด Eppendorf แล้วนำไปเขี่ย (streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose agar ที่มี 0.5% chloramphenicol (SC) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน พิจารณาลักษณะโคโลนีและส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยวิธี wet mount (ย้อมด้วยสี lactophenol cotton blue, LPCB) โดยโคโลนีเชื้อยีสต์จะมีลักษณะรูปร่างกลมหรือรูปไข่ ขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรีย และเมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบลักษณะของเซลล์ยีสต์ที่มีการแตกหน่อ (budding yeast cell) เลือกเชื้อที่มีลักษณะดังกล่าวไปเพาะเลี้ยงบน Sabouraud dextrose agar (SDA) ให้เป็นเชื้อที่ปราศจากการปนเปื้อน เพื่อการทดสอบในขั้นตอนต่อไป

3. ผลการตรวจแยกชนิดเชื้อยีสต์จากลำไส้แมลงสาบด้วยวิธีทางจีโนมไทป์

3.1 การสกัดสารพันธุกรรมจากเชื้อยีสต์

นำเชื้อยีสต์อายุ 2 วันใน Sabouraud dextrose broth (SDB) ล้างด้วยน้ำกลั่น ปั่นตกเก็บที่ -20 องศาเซลเซียสข้ามคืน นำออกมาใส่ lysis buffer แล้วสกัดด้วยวิธีมาตรฐาน phenol-chloroform-isoamyl นำสารพันธุกรรมที่ได้ไปวัดค่าความบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, USA) แล้วปรับให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

3.2 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธี PCR และการหาลำดับเบสบริเวณ ITS1-2 region

เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสารละลาย 50 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย 1× Hot start PCR master mix (Biotech rabbit, Germany), 1 ไมโครโมลาร์ ITS1 forward primer (5'- TCCG-TAGGTGAACCTGCGG- 3'), 1 ไมโครโมลาร์ ITS4 reverse primer (5'- TCCTCCGCTTATT-GATATGC- 3') และ template DNA 0.1 ไมโครกรัม ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในเครื่อง ThermoHybrid PCR thermocycler (Ashford, Middlesex, UK) นำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบโดยวิธี gel electrophoresis หลังจากนั้นทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ GeneJET PCR purification kit (Thermo scientific Inc, USA) และส่งไปที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ เพื่อตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) ด้วยเครื่อง ABI PRISM 377 DNA Sequencer แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราที่อยู่ใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTN การวิเคราะห์ข้อมูลใช้สถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ จำนวน ร้อยละ เป็นต้น

ผลการวิจัย

1. การจำแนกสายพันธุ์แมลงสาบ

ผลการจำแนกสายพันธุ์แมลงสาบจำนวน 55 ตัว พบเป็นแมลงสาบสายพันธุ์ *Periplaneta americana* ทั้งหมด (ร้อยละ 100) มีขนาดลำตัวยาว

ประมาณ 2.8 - 4.4 เซนติเมตร ลักษณะลำตัวและปีกมีสีน้ำตาลแดง บริเวณแผ่นแข็งที่ปกคลุมส่วนอก (pronotum) มีจุดสีดำที่บริเวณขอบล้อมรอบด้วยแถบสีเหลือง (Fig. 1)



Fig. 1 Characteristics of American cockroach found in Bangphli housing area

2. การเพาะเชื้อยีสต์จากลำไส้แมลงสาบและการตรวจดูลักษณะเชื้อยีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

จากตัวอย่างแมลงสาบ 55 ตัวพบแมลงสาบที่มีเชื้อยีสต์ในลำไส้ 36 ตัว (ร้อยละ 65.5) โคโลนีของยีสต์มีลักษณะคล้ายของแบคทีเรียคือ กลม ขอบเรียบ นูน สีขาวจนถึงครีม มีขนาดแตกต่างกัน มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-3 มิลลิเมตร เมื่อย้อมด้วยสี LPCB แล้วส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบมีลักษณะรี ขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรีย เชื้อบางตัวพบเป็นเชลล์ยีสต์ที่มีการแตกหน่อ แมลงสาบบางตัวพบเชื้อยีสต์ในลำไส้มากกว่า 1 ชนิด คือพบเชื้อ 2 ชนิดที่มีลักษณะ

โคโลนีต่างกัน โดยมีจำนวนทั้งหมด 6 ตัว ที่พบเชื้อยีสต์ 2 ชนิด (ร้อยละ 16.67)

ผลการสกัดและเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมบริเวณ ITS1-2 จากตัวอย่างเชื้อยีสต์ 42 ไอโซเลตพบว่าได้ PCR product ขนาด 700-1,000 bp (Fig. 2) เมื่อนำลำดับเบสของเชื้อไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม BLASTN สรุปได้ว่าเชื้อยีสต์ที่พบในลำไส้แมลงสาบคือ *C. tropicalis* (ร้อยละ 40), *C. glabrata* (ร้อยละ 20), *S. sinensis* (ร้อยละ 10), *P. kudriavzevii*, *C. carpophila*, *C. palmioleophila*, *C. nivariensis*,

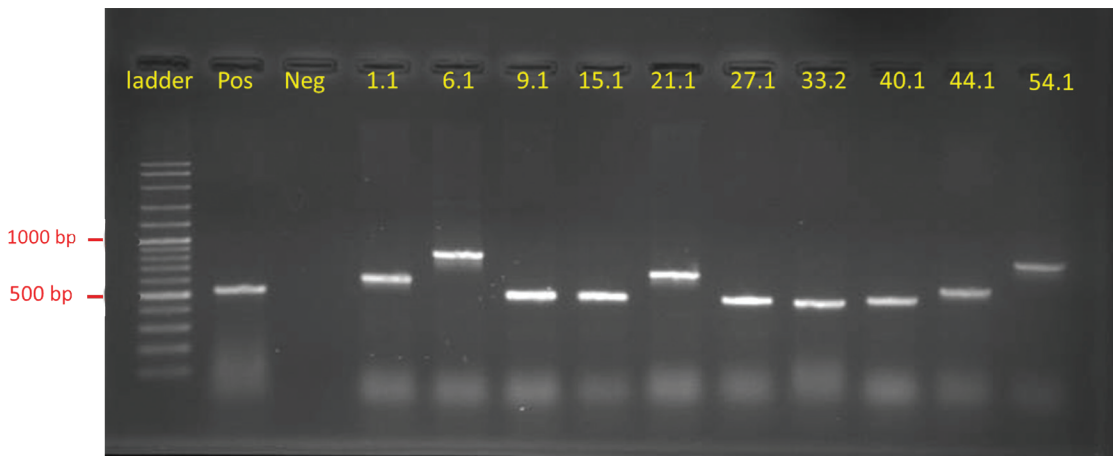


Fig. 2 Gel electrophoresis of ITS 1-2 region amplification between 600 - 1,000 bp. (Lane 1 = 100 bp ladder, lane 2 = positive control, lane 3 = negative control, lane 4 - 13 = PCR product of each sample)

Candida spp., และ uncultured fungi อย่างละ ร้อยละ 5 ตามลำดับ (Table 1 and Fig. 3) โดยแยก *C. tropicalis* ได้จากลำไส้แมลงสาบ 18 ตัว (ร้อยละ 50)

วิจารณ์

ผลการจำแนกตัวอย่างแมลงสาบจำนวน 55 ตัว พบว่าทุกตัวเป็นสายพันธุ์ *P. americana* (ร้อยละ 100) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่พบมากที่สุดในประเทศไทยและสอดคล้องกับงานวิจัยของ Nammane S และคณะ⁽⁸⁾ ที่ดักจับแมลงสาบบริเวณโรงพยาบาลในเขตอำเภอดอนเจดีย์โดยใช้กับดักกาวเหนียวและกับดักแก้วประยุกต์ พบว่าแมลงสาบที่จับได้ 100 ตัวเป็นสายพันธุ์ *P. americana* ทั้งหมด และจากงานวิจัยของ Tawatsin A และคณะ ซึ่งดักจับแมลงสาบบริเวณที่พักอาศัย 14 จังหวัดในประเทศไทย พบแมลงสาบสายพันธุ์ *P. americana* มากที่สุด คือร้อยละ 60.9⁽⁹⁾

ผลการตรวจหาเชื้อยีสต์ในลำไส้แมลงสาบ พบทั้งเชื้อยีสต์ที่สามารถก่อโรคและไม่ก่อโรคในมนุษย์

โดยพบเชื้อยีสต์ก่อโรค (ร้อยละ 75) มากกว่าเชื้อยีสต์ไม่ก่อโรค (ร้อยละ 25) โดยเชื้อยีสต์ที่ก่อโรคคือ *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. nivariensis*, *C. palmiophila* และ *P. kudriavzevii* และเชื้อยีสต์ที่ไม่ก่อโรคคือ *S. sinensis* และ *C. carpophila* นอกจากนั้นยังมีเชื้อที่ยังไม่ทราบว่าเป็นก่อโรคหรือไม่เพราะยังไม่พบการรายงานคือ uncultured fungi และ *Candida* spp. เชื้อยีสต์ก่อโรคที่พบมากที่สุดในการลำไส้แมลงสาบ คือ *C. tropicalis* ซึ่งจัดเป็นเชื้อก่อโรคที่มีอุบัติการณ์การก่อโรคมากที่สุดในกลุ่ม *Candida non-albicans* ก่อโรค candidiasis⁽¹⁰⁾ ในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องและผู้ที่มีการเปลี่ยนถ่ายอวัยวะ อีกทั้งยังมีรายงานพบอัตราการติดเชื้อในผู้ป่วยกลุ่ม azole โดยเฉพาะยา fluconazole เพิ่มขึ้น⁽¹¹⁻¹⁴⁾ เชื้อยีสต์ก่อโรคที่พบมากเป็นอันดับ 2 คือ *C. glabrata* จัดเป็นเชื้อที่มีอุบัติการณ์การพบในผู้ป่วย candidiasis เป็นอันดับ 2 ในกลุ่ม *Candida non-albicans* รองจาก *C. tropicalis* เชื้อ *C. glabrata* ก่อให้เกิดการติดเชื้อบริเวณช่องคลอดและปากช่องคลอด (vaginal and vulvovaginal

Table 1 List of the nucleotide similarities of ITS 1-2 region sequences from cockroaches' yeast isolates

Size (bp)	Yeast	Max Score	E-value
700	<i>Candida</i> spp. NYNU 14772	774	0.0
	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain AO36	811	0.0
	<i>Candida tropicalis</i> strain 4S	1,411	0.0
750	<i>Candida tropicalis</i> strain Hb39	715	0.0
	<i>Candida tropicalis</i> isolate SY4-1	841	0.0
	<i>Candida tropicalis</i> strain H195A	802	0.0
780	<i>Candida tropicalis</i> isolate ZJ15	675	0.0
	Uncultured fungus clone 038A42229	57.2	5e-04
800	<i>Candida tropicalis</i> strain DBMY38	99	2e-16
	<i>Candida tropicalis</i> strain ATCC 13803	813	0.0
	<i>Candida carpophila</i> 18S ribosomal RNA gene	896	0.0
850	<i>Candida palmioleophila</i> isolate H3-4	994	0.0
880	<i>Saccharomyces sinensis</i> strain AS 2.1395	1,149	0.0
900	<i>Candida nivariensis</i> strain WM 09.151	708	0.0
	<i>Saccharomyces sinensis</i> strain AS 2.1395	1,134	0.0
950	<i>Candida tropicalis</i> isolate SY3-2	763	0.0
	<i>Candida glabrata</i> isolate Kw664/09	523	9e-145
	<i>Candida glabrata</i> strain DM 02	1,452	0.0
	<i>Candida glabrata</i> strain ITSH18	1,286	0.0
1,000	<i>Candida glabrata</i> strain DM 80	1,982	0.0

candidiasis) และปัจจุบันพบว่ามีโรคที่ผิวหนังชั้น superficial และโรคแบบ systemic candidiasis เพิ่มขึ้น อีกทั้งมีรายงานอัตราการดื้อยาในกลุ่ม azole เพิ่มมากขึ้นทุกปี^(15, 16) สำหรับเชื้อ *C. nivariensis* เป็นเชื้อก่อโรคที่มีอุบัติการณ์การพบมากขึ้น เนื่องจากเป็นเชื้อฉวยโอกาสที่ก่อโรคในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง^(17, 18) และมีรายงานการก่อโรคใน

ผู้ป่วยเบาหวาน (diabetic patient with candidemia) อีกทั้งยังพบว่าเชื้อ *C. nivariensis* บางสายพันธุ์มีรายงานการดื้อต่อยากลุ่ม azole มากขึ้น^(19, 20) ส่วนเชื้อ *C. palmioleophila* เป็นเชื้อฉวยโอกาสที่ก่อโรคในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง^(21, 22) และมีรายงานการพบเชื้อนี้ในพืชเศรษฐกิจ เช่น เนื้อเยื่อใบข้าว รวมทั้งในแหล่งน้ำบริเวณป่าชายเลน⁽²³⁻²⁵⁾ คาดว่าการพบ

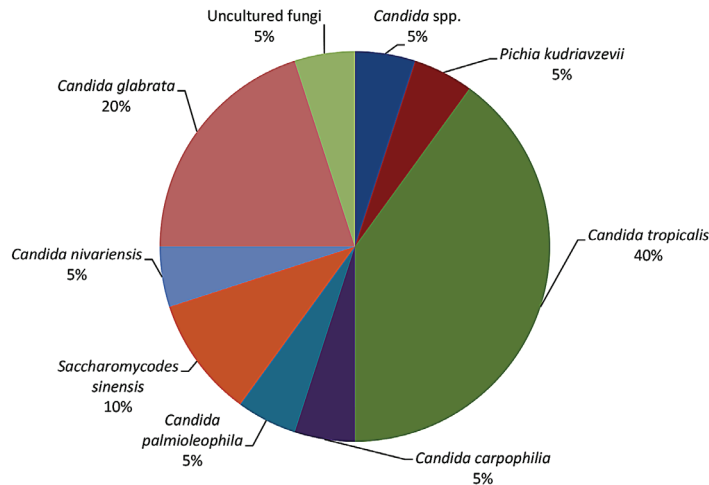


Fig. 3 Nucleotides analysis of cockroaches' yeast isolates with global distribution of BLASTN

เชื้อนี้ในลำไส้แมลงสาบเป็นการปนเปื้อนจากการกินอาหารของแมลง และจากงานวิจัยของ Rasmus H. และคณะ⁽²⁶⁾ พบการดื้อต่อยา fluconazole และไวต่อยา itraconazole เล็กน้อย จึงอาจมีการดื้อต่อยา itraconazole ได้ในอนาคต และเชื้อก่อโรคในมนุษย์ที่พบในลำไส้แมลงสาบอีกชนิดหนึ่งคือ *P. kudriavzevii* (ร้อยละ 5) เป็น teleomorph (sexual stage) ของเชื้อ *C. krusei* ซึ่งเชื้อ *P. kudriavzevii* พบได้ในอาหารหมักดอง เครื่องดื่มที่หมักจากธัญพืช และเป็นสาเหตุทำให้เกิดอาหารเน่าเสียได้ อีกทั้งยังเป็นเชื้อก่อโรคในผู้ที่มีความเสี่ยง เช่น ผู้ที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน เด็กทารก และผู้ป่วย HIV^(27,28) และยังพบว่าเชื้อนี้ดื้อต่อยา fluconazole ด้วย⁽²⁹⁾

ดังที่กล่าวมาข้างต้นเชื้อทุกชนิดมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อในผู้ป่วยกลุ่มเสี่ยงและมีการดื้อต่อยาต้านเชื้อราในบางกลุ่ม ดังนั้นการได้รับเชื้อก่อโรคเหล่านี้ถือว่ามีความสำคัญทางคลินิกอย่างมาก การที่มีแมลงสาบอยู่ในชุมชน ถือว่าเป็นพาหะที่สำคัญในการเพิ่มปัจจัยเสี่ยงสำหรับคนในชุมชนที่เป็นกลุ่มเสี่ยง

เช่น ผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง ผู้ที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน ผู้ป่วย HIV ผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว และผู้ที่เปลี่ยนถ่ายอวัยวะ เนื่องจากเชื้อยีสต์ก่อโรคส่วนใหญ่เป็นเชื้อในกลุ่ม *Candida* spp. ซึ่งก่อให้เกิดโรค candidiasis ได้และมีรายงานการดื้อต่อยากลุ่ม azole เช่น fluconazole, itraconazole, posaconazole และ ravuconazole ดังนั้นแพทย์จะต้องใช้ยากกลุ่ม echinocandins ในการรักษาแทน เช่น caspofungin, anidulafungin, micafungin หรืออาจให้ร่วมกับยา amphotericin B ในการรักษาผู้ที่ติดเชื้อรุนแรง ซึ่งยาที่กล่าวมาข้างต้นมีผลข้างเคียงสูงมาก เช่น ทำให้เกิดภาวะตับอ่อนอักเสบเฉียบพลัน ชัก หลอดลมอักเสบ หายใจลำบาก ภาวะตับโต ปัสสาวะเป็นเลือด และมีผลต่อการทำงานของไตเป็นอย่างมาก ทำให้คณะผู้วิจัยตระหนักถึงการควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อเพื่อลดการใช้ยา โดยให้ความรู้แก่ประชาชนในชุมชนต่างๆ เกี่ยวกับการรักษาสุขอนามัย การกำจัดขยะอย่างถูกวิธี เพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อโดยมีแมลงสาบเป็นพาหะและการกำจัดแหล่งพาหะของเชื้อให้มีจำนวนลดลง

สรุป

แมลงสาบในชุมชนเคหะบางพลี จังหวัดสมุทรปราการ เป็นสายพันธุ์อเมริกัน (*P. americana*) พบเชื้อยีสต์ที่ก่อโรคร้อยละ 75 ซึ่งมากกว่าเชื้อยีสต์ที่ไม่ก่อโรค โดยเชื้อยีสต์ที่ก่อโรคคือ *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. nivariensis*, *C. palmiroleophila* และ *P. kudriavzevii* เชื้อยีสต์ที่ไม่ก่อโรคคือ *S. sinensis* และ *C. carpophila* ส่วนเชื้อที่ยังไม่ทราบว่าก่อโรคเพราะยังไม่พบการรายงานคือ uncultured fungi, *Candida* spp. ซึ่งเชื้อยีสต์ก่อโรคที่พบมากที่สุดคือ *C. tropicalis* (ร้อยละ 40) ดังนั้นแมลงสาบสามารถเป็นพาหะนำเชื้อยีสต์ที่ก่อโรคไปสู่สัมผัสกับมนุษย์และเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรคได้

เอกสารอ้างอิง

1. Pola J, Zapata C, Valdivieso R, *et al.* Cockroach asthma: case report and literature review. Allergo Immunopath 1988; 16: 61-5.
2. Arruda LK, Ferriani VP, Vailes LD, *et al.* Cockroach allergens: environmental distribution and relationship to disease. Curr Allergy Asthma Rep 2001; 1: 466-73.
3. Page K. Role of cockroach proteases in allergic disease. Curr Allergy Asthma Rep 2012; 12: 448-55.
4. Salehzadeh A, Tavacol P, Mahjub H. Bacterial, fungal and parasitic contamination of cockroaches in public hospitals of Hamadan, Iran. J Vector Borne Dis 2007; 44: 105-10.
5. Saichua P, Pinmai K, Somrithipol S, Tor-Udom S. Isolation of medically important fungi from cockroaches trapped at Thammasat Chalermprakiat Hospital. Thammasat Med J 2008; 8: 345-51.
6. Hussein AN. Phenotypic and genotypic characteristics of *Candida* species isolated from some domestic insects in Diwaniya city / Al — Qadisiya governorate. Wassit Journal for Science & Medicine 2014; 7: 1-14.
7. Kammarnjesadakul P, Palaga T, Sritunyalucksana K, *et al.* Phylogenetic analysis of *Pythium insidiosum* Thai strains using cytochrome oxidase II (COX II) DNA coding sequences and internal transcribed spacer regions (ITS). Med Mycol 2011; 49: 289-95.
8. Nammane S, Lauprasert P, Tokamoltham J. Cockroaches control in hospital and its as the vectors of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Citrobacter freundii*. Dis Control J 2015; 41: 264-70.
9. Tawatsin A, Thavara U, Chompoosri J, *et al.* Cockroach surveys in 14 provinces of Thailand. J Vector Ecol 2001; 26: 232-8.
10. Myoken Y, Kyo T, Fujihara M, *et al.* Clinical significance of breakthrough fungemia caused by azole-resistant *Candida tropicalis* in patients with hematologic malignancies. Haemato-log-ica 2004; 89: 378-80.

11. Law D, Moore CB, Joseph LA, *et al.* High incidence of antifungal drug resistance in *Candida tropicalis*. Int J Antimicrob 1996; 7: 241-5.
12. Chen ZJ, Cao YS, Zai SB, *et al.* Investigation of drug resistance and multilocus sequence typing for differentiation of strains of *Candida tropicalis* of Shanghai. Zhonghua yu fang yi xue za zhi [Chinese journal of preventive medicine] 2018; 52: 932-5.
13. Xisto MI, Caramalho RD, Rocha DA, *et al.* Pan-azole-resistant *Candida tropicalis* carrying homozygous erg11 mutations at position K143R: a new emerging superbug?. J Antimicrob Chemother 2017; 72: 988-92.
14. Brilhante RSN, de Oliveira JS, de Jesus Evangelista AJ, *et al.* In vitro effects of promethazine on cell morphology and structure and mitochondrial activity of azole-resistant *Candida tropicalis*. Med Mycol 2018; 56: 1012-22.
15. Vanden Bossche H, Marichal P, Odds FC, *et al.* Characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. Antimicrob Agents Chemother 1992; 36: 2602-10.
16. Wilson A, Delport J, Ponich T. *Candida glabrata* Esophagitis: Are we seeing the emergence of a new azole-resistant pathogen?. Int J Microb 2014: 371631.
17. Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Isla G, *et al.* Prevalence of *Candida bracarensis* and *Candida nivariensis* in a Spanish collection of yeasts: comparison of results from a reference centre and from a population-based surveillance study of candidemia. Med Mycol 2011; 49: 525-9.
18. Chowdhary A, Randhawa HS, Khan ZU, *et al.* First isolations in India of *Candida nivariensis*, a globally emerging opportunistic pathogen. Med Mycol 2010; 48: 416-20.
19. Borman AM, Petch R, Linton CJ, *et al.* *Candida nivariensis*, an emerging pathogenic fungus with multidrug resistance to antifungal agents. JCM 2008; 46: 933-8.
20. Arastehfar A, Daneshnia F, Salehi MR, *et al.* Molecular characterization and antifungal susceptibility testing of *Candida nivariensis* from blood samples - an Iranian multicentre study and a review of the literature. J Med Microbiol 2019; 68: 770-7.
21. Arendrup MC, Bruun B, Christensen JJ, *et al.* National surveillance of fungemia in Denmark (2004 to 2009). JCM 2011; 49: 325-34.
22. Sugita T, Kagaya K, Takashima M, *et al.* A clinical isolate of *Candida palmioleophila* formerly identified as *Torulopsis candida*. Nihon Ishinkin Gakkai zasshi 1999; 40: 21-5.

23. Khunnamwong P, Jindamorakot S, Limtong S. Endophytic yeast diversity in leaf tissue of rice, corn and sugarcane cultivated in Thailand assessed by a culture-dependent approach. *Fungal Biol* 2018; 122: 785-99.
24. Limtong S, Kaewwichian R, Yongmanitchai W, Kawasaki H. Diversity of culturable yeasts in phylloplane of sugarcane in Thailand and their capability to produce indole-3-acetic acid. *World J Microbiol Biotechnol* 2014; 30: 1785-96.
25. Chanklan R, Kungkaew P, Am-In S and Jindamorakot S. Diversity of Yeasts in the Nature Education Center for Mangrove Conservation and Ecotourism, Chonburi Province. *TJST* 2012; 1: 155-68.
26. Jensen RH, Arendrup MC. *Candida palmiroleophila*: characterization of a previously overlooked pathogen and its unique susceptibility profile in comparison with five related species. *JCM* 2011; 49: 549-56.
27. Nagarathnamma T, Chunchanur SK, Rudramurthy SM, *et al.* Outbreak of *Pichia kudriavzevii* fungaemia in a neonatal intensive care unit. *J Med Microbiol* 2017; 66: 1759-64.
28. Aslani N, Janbabaei G, Abastabar M, *et al.* Identification of uncommon oral yeasts from cancer patients by MALDI-TOF mass spectrometry. *BMC Infect Dis* 2018; 18: 24.
29. Espinel-Ingroff A, Turnidge J, Alastruey-Izquierdo A, *et al.* Method-dependent epidemiological cutoff values for detection of Triazole resistance in *Candida* and *Aspergillus* species for the sensititre yeast one colorimetric broth and Etest agar diffusion methods. *Antimicrob Agents Chemother* 2019; 63.

Effects of Cadmium on Peptide Profiles and Biotyper Score Value of *Escherichia coli* O157:H7 Identified by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass-Spectrometry (MALDI-TOF/MS)

Kornkanok Wongprasert¹ Supitcha Pannengpetch² Tuangrat Kumar³
Pennapaporn Songthong³ Nitaya Indrawattana⁴ and
Patcharee Isarankura-Na-Ayudhya^{*1, 3}

¹Graduate Program in Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University,
Rangsit Campus, Pathum Thani Province Thailand

²Center for Research and Innovation, Faculty of Medical Technology, Mahidol University, Bangkok, Thailand

³Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University,
Rangsit Campus, Pathum Thani Province Thailand

⁴Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University,
Bangkok, Thailand

Abstract

Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass-spectrometry (MALDI-TOF/MS) based biotyping is a high-throughput technique for microbial identification. It has been used to replace existing cultivation techniques in clinical diagnosis laboratory in many hospitals of Thailand. On another aspect, contamination of foods by various kinds of heavy metals is a major inevitable situation in Thailand. However, there has been no report on the effects of heavy metals such as cadmium ions on expression pattern of peptides and biotyper score value upon identification of bacterial genus and species by MALDI-TOF MS. Herein, we studied the Maldi-TOF peptide profiles and biotyper score value of the important pathogenic bacteria *Escherichia coli* O157:H7 culturing in various concentrations of CdCl₂ ranging from 0.0016 mM to 1 mM, which was previously shown to cover all the concentrations under and over of heavy metal tolerant ability. Under the cadmium stress condition, MALDI-TOF MS can

*Corresponding author E-mail address: pujonoy@hotmail.com

specify the type of *E. coli* O157:H7 and provide a reliable score. The score values were trendy decreasing with the increasing CdCl_2 concentrations ($p < 0.005$). In conclusion, the results showed a drastic effect of cadmium ions on the peptide pattern identified by MALDI-TOF MS while exerting no significant effect on the score values used for the genus, species or strain identification. This study provides information and confidence for laboratory personnel who work with the MALDI-TOF/MS in identifying the pathogenic bacteria isolated from the areas that are suspected to be contaminated with heavy metals.

Keywords: MALDI-TOF MS, Cadmium, *E. coli* O157:H7, MALDI Biotyper, Biotyper score

ผลกระทบของแคดเมียมต่อรูปแบบการแสดงออกของเปปไทด์ และค่าคะแนน biotyper ในการวิเคราะห์หาชนิดเชื้อ *Escherichia coli* O157:H7 ด้วยเครื่อง Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass-Spectrometry (MALDI-TOF MS)

กรกนก วงศ์ประเสริฐ¹ สุพิชญ์ ปั่นเหน่งเพชร² ดวงรัตน์ กุมาร³ เพ็ญภาพร ทรงทอง³
นิตยา อินทราวัฒนา⁴ และพัชรี อิศรางกูร ณ อยุธยา^{*1, 3}

¹บัณฑิตศึกษา สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี

²ศูนย์วิจัยพัฒนานวัตกรรม คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร

³ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี

⁴ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ

เครื่อง Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass-spectrometry (MALDI-TOF MS) เป็น high-throughput techniques ที่สามารถนำมาใช้ระบุชนิดของแบคทีเรียได้ ในประเทศไทยได้เริ่มมีการนำมาใช้แทนเทคนิคดั้งเดิมแล้ว และโดยที่ปัจจุบันยังพบการปนเปื้อนโลหะหนักต่าง ๆ รวมทั้งแคดเมียมในอาหารและน้ำดื่มในประเทศไทย แต่ยังไม่มีการรายงานผลกระทบของแคดเมียมต่อรูปแบบเปปไทด์ที่แสดงออก รวมถึงผลกระทบต่อค่า biotyper score ที่ใช้ในการระบุจีโนสและสปีชีส์ของเชื้อแบคทีเรีย งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของแคดเมียมที่มีต่อรูปแบบมวลเปปไทด์ และค่า biotyper score ของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ที่เจริญในอาหารผสมแคดเมียมที่ความเข้มข้นมากกว่าและน้อยกว่าค่า metal tolerance test ได้แก่ช่วง 0.0016 - 1 มิลลิโมลาร์ แคดเมียม-คลอไรด์ (CdCl₂) โดยใช้เทคนิค MALDI-TOF MS จากการวิเคราะห์พบว่าแคดเมียมมีผลต่อรูปแบบมวลเปปไทด์ของเชื้อ *E. coli* O157:H7 โดยค่า biotyper score มีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นของแคดเมียมเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.005$) แต่ยังสามารถวิเคราะห์หาจีโนสและสปีชีส์ได้อย่างถูกต้อง ความรู้จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้เข้าใจผลของแคดเมียมต่อการวิเคราะห์ระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ได้มาจากพื้นที่ที่คาดว่าจะมีการปนเปื้อน

คำสำคัญ: MALDI-TOF MS, Cadmium, *E. coli* O157:H7, MALDI Biotyper, Biotyper score

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: pujonoy@hotmail.com

รับบทความ: 20 มิถุนายน 2562

แก้ไขบทความ: 24 พฤศจิกายน 2562

รับตีพิมพ์บทความ: 24 กุมภาพันธ์ 2563

1. บทนำ

Escherichia coli O157:H7 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง จัดเป็นกลุ่มย่อยของ *Escherichia coli* ที่สามารถก่อโรค จัดเป็นกลุ่ม Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) และจัดเป็น Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) เนื่องจากสามารถสร้างสารพิษชิกา (Shiga toxin) ที่ทำลายเซลล์ผนังลำไส้ได้ ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารอย่างรุนแรง ทำให้มีไข้ อาเจียน ท้องร่วงอย่างรุนแรง และมีอาการแทรกซ้อนทางโลหิตวิทยาที่สำคัญคือ hemolytic uremic syndrome (HUS) อันเป็นสาเหตุของไตล้มเหลว (renal failure) ในเด็ก⁽¹⁾ นอกจากนี้ยังทำให้เกิดภาวะ thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) คือเม็ดเลือดแดงแตกและไตวาย (hemolytic uremic syndrome) ซึ่งถือเป็นภาวะอันตรายและเป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตโดยเฉพาะในกลุ่มเด็กเล็กและผู้สูงอายุ⁽²⁾ จากการศึกษาพบว่าปศุสัตว์เป็นแหล่งสะสมของเชื้อ *E. coli* O157:H7 มากที่สุดและสามารถแพร่เชื้อสู่คนผ่านการรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนอุจจาระของสัตว์หรือคนที่ติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้อยู่ เช่น เนื้อสัตว์ ผลิตภัณฑ์จากนม ผลไม้ พืชผักสด และอาหารที่มีการปนเปื้อนน้ำจากบ่อน้ำหรือแหล่งน้ำสาธารณะ สำหรับการระบาดในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2559 มีรายงานผลตรวจการปนเปื้อน *E. coli* O157: H7 ในเนื้อวัวเก็บจากตลาดในเขตกรุงเทพมหานคร 17 แห่ง และปริมาณ 11 แห่ง จำนวน 58 ตัวอย่าง พบเชื้อ *E. coli* O157: H7 ร้อยละ 15.5⁽³⁾ การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการเพื่อระบุชนิดของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ประกอบด้วยขั้นตอนการเพาะเชื้อ การทดสอบสมบัติทางชีวเคมี การทดสอบหาสารพิษ (toxin) และการยืนยันด้วยวิธีทางอณูพันธุศาสตร์ เช่น real time-PCR ซึ่งมีหลายขั้นตอนและใช้เวลานาน ปัจจุบันมีการนำเครื่อง Matrix-Assisted Laser

Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) มาใช้ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ เนื่องจากสามารถระบุชนิดเชื้อถึงระดับจีโนม สปีชีส์ ได้รวดเร็ว มีความไวและมีความแม่นยำสูง^(4, 5) ทำให้เกิดความรวดเร็วในการวินิจฉัยโรค MALDI-TOF MS แยกชนิดของเชื้อแบคทีเรียออกจากกันได้โดยอาศัยรูปแบบมวลเปปไทด์สายสั้น (peptide mass fingerprint หรือ peptide barcode) โดยส่วนใหญ่พบว่าเปปไทด์เหล่านี้เป็นองค์ประกอบของ housekeeping proteins, ribosomal protein หรือ โปรตีนอื่นๆ ที่มีขนาดเล็กประมาณ 2,000-15,000 ดาลตัน (Da) และมีจำนวนมากภายในเซลล์ ซึ่งจะถูกแยกจากกันโดยค่ามวลต่อประจุ (mass/charge; M/Z) ที่ต่างกันภายใต้ระบบสุญญากาศ⁽⁶⁾ ทั้งนี้เนื่องจากเครื่องมีความไวสูง ดังเห็นได้จากผลงานวิจัยที่พบว่าเครื่อง MALDI-TOF MS สามารถแยก) เชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ที่มีการกลายพันธุ์แบบ single point mutation ออกจากเชื้อกลุ่มควบคุมได้⁽⁷⁾

แคดเมียมเป็นโลหะหนักที่มีความเป็นพิษสูงสามารถทำให้เกิด reactive oxygen species (ROS)^(8, 9) ทำลายดีเอ็นเอ ยับยั้งกระบวนการสร้างกรดนิวคลีอิกและโปรตีนภายในเซลล์ได้^(9, 10) จากการศึกษาจีโนมของเชื้อ *E. coli* ที่เติบโตในภาวะที่มีแคดเมียมด้วยเทคนิค high-density oligonucleotide microarray (affymetrix) พบว่าความเป็นพิษของแคดเมียมยับยั้งการแสดงออกของยีนหลายชนิดที่ระดับการถอดรหัส เช่น ลดการสร้าง mRNA ของยีน r-protein และ zinc-binding protein⁽¹¹⁾ สำหรับการศึกษาในระดับโปรตีนด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์พบว่า แคดเมียมส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในแบคทีเรียอย่างชัดเจน แบคทีเรีย *E. coli* ผลิตโปรตีนหลายชนิดเพื่อตอบสนองต่อแคดเมียม โดยเฉพาะโปรตีนที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับความเครียด

ออกซิเดทิฟ ความร้อน ความเย็นหรือแรงดันออสโมติก^(12, 13) นอกจากนี้ยังพบว่า *E. coli* มีกลไกการตอบสนองต่อแคดเมียมโดยการสะสมแคดเมียมที่เยื่อหุ้มเซลล์⁽¹⁴⁾ การศึกษาของ Craig และคณะพบว่า *E. coli* K-12 (MG1655) ตอบสนองต่อแคดเมียมโดยการสร้าง mRNA ของยีน *hdeA* *otsA* และ *yjbJ* หลังจากได้รับแคดเมียมเพียง 5 นาที และยังพบการเพิ่มขึ้นของ mRNA ยีน ATP-driven (*ycfU*) ที่อาจใช้ขนส่งแคดเมียมออกจากเซลล์⁽¹⁵⁾ จึงสันนิษฐานว่าแคดเมียมน่าจะมีผลต่อรูปแบบมวลเปปไทด์ของแบคทีเรียคล้ายกับรายงานวิจัยผลของโลหะหนักสังกะสี แคดเมียม ตะกั่ว ทองแดง และเงิน ต่อการเปลี่ยนแปลงรูปแบบมวลเปปไทด์ของ *Staphylococcus aureus* เมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS⁽¹⁶⁾ เนื่องจากประเทศไทยยังประสบปัญหาการปนเปื้อนโลหะหนักแคดเมียมจากการปล่อยน้ำเสียทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมและการทำเหมืองแร่ส่งผลให้มีแคดเมียมสะสมในสิ่งแวดล้อม โดยมีรายงานพบแคดเมียมเกินมาตรฐานในหอยเชลล์ที่ใช้บริโภค (*Amusium pleuronectes*)⁽¹⁷⁾ ข้าว⁽¹⁸⁾ หมู และไคหมู ผัก⁽¹⁹⁾ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานวิจัยผลกระทบของแคดเมียมที่ปนเปื้อนจากอาหารว่าจะมีผลต่อระดับโปรตีนของเชื้อก่อโรคที่สำคัญเช่น *E. coli* O157:H7 ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS หรือไม่ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของแคดเมียมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อรูปแบบมวลเปปไทด์และค่า biotyper score ที่ใช้ระบุชนิดของแบคทีเรีย *E. coli* O157:H7 ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้จะทำให้ทราบผลกระทบของแคดเมียมต่อการระบุชนิดของแบคทีเรีย *E. coli* O157:H7 และรูปแบบมวลเปปไทด์ของแบคทีเรียที่เปลี่ยนแปลงตอบสนองต่อแคดเมียมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อเป็นข้อมูลในการวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียด้วยเครื่อง MALDI-TOF

MS ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ต่อไป

2. วิธีการทดลอง

การทดสอบหาค่าความสามารถทนต่อโลหะของเชื้อ (heavy metals tolerance test)

นำเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* O157:H7 โคโลนีเดี่ยวมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (ทำ 3 ซ้ำ) นำไปบ่มในตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เหย้าแบบหมุนความเร็ว 120 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 18 ชั่วโมง วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แล้วปรับความเข้มข้นของสารแขวนลอยแบคทีเรียให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.1 ซึ่งเท่ากับ 0.5 McFarland นำมาเจือจางในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ LB ในอัตราส่วน 1:10 หลังจากนั้นหยดตัวอย่างแบคทีเรียปริมาตร 2 ไมโครลิตรลงบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีและมีความเข้มข้นคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 มิลลิโมลาร์ ก่อนนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง ความเข้มข้นสุดท้ายของแคดเมียมคลอไรด์ ที่เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ถือเป็นค่า heavy metals tolerance test⁽²⁰⁾

วิธีสกัดโปรตีนแบบ direct transfer, extended direct transfer และ extraction

นำเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง มาทดสอบจำแนกชนิดเชื้อด้วย MALDI-TOF MS โดยนำแต่ละโคโลนีมาแยกวิเคราะห์ทั้งหมด 3 โคโลนีในลักษณะ technical replicates โดยเปรียบเทียบวิธีเตรียมตัวอย่าง 3 วิธีดังนี้

การเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี direct transfer ใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยเชื้อแบคทีเรียแยกเดี่ยวบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ป้ายลงบน MALDI target plate และ

หอยดสารละลายกรดแอลฟา-ไฮยาโน-4-ไฮดรอกซี
ซินนามิก (HCCA) ที่ละลายใน อะซิโตนไตรล
เข้มข้น 50%/กรดไตรฟลูออโรอะซิติก (TFA) เข้มข้น
2.5% ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ทับลงบนเชื้อที่ป้ายบน
MALDI target plate และปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
การเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี extended direct
transfer ใช้ไม้จิ้มฟันจิ้มเชื้อแบคทีเรียแยกเดี่ยวบน
อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ป้ายลงบน MALDI target
plate และหอยดสารละลายฟอร์มิคเข้มข้น 70%
ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ทับลงบนเชื้อที่ป้ายบน
MALDI target plate ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
หลังจากนั้นหอยดสารละลาย HCCA ใน อะซิโตนไตรล
เข้มข้น 50% / TFA เข้มข้น 2.5% ปริมาตร 1
ไมโครลิตร ทับลงบนเชื้อที่ป้ายบน MALDI target
plate และปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง การเตรียม
ตัวอย่างด้วยวิธี extraction ปาดเชื้อแบคทีเรียแยก
เดี่ยวบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งให้ได้ปริมาณ 5-10
มิลลิกรัม ใส่ในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร
ที่มีน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 300 ไมโครลิตร ทำให้
เชื้อกระจายตัวดีด้วยเครื่องผสมสาร (Vortex mixer)
เติมเอทานอล 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไป
ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อวินาทีนาน
2 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง เหลือไว้แต่ส่วนที่เป็น
ตะกอน และเปิดฝาหลอดทิ้งไว้ให้เอทานอลระเหย
จนหมด ละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายกรด
ฟอร์มิคเข้มข้น 70% ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสม
ให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร และเติมอะซิโตนไตรล
เข้มข้น 100% ลงไป 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุดนาน 2 นาที หลังจาก
นั้นหอยดสารละลายส่วนใส 1 ไมโครลิตร หอยดลงบน
MALDI target plate ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
และหอยดสารละลาย HCCA ที่ละลายในอะซิโตนไตรล
เข้มข้น 50%/ TFA เข้มข้น 2.5% ปริมาตร 1
ไมโครลิตร ทับลงไป และปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

หลังจากนั้นนำตัวอย่างเปปไทด์ที่เตรียมจาก
เซลล์แบคทีเรียทั้ง 3 วิธีไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง
MALDI-TOF MS รุ่น Maldi Biotyper (Bruker,
Germany) โดยเปรียบเทียบความถูกต้องของเครื่องด้วย
เปปไทด์มาตรฐานของ *Escherichia coli* สายพันธุ์
DH5 α ที่มีอัตราส่วนมวลต่อประจุของเปปไทด์
เท่ากับ 5098, 5381, 6255, 7274, 10300, 13683
และ 16952 ก่อนทุกครั้ง การเก็บข้อมูลเปปไทด์ใน
โหมด sum เป็นการรวมข้อมูลรูปแบบน้ำหนักโมเลกุล
เปปไทด์ของตัวอย่างแบคทีเรียจาก 3 หลุมบน MALDI
target plate และนำไปเปรียบเทียบกับรูปแบบ
มวลเปปไทด์ของแบคทีเรียในฐานข้อมูล (Bruker
database version 3.0) ความน่าเชื่อถือของผลการ
ทดสอบรายงานเป็น biotyper score โดยถ้ามากกว่า
หรือเท่ากับ 2.0 ขึ้นไปมีความน่าเชื่อถือระดับสปีชีส์
สำหรับ biotyper score ตั้งแต่ 1.7 ขึ้นไปแต่น้อยกว่า
2.0 มีความน่าเชื่อถือระดับจิ้นัส แต่ถ้าน้อยกว่า 1.7
ไม่สามารถรายงานผลได้⁽²¹⁾

การเพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียในอาหารเหลวผสม
แคดเมียมสำหรับวิเคราะห์รูปแบบมวลเปปไทด์
ด้วยเทคนิค Matrix-Assisted Laser Desorption
Ionization-Time of Flight (หรือ MALDI
Biotyper)

นำเชื้อ *E. coli* O157:H7 มาเลี้ยงบน LB
agar ให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยว จากนั้นเขี่ยเชื้อจำนวน
3 โคโลนีจากคนละจานเลี้ยงเชื้อเพื่อเป็นการควบคุม
ผลการทดลองในลักษณะ technical replicates
นำไปเลี้ยงใน LB broth แยกกันแต่ละหลอด บ่มเพาะ
ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง วัดการดูด
กลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แล้วปรับ
ความเข้มข้นเชื้อให้ได้ประมาณ 1×10^9 ซีเอฟยูต่อ
มิลลิลิตร (CFU/mL) หลังจากนั้นเติมสารละลาย
แคดเมียมคลอไรด์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความ
เข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.0016, 0.008, 0.04, 0.2, 0.5

และ 1 มิลลิโมลาร์ นำไปบ่มเพาะที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บเชื้อที่เวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นปั่นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง โดยใช้ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที คัดส่วนใสด้านบนทิ้ง เก็บส่วนตะกอนเซลล์ส่วนหนึ่งไว้ศึกษารูปแบบมวลเปปไทด์ และทดสอบการอยู่รอดของเชื้อโดยการหยดเชื้อปริมาตร 4 ไมโครลิตรบน LB agar บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมงเพื่อสังเกตการอยู่รอดของเชื้อหลังได้รับแคดเมียมที่ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับกลุ่มตัวอย่างที่ไม่ได้รับแคดเมียม

เตรียมตัวอย่างเปปไทด์จากตะกอนเซลล์ด้วยวิธี extraction โดยเติมสารละลายเอธานอลเข้มข้น 70% ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตรลงในตะกอนเซลล์ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที คัดส่วนใสทิ้ง เติมน้ำสะอาดละลายกรดฟอร์มิกเข้มข้น 70% ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กระจายตะกอนโดยใช้ไปเปิดดูดขึ้นลง หลังจากนั้นเติมอะซิโตนในทริลเข้มข้น 100% ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที เก็บส่วนใสมาหาความเข้มข้นของโปรตีนด้วยเครื่อง nanodrop ปรับความเข้มข้นของโปรตีนในแต่ละตัวอย่างให้ได้เท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรด้วยน้ำกลั่นก่อนผสมกับสารละลาย HCCA ที่ละลายในอะซิโตนทริลเข้มข้น 50% /กรดไตรฟลูออโรอะซิติกเข้มข้น 2.5% ด้วยอัตราส่วน 1:1 หลังจากนั้นหยดตัวอย่างปริมาตร 2 ไมโครลิตรลงบน MALDI target plate แต่ละตัวอย่างจะหยดซ้ำ 5 หยด ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Ultraflex III TOF/TOF mass spectrometer (Bruker, Germany) ใช้เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α เป็นเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน

การวิเคราะห์ทางสถิติ

เปรียบเทียบค่า biotyper score ของเชื้อแบคทีเรียในภาวะที่ไม่ได้รับแคดเมียม (กลุ่มควบคุม) กับภาวะที่มีแคดเมียม อิงตามสถิติ ANOVA โดยใช้ GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) วิเคราะห์ข้อมูลรูปแบบมวลเปปไทด์ด้วยโปรแกรม Bruker FlexAnalysis 3.0 วิเคราะห์ค่าความเหมือนระหว่างรูปแบบมวลเปปไทด์ของตัวอย่างกับรูปแบบมวลเปปไทด์ในฐานข้อมูล version 3.3.1.0 (4,613 entries) ด้วยโปรแกรม Bruker Biotyper 3.0 แล้ววิเคราะห์ principal component analysis (PCA) และ cluster analysis ด้วยโปรแกรม Bruker ClinProTools version 2.2 อิงตามสถิติ Wilcoxon/Kruskal-Wallis, Anderson-Darling (AD), t-test/ANOVA (TTA) โดยกำหนดค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ p - value น้อยกว่า 0.05

3. ผลการทดลอง

การทดสอบวิธีสกัดเปปไทด์จากเซลล์แบคทีเรียเพื่อใช้วิเคราะห์รูปแบบมวลเปปไทด์ด้วย MALDI-TOF MS

ทดสอบหาวิธีสกัดเปปไทด์ที่เหมาะสมโดยใช้เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922 แล้ววิเคราะห์รูปแบบมวลเปปไทด์ด้วยเครื่อง MALDI Biotyper (Bruker, Germany) โดยศึกษาเปรียบเทียบระหว่าง 3 วิธี direct transfer, extended direct transfer และ extraction โดยใช้โปรแกรม Bruker Biotyper 3.0 software และ library version 3.3.1.0 (4,613 entries) พบว่าวิธีที่ให้จำนวนเปปไทด์มากที่สุดคือ วิธี extraction ที่พบสัญญาณเปปไทด์จำนวน 102 เปปไทด์ และสามารถระบุชนิดของเชื้อเป็น *E. coli* ATCC 25922 ที่ score เท่ากับ 2.077 วิธีที่ให้จำนวนสัญญาณ

เปปไทด์รองลงมาคือ วิธี extended direct transfer ที่ตรวจพบสัญญาณเปปไทด์จำนวน 93 เปปไทด์ สามารถระบุชนิดของเชื้อเป็น *E. coli* ATCC 25922 ที่ biotyper score เท่ากับ 2.148 ส่วนวิธี direct transfer ตรวจพบสัญญาณเปปไทด์เพียง 87 เปปไทด์ ระบุชนิดของเชื้อเป็น *E. coli* ATCC 25922 ที่ biotyper score เท่ากับ 2.196 จึงสรุปได้ว่าวิธีสกัด

เปปไทด์จากเซลล์เพื่อระบุชนิดของแบคทีเรียที่ให้ผลดีที่สุด คือ วิธี extraction เนื่องจากสกัดได้เปปไทด์จำนวนมากที่สุด และยังสามารถระบุชนิดของเชื้อเป็น *E. coli* ATCC 25922 ด้วยค่า biotyper score ที่น่าเชื่อถือ ผลรูปแบบมวลเปปไทด์ของทั้ง 3 วิธีแสดงใน Fig. 1

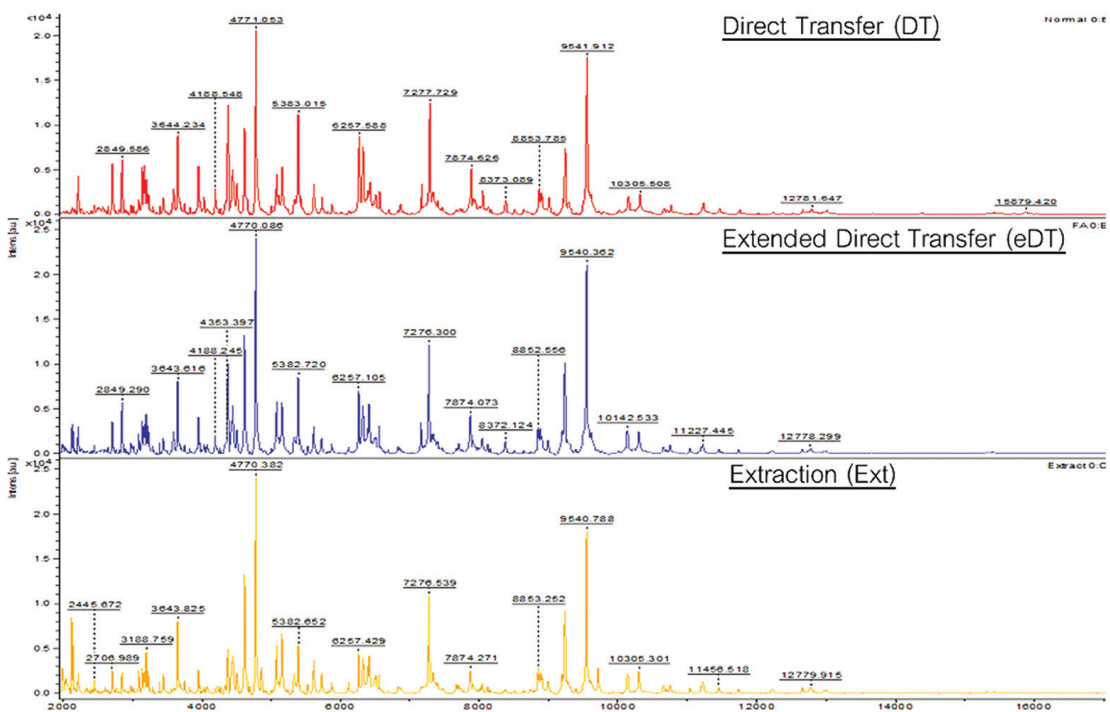


Fig. 1 MALDI-TOF mass spectra of whole-cell extracts of *E. coli* ATCC 25922 obtained from three different peptide: extraction methods: Direct Transfer Procedure, Extended Direct Transfer Procedure and Extraction Procedure. Absolute intensities of the ions are represented in y-axis and the masses (m/z) of the ions are shown on the x-axis

การวิเคราะห์รูปแบบมวลเปปไทด์ของเชื้อ *E. coli* O157:H7 เมื่อสัมผัสกับแคดเมียมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

จากการทดสอบหาค่า heavy metals tolerance test ของเชื้อ *E. coli* O157:H7 พบว่าความเข้มข้นสุดท้ายของแคดเมียมคลอไรด์ ที่เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้คือ 0.2 มิลลิโมลาร์ เพื่อศึกษาผลของแคดเมียมต่อรูปแบบมวลเปปไทด์จึงได้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* O157:H7 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จนได้จำนวนเชื้อประมาณ 1×10^9 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายแคดเมียมให้มีความเข้มข้นครอบคลุมค่า heavy metals tolerance test โดยเลี้ยงเชื้อ *E. coli*

O157:H7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแคดเมียมคลอไรด์เข้มข้น 0.0016, 0.008, 0.04, 0.2, 0.5 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ ผลการทดสอบการยู่รอดของเชื้อพบว่าหลังจากที่เชื้อเจริญในอาหารที่มีสารละลายแคดเมียมทั้ง 6 ความเข้มข้นเป็นเวลา 18 ชั่วโมง เชื้อทั้งหมดยังคงสามารถเจริญเติบโตต่อใน LB agar ได้

จากผลการทดลอง Table 1 แสดงผลการวิเคราะห์หารูปแบบมวลเปปไทด์ของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ที่เจริญภายใต้ความกดดันจากพิษของแคดเมียมเข้มข้น 0.0016-1.0 มิลลิโมลาร์ ด้วยเครื่อง MALDI-TOF โดยเปรียบเทียบรูปแบบมวลเปปไทด์ช่วง 2,000-18,000 (m/z) และมี signal-to-noise ratio มากกว่า 5 พบว่า แคดเมียมคลอไรด์ ทุกความ

Table 1 Mean biotyper score values of *E. coli* O157:H7 after exposure to various concentrations of CdCl_2

Cd concentration				
(mM Cd)	Score value (mean)	SD	Number of spots	P value
Control	2.58	0.036	15	--
0.0016	2.54	0.024	13	0.0022
0.008	2.55	0.044	13	0.0578
0.04	2.54	0.003	13	0.0039
0.2	2.54	0.003	13	0.0039
0.5	2.52	0.003	13	0.0001
1	2.46	0.003	13	0.0175

เข้มข้นไม่มีผลต่อการวิเคราะห์จีโนมและสปีชีส์ ของ *E. coli* O157:H7 โดยยังคงมีค่า biotyper score ตั้งแต่ 2.00 ขึ้นไป อย่างไรก็ตามเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมค่า biotyper score มีแนวโน้มลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเชื้อเจริญในอาหารที่มีความเข้มข้นของแคดเมียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ค่า biotyper score

ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับกลุ่มควบคุมมากที่สุด ($p \leq 0.05$) รูปแบบมวลเปปไทด์ของเชื้อเมื่อได้รับพิษของแคดเมียมจะมีการเปลี่ยนแปลงของเปปไทด์ช่วง 2000-3000, 4000-5000, 7000-8000 m/z ดังแสดงใน Fig. 2 เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วย principal component analysis และ dendrogram พบว่าที่ความเข้มข้นของแคดเมียมคลอไรด์ ช่วง 0.0016-

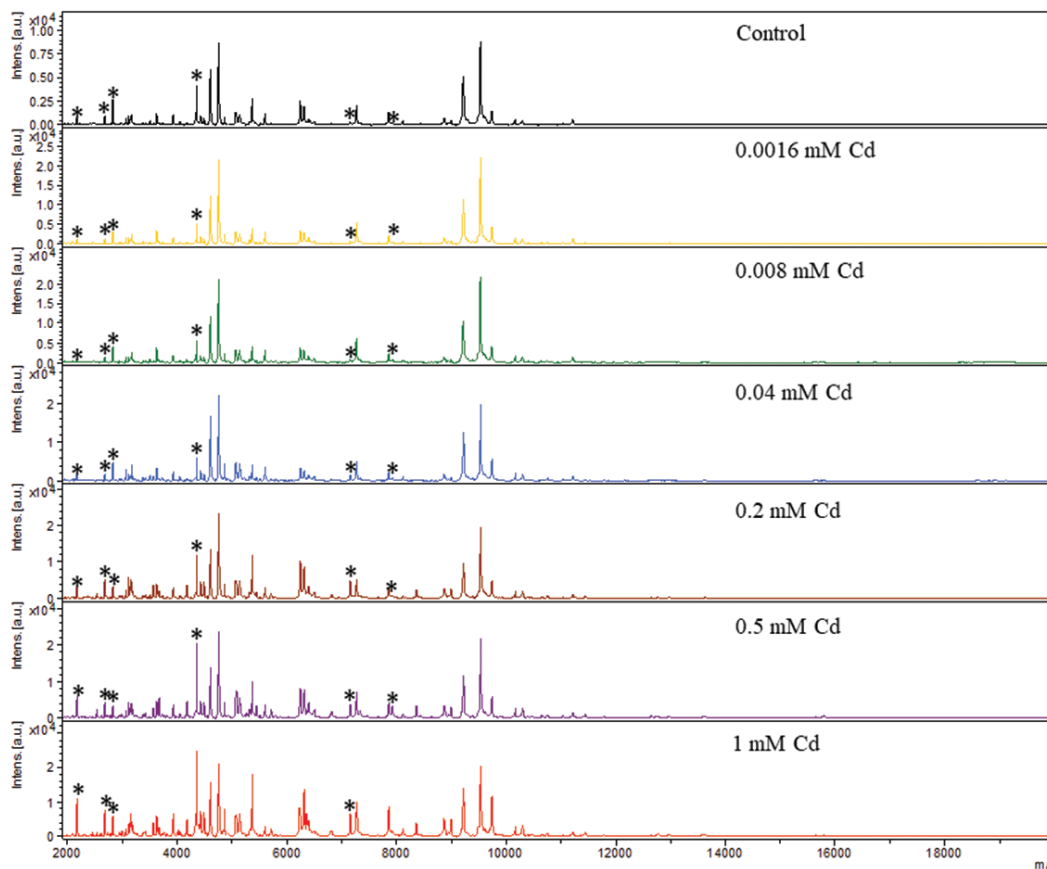


Fig. 2 Mass-to-charge ratio (m/z) spectra in the m/z range of 2–18 kDa of *E. coli* O157:H7 identified by MALDI-TOF Bruker Biotyper after exposure to various concentrations of CdCl_2 for 18 hours. Asterisks represent difference of spectra peaks among control and cadmium treatments

0.04 มิลลิโมลาร์ รูปแบบมวลเปปไทด์ของเชื้อจะไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม และสามารถแยกความแตกต่างของรูปแบบมวลเปปไทด์เมื่อเชื้อเจริญในอาหารที่มีแคดเมียมคลอไรด์ เข้มข้นมากกว่า 0.2 มิลลิโมลาร์ ออกจากกลุ่มควบคุมได้อย่างชัดเจน (Fig. 3A, 3B) แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้เครื่อง MALDI-TOF MS วิเคราะห์รูปแบบมวลเปปไทด์ของแบคทีเรียเพื่อศึกษาการตอบสนองต่อความเครียดจากพิษโลหะหนักแคดเมียมได้

4. วิจัยนผลการศึกษา

การศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นการประเมินผลของโลหะหนักแคดเมียมต่อการระบุนชนิดของ *Escherichia coli* O157:H7 ด้วยเครื่อง matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) ปัจจุบันมีการนำเครื่อง MALDI-TOF MS มาใช้ในห้องปฏิบัติการทางเทคนิคการแพทย์มากขึ้น เนื่องจากมีความไวและความแม่นยำสูง ออกผลการระบุนชนิดของแบคทีเรียได้รวดเร็ว และมีขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างไม่ยุ่งยาก อย่างไรก็ตามสิ่งส่งตรวจที่เป็น

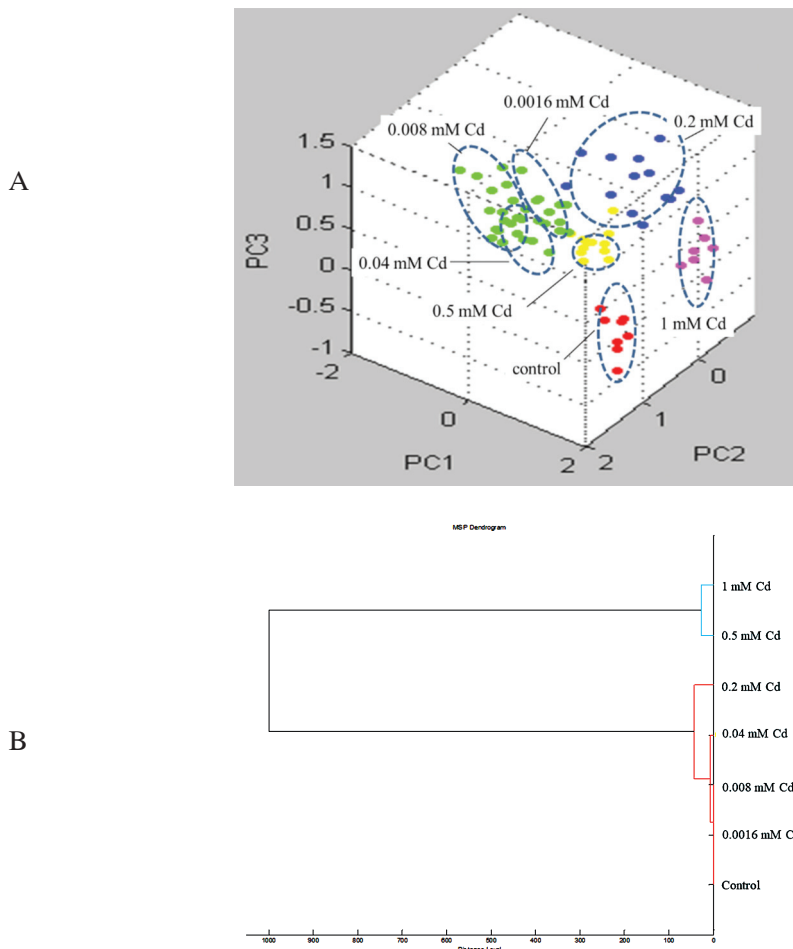


Fig. 3 Principal component analysis (PCA) and cluster analysis of *E. coli* O157:H7 after exposure to various concentrations of CdCl_2 for 18 hours. A) total mass spectra analyzed by PCA analysis showed intermixture (0.016 mM, 0.008 mM and 0.04 mM CdCl_2) and separated groups among the control, 0.2 mM, 0.5 mM and 1 mM. The contributions of PC1, PC2 and PC3 were around 58%, 14% and 9%, correspondingly. B) Cluster analysis constructed from the scores of PCA shows two cluster groups according to cadmium concentrations at higher and lower ranges of the metal tolerance ability. Numbers shown in x-axis revealed the distance level of tested treatment conditions

อุจจาระมักมีโอกาสนปนเปื้อนด้วยโลหะหนักต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโลหะหนักที่มีความเป็นพิษสูงอย่าง แคดเมียม การประเมินผลกระทบของสิ่งปนเปื้อน เช่น โลหะหนักแคดเมียม ต่อกระบวนการวิเคราะห์

ระบุชนิดของแบคทีเรียด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS ยังมีการศึกษาไม่มากนัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับ เชื้อ *E. coli* O157: H7 ที่มีความรุนแรงและนำไปสู่ การเสียชีวิตของผู้ป่วย มีการระบาดทั้งในและนอก

ประเทศ จึงต้องมีการเฝ้าระวังการระบาดอย่างต่อเนื่อง ซึ่งการตรวจทางห้องปฏิบัติการสำหรับ *E. coli* O157:H7 ซึ่งได้แก่ การทดสอบทางชีวเคมี ร่วมกับวิธีทาง immunology เพื่อหา toxin ของเชื้อด้วยแอนติบอดีและการยืนยันด้วยการวิเคราะห์จีโนม (genome analysis)⁽³⁾ มีหลายขั้นตอนและใช้เวลานาน

ปรีชาดี⁽²²⁾ ได้รายงานไว้ว่า MALDI-TOF มีความสามารถในการวิเคราะห์ชนิดเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกรูปร่างกลมได้แม่นยำกว่าการเพาะเลี้ยงแบบวิธีดั้งเดิม เช่น การระบุชนิดเชื้อ *Enterococcus* spp. มีความถูกต้องร้อยละ 100 ในขณะที่วิธีการเพาะเลี้ยงถูกต้องร้อยละ 95 เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาในการทดสอบ MALDI-TOF MS ใช้เวลาเฉลี่ยประมาณ 8 นาที ในขณะที่วิธีดั้งเดิมใช้เวลาเฉลี่ย 24-48 ชั่วโมง ค่าใช้จ่ายในการทดสอบด้วย MALDI-TOF MS ถูกกว่าวิธีดั้งเดิม 16 เท่า ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ ในต่างประเทศ^(23, 24) อย่างไรก็ตามเนื่องจากเครื่อง MALDI-TOF มีความไวสูง และมีหลักการประมวลผลโดยใช้รูปแบบมวลเปปไทด์ของเชื้อ ซึ่งมีความจำเพาะสำหรับแบคทีเรียแต่ละชนิด ทำให้สามารถจำแนกชนิดได้จนถึงระดับสปีชีส์ และเนื่องจากแบคทีเรียมีกระบวนการเปลี่ยนแปลงโปรตีนหรือเปปไทด์เพื่อตอบสนองต่อสภาวะต่างๆ จึงมีการศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างเปปไทด์และประยุกต์ใช้รูปแบบมวลเปปไทด์เพื่อศึกษาการตอบสนองของแบคทีเรียต่อความเครียด⁽²⁵⁻²⁷⁾ จากการประเมินวิธีสกัดเปปไทด์จากเซลล์แบคทีเรียมาตรฐาน *E. coli* ATCC 25922 พบว่า วิธีสกัดเปปไทด์ทั้ง 3 วิธีคือ direct transfer, extended direct transfer และ extraction สามารถระบุจิ้นส์และสปีชีส์ได้ถูกต้องไม่แตกต่างกัน ให้ผล biotyper score ความเชื่อมั่นอยู่ในช่วงเดียวกันคือมากกว่า 2.00 สำหรับการปฏิบัติงานทางเทคนิคการแพทย์เพื่อจำแนกหรือระบุชนิด

ของแบคทีเรียสามารถเลือกใช้วิธีใดก็ได้ แต่วิธี extended direct transfer มีขั้นตอนการสกัดเปปไทด์จากตัวอย่างน้อยกว่าและใช้เวลาน้อยกว่า

วิธีสกัดแบบ extraction สามารถสกัดเปปไทด์จากเซลล์แบคทีเรียมาตรฐาน *E. coli* ATCC 25922 ได้จำนวนมากที่สุดคือ 102 เปปไทด์ ในขณะที่วิธี direct transfer (DT) และ extended direct transfer (eDT) สกัดเปปไทด์ได้จำนวน 87 และ 97 เปปไทด์ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Schulthess *et al.*⁽²⁸⁾ การที่วิธี extraction และ extended direct transfer สกัดได้จำนวนเปปไทด์มากกว่าอาจเป็นผลจากการเติมกรดฟอร์มิก ที่ช่วยลดการรบกวนจากสารที่ไม่ใช่เปปไทด์ จึงสามารถเพิ่มอัตราความสำเร็จในการระบุจำแนกชนิดของแบคทีเรียและเชื้อราได้ถึงร้อยละ 85 และ ร้อยละ 60 ตามลำดับ^(28, 29) ดังนั้นคณะวิจัยจึงเลือกใช้วิธี extraction มาพัฒนาให้ดีขึ้นโดยเพิ่มขั้นตอนวัดปริมาณเปปไทด์ด้วยเครื่อง nanodrop แล้วปรับให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ก่อนผสมกับสารละลายกรดแอลฟา-ไซยาโน-4-ไฮดรอกซีซินนามิก เพื่อลดความผิดพลาดจากการใช้ปริมาณเปปไทด์ไม่เท่ากันในแต่ละตัวอย่าง ทำให้สามารถคำนวณเปรียบเทียบเชิงปริมาณได้ถูกต้องยิ่งขึ้น รวมถึงเป็น gold standard สำหรับสร้างฐานข้อมูลรูปแบบมวลเปปไทด์ของจุลินทรีย์ชนิดใหม่

จากการศึกษาผลของแคดเมียมช่วงความเข้มข้นระหว่าง 0.0016 - 1 มิลลิโมลาร์ ต่อค่า biotyper score ของเชื้อ *E. coli* O157:H7 พบว่า แคดเมียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.0016 มิลลิโมลาร์ และ 0.008 มิลลิโมลาร์ ซึ่งน้อยกว่าหรือใกล้เคียงกับค่าความปลอดภัยที่กำหนดโดยองค์การอนามัยโลก หรือ World Health Organization (0.0071 มิลลิโมลาร์ ต่อวัน)⁽³⁰⁾ ส่งผลให้รูปแบบมวลเปปไทด์ของเชื้อ *E. coli* O157:H7 เปลี่ยนไปจนแตกต่าง

จากกลุ่มควบคุม (0 มิลลิโมลาร์) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแคดเมียมคลอไรด์ เป็น 0.04 มิลลิโมลาร์ รูปแบบมวลเปปไทด์ของเชื้อยังคงไม่แตกต่างจากที่ความเข้มข้น 0.0016 มิลลิโมลาร์ และ 0.008 มิลลิโมลาร์ ดังแสดงใน Fig. 4 คาดว่าความเป็นพิษของแคดเมียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.0016 - 0.04 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้เชื้อต้องปรับตัวด้วยกลไกการตอบสนองทางชีวโมเลกุลระดับเปปไทด์คล้ายคลึงกัน และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแคดเมียมคลอไรด์เป็น 0.2, 0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์ รูปแบบมวลเปปไทด์ของเชื้อจะไม่คล้ายกับเมื่อได้รับแคดเมียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่ำอีกต่อไป แต่จะมีลักษณะเปลี่ยนแปลงจนแตกต่างอย่างจำเพาะ แสดงว่าเมื่อสัมผัสกับแคดเมียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 0.04 มิลลิโมลาร์ เชื้อ *E. coli* O157:H7 จะตอบสนองต่อแคดเมียมแตกต่างไปจากเดิมและมีความจำเพาะขึ้นตามความรุนแรงของพิษแคดเมียมที่ได้รับ

ผลการวิจัยชิ้นนี้พบการเปลี่ยนแปลงของเปปไทด์ขนาด 2000-3000, 4000-5000 และ 7000-8000 m/z เมื่อเชื้อ *E. coli* O157:H7 สัมผัสแคดเมียมคลอไรด์ (Fig. 2) แสดงว่า มีการเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมของเปปไทด์หรือโปรตีนที่เป็น precursor ของเปปไทด์กลุ่มนี้เพื่อตอบสนองต่อความรุนแรงของพิษแคดเมียม ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยก่อนหน้านี้หลายชิ้นที่พบว่าเมื่อเชื้อ *E. coli* ได้รับพิษแคดเมียมจะมีรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไปโดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีนในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน (translation) เช่น elongation factor-Tu และ 30S ribosomal protein S1⁽¹²⁾ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA replication and recombination) การสร้างพลังงาน (energy metabolisms)⁽¹¹⁾ ribosome particles⁽³¹⁾ หรือ ribosomal proteins ของ *E. coli* ที่มีขนาดประมาณ 3,000 - 10,000 m/z^(32, 33) เป็นไปได้ว่า

เปปไทด์ขนาด 4000 - 5000 m/z จะเป็นไรโบโซมส่วน L26, L36, L27 ในขณะที่เปปไทด์ขนาด 7000-8000 m/z จะเป็นไรโบโซมส่วน L29, L31, L35 ซึ่งมักเกิดการดัดแปรโมเลกุล (post-translational modification) ด้วยกระบวนการ N-terminal methionine loss, methylation, thiomethylation และ acetylation ทำให้สามารถพัฒนาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพได้ดี⁽³⁴⁾ และจากผลการศึกษาในเชื้อ *Staphylococcus aureus* พบว่าแคดเมียมทำให้รูปแบบมวลเปปไทด์แตกต่างจากกลุ่มควบคุม รูปแบบของยีน 16S rRNA ที่ถอดรหัสเป็น ribosomal proteins ก็เปลี่ยนแปลงไปเช่นเดียวกัน⁽¹⁶⁾ คณะวิจัยจึงสันนิษฐานว่าแคดเมียมอาจส่งผลต่อยีนควบคุมการสังเคราะห์ไรโบโซมทำให้ชนิดและปริมาณของเปปไทด์หรือโปรตีนองค์ประกอบของไรโบโซมของเชื้อ *E. coli* O157:H7 เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวแปรผันตามความเข้มข้นของแคดเมียมที่มากขึ้น แต่รูปแบบมวลเปปไทด์ของแบคทีเรียยังคงมีค่า biotyper score ที่ใช้ในการระบุชนิดและสปีชีส์มากกว่า 2.00 ซึ่งยังสามารถระบุชนิดของเชื้อได้เหมือนกับกลุ่มเชื้อควบคุม

5. สรุป

การศึกษาวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าแคดเมียมซึ่งเป็นโลหะที่มีความเป็นพิษสูงและยังมีการปนเปื้อนในประเทศไทย มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรครุนแรง ส่งผลให้รูปแบบมวลเปปไทด์เปลี่ยนแปลงตามความรุนแรงของพิษแคดเมียม biotyper score มีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นของแคดเมียมสูงขึ้นแต่ไม่มีผลต่อการระบุชนิดแบคทีเรียในระดับจีโนมและสปีชีส์ของเชื้อเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS ผลงานวิจัยนี้สะท้อนให้เห็นถึงศักยภาพของ MALDI-TOF MS ในการติดตามการเปลี่ยนแปลง

ของรูปแบบมวลเปปไทด์เมื่อแบคทีเรียได้รับความเครียดจากสารพิษแคดเมียม และความเหมาะสมที่จะนำ MALDI-TOF MS มาพัฒนาต่อยอดเพื่อศึกษาเชื้อแบคทีเรียในมิติต่างๆ ซึ่งนอกจากจะมีความถูกต้องแม่นยำสูงแล้วยังสามารถวิเคราะห์ได้รวดเร็วและมีขั้นตอนการวิเคราะห์น้อยลดโอกาสการติดเชื้อของผู้ปฏิบัติการในห้องปฏิบัติการทางเทคนิคการแพทย์ จึงเหมาะสำหรับใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียและการวิเคราะห์หาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของระบบวิทยาของโลหะหนักในสิ่งแวดล้อม หรือการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณทุนมูลนิธิพระบรมราชานุสรณ์พระบาทสมเด็จพระปกเกล้าเจ้าอยู่หัวและสมเด็จพระนางเจ้ารำไพพรรณี สำหรับร้อยโทหญิงกรนก วงศ์ประเสริฐ และทุนบูรณาการแผนบูรณาการพัฒนาศักยภาพวิทยาศาสตร์เทคโนโลยี วิจัยและนวัตกรรม สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561-2562 ของ ผศ.ดร. พชร อิศรางกูร ณ อยุธยา คณะผู้วิจัยขอขอบคุณบุคลากรคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ผู้เขียนขอขอบพระคุณ ศูนย์เทคนิคการแพทย์และรังสีเทคนิคนานาชาติและบุคลากร ณ ศูนย์การแพทย์กาญจนาภิเษก มหาวิทยาลัยมหิดล รวมถึง ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ให้การสนับสนุนอย่างดียิ่งในทุกๆ ด้านและอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Palermo MS, Exeni RA, Fernández GC. Hemolytic uremic syndrome: pathogenesis and update of interventions. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009; 7: 697-707. doi: 10.1586/eri.09.49.
2. Rosove M. Thrombotic microangiopathies. *Semin Arthritis and Rheumatism* 2014; 43: 797-805.
3. Suwannarat R, Wongsommart D. Survey of *Listeria monocytogenes*, *Salmonellae* and *E.coli* O157:H7 contamination in raw meats from fresh markets in Bangkok and circumferences. *Bulletin of the Department of Medical Sciences* 2016; 58: 197-207. (in Thai)
4. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Virdi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol* 2015; 6: 791. doi:0.3389/fmicb.2015.00791.
5. Steensels D, Verhaegen J, Lagrou K. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of bacteria and yeasts in a clinical microbiological laboratory. *Acta Clin Belg* 2011; 66: 267-73.
6. Pineda FJ, Antoine MD, Demirev PA, *et al.* Microorganism identification by matrix-assisted laser/desorption ionization mass spectrometry and model-derived ribosomal protein biomarkers. *Anal Chem* 2003; 75: 3817-22.

7. Niyompanich S, Srisanga K, Jaresitthikunchai J, Roytrakul S, Tungpradabkul S. Utilization of whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry to differentiate *Burkholderia pseudomallei* wild-type and constructed mutants. PloS one 2015; 10: e0144128. doi.org/10.1371/journal.pone.0144128
8. Stohs SJ, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. Free Radic Biol Med 1995; 18: 321-36.
9. Mitra RS, Bernstein IA. Single-strand breakage in DNA of *Escherichia coli* exposed to Cd^{2+} . J Bacteriol 1978; 133: 75-80.
10. Mitra RS. Protein synthesis in *Escherichia coli* during recovery from exposure to low levels of Cd^{2+} . Appl Environ Microbiol 1984; 47: 1012-6.
11. Wang A, Crowley DE. Global gene expression responses to cadmium toxicity in *Escherichia coli*. J Bacteriol 2005; 187: 3259-66.
12. Isarankura-Na-Ayudhya P, Isarankura-Na-Ayudhya C, Treeratanapaiboon L, Kasikun K, Thipkeaw K, Prachayasittikul V. Proteomic profiling of *Escherichia coli* in response to heavy metals stress. Eur J Sci Res 2009; 25: 679-88.
13. Ferianc P, Farewell A, Nyström T. The cadmium-stress stimulation of *Escherichia coli* K-12. J Microbiol 1998; 144: 1045-50.
14. Preveral S, Gayet L, Moldes C, et al. A common highly conserved cadmium detoxification mechanism from bacteria to humans. J Biol Chem 2009; 284: 4936-43.
15. Worden CR, Kovac WK, Dorn LA, Sandrin TR. Environmental pH affects transcriptional responses to cadmium toxicity in *Escherichia coli* K-12(MG1655). FEMS Microbiol Lett 2009; 293: 58-64.
16. Chudobova D, Dostalova S, Ruttkay-Nedecky B, et al. The effect of metal ions on *Staphylococcus aureus* revealed by biochemical and mass spectrometric analyses. Microbiol Res 2015; 170: 147-56. doi: 10.1016/j.micres.2014.08.003.
17. Thongra-ar W, Musika C, Wongsudawan W, Munhapon A. Health risk assessment of heavy metals via consumption of seafood from coastal area of Map Ta Phut industrial estate, Rayong province. Institute of Marine Science, Burapha University. 1999; 19: 312-27. (in Thai)
18. Chunhabundit R. Cadmium Exposure and Potential Health Risk from Foods in Contaminated Area, Thailand. Toxicol Res 2016; 32: 65-72.
19. Nookabkaew S, Rangkadilok N, Akib CA, Tuntiwigit N, Saehun J, Satayavivad J. Evaluation of trace elements in selected foods and dietary intake by young children in Thailand. Food Addit Contam Part B Surveill 2013; 6: 55-67.

20. Chuanboon K, Na Nakorn P, Pannengetch S, *et al.* Proteomics and bioinformatics analysis reveal potential roles of cadmium-binding proteins in cadmium tolerance and accumulation of *Enterobacter cloacae*. Peer J 2019; 7: e6904.
21. Schulthess B, Bloemberg GV, Zbinden R, Böttger EC, Hombach M. Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper for identification of Gram-positive rods: development of a diagnostic algorithm for the clinical laboratory. J Clin Microbiol 2014; 52: 1089-97.
22. Boonrod P. Effective of MALDI-TOF MS for Gram Positive Cocci Bacteria Identification 2017; 42: 124-8.
23. Scott JS, Sterling SA, To H, Seals SR, Jones AE. Diagnostic performance of matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry in blood bacterial infections: a systematic review and meta-analysis. Infect Dis (Lond). 2016; 48: 530-6. doi: 10.3109/23744235. 2016.
24. Davies P, Hollingworth W, Stoddart M, MacGowan A. Systematic reviews of matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry compared to routine microbiological methods for the time taken to identify microbial organisms from positive blood cultures. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2015; 34: 863-76.
25. Suarez S, Ferroni A, Lotz A, *et al.* Ribosomal proteins as biomarkers for bacterial identification by mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. Microbiol Meth 2013; 94: 390-6.
26. Jolley KA, Bliss CM, Bennett JS, *et al.* Ribosomal multilocus sequence typing: universal characterization of bacteria from domain to strain. Microbiology 2012; 158: 1005-15.
27. Goldstein JE, Zhang L, Borrer CM, Rago JV, Sandrin TR. Culture conditions and sample preparation methods affect spectrum quality and reproducibility during profiling of *Staphylococcus aureus* with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Lett Appl Microbiol 2013; 57: 144-150.
28. Schulthess B, Bloemberg GV, Zbinden R, Böttger EC, Hombach M. Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper for identification of Gram-positive rods: development of a diagnostic algorithm for the clinical laboratory. J Clin Microbiol 2014; 52: 1089-97. doi: 10.1128/JCM. 02399-13.

29. Theel ES, Schmitt BH, Hall L, *et al.* Formic acid-based direct, on-plate testing of yeast and *Corynebacterium* species by Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 3093-5. doi:10.1128/JCM.01045-12.
30. Forty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Evaluation of certain food additives and contaminants. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1993; 837: 1-53.
31. Kitahara K, Suzuki T. The ordered transcription of RNA domains is not essential for ribosome biogenesis in *Escherichia coli*. *Mol Cell* 2009; 26; 34: 760-6. doi: 10.1016/j.molcel.2009.05.014.
32. Wilcox SK, Cavey GS, Pearson JD. Single ribosomal protein mutations in antibiotic-resistant bacteria analyzed by mass spectrometry. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 3046-55.
33. Dzionara M, Kaltschmidt E, Wittmann HG. Ribosomal proteins. Molecular weights of isolated ribosomal proteins of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1970; 67: 1909-13.
34. Arnold RJ, Reilly JP. Observation of *Escherichia coli* ribosomal proteins and their posttranslational modifications by mass spectrometry. *Anal Biochem* 1999; 10,269: 105-12.

Evaluation of Blood Chemistry Stability Using Vacuum Blood Collection Tube

Ornanong Patsri*, Nopparat Keawhanam, Kesorn Butruang and Supasiri Sutthisom

Clinical Chemistry and Immunology Laboratory, Department of Medical Technology, Prasart Neurological Institute, Bangkok, Thailand

Abstract

The storage process and the time spent in transporting the specimens to the laboratory have resulted in inaccurate values. The purpose of this study was to determine the stability of glucose, BUN (blood urea nitrogen), creatinine, aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) in various blood collection tubes, including Gel & Clot, Clot Activator, Heparin, Sodium Fluoride (NaF) and Gel & Heparin. Blood samples were collected from 90 volunteers and centrifuged for measuring chemicals at time 0, 1, 2, 4, 8, 24, 48, and 72 hours. The data were compared with immediately measured values at 0 hours, allowable total error (TEa) and the significant change limits (SCL) range. The results showed that the stability of glucose in the NaF tube at 72 hours was not different from those of the immediately measured samples ($p = 0.270$), and the values did not exceed SCL. The stability in Gel & Clot, Clot Activator, and Heparin tubes was 24, 4, and 4 hours ($p = 0.015$, 0.001 and 0.004 , respectively) and the results were in SCL within 48, 4, and 4 hours, respectively. The stability in Gel & Heparin tube of BUN, creatinine and ALT at 48 hours did not exceed SCL and were not different from those of the immediately measured samples ($p = 0.067$, 0.161 , and 1.000 , respectively). ALT was in SCL but different from those of the immediately measured samples at 24 hours ($p < 0.001$).

Keywords : Stability, Biochemical, Blood collection tube

*Corresponding author E-mail address: mu_mt_ning@hotmail.com

Received: 24 November 2019

Revised: 6 January 2020

Accepted: 24 February 2020

การศึกษาความคงทนของผลตรวจวิเคราะห์สารชีวเคมีในเลือด โดยใช้หลอดเก็บเลือดสุญญากาศ

อรอนงค์ พัดศรี* นพรัตน์ แก้วหานาม เกษร บุตรเรือง และ ศุภิสริ สุทธิสม

งานเคมีคลินิกและภูมิคุ้มกันวิทยา กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ สถาบันประสาทวิทยา กรุงเทพมหานคร

บทคัดย่อ

กระบวนการเก็บรักษาและระยะเวลาที่ใช้ในการขนส่งส่งตรวจมายังห้องปฏิบัติการ มีผลทำให้การวิเคราะห์มีความคลาดเคลื่อนได้ อีกทั้งยังไม่มีข้อกำหนดของหน่วยงานเกี่ยวกับระยะเวลาในการขนส่งตรวจการทดสอบเพิ่ม โดยใช้ตัวอย่างเลือดเดิม การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความคงทนของการตรวจวิเคราะห์ glucose, BUN (blood urea nitrogen), creatinine, aspartate aminotransferase (AST) และ alanine aminotransferase (ALT) ในหลอดชนิดต่าง ๆ ได้แก่ Gel & Clot, Clot Activator, Heparin, Sodium Fluoride (NaF) และ Gel & Heparin โดยใช้ตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัคร 90 ราย นำมาปั่นตกและตรวจวัดสารเคมี ที่เวลา 0, 1, 2, 4, 8, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง นำผลการตรวจวัดที่ได้เทียบกับการผลตรวจวัดทันที เทียบกับ allowable total error (TEa) และช่วงเกณฑ์การยอมรับทางคลินิก (significant change limit; SCL) ผลการศึกษาพบว่า การทดสอบ glucose ในหลอดชนิด NaF ที่เวลา 72 ชั่วโมง ค่าไม่แตกต่างจากค่าหลังตรวจวัดทันที ($p=0.270$) และค่าทั้งหมดอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับทางคลินิก สำหรับหลอดชนิด Gel & Clot, Clot Activator และ Heparin ให้ค่าแตกต่างจากค่าที่ตรวจวัดทันทีอย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่เวลา 24, 4 และ 4 ชั่วโมง ($p = 0.015, 0.001$ และ 0.004 ตามลำดับ) โดยค่ายังอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับทางคลินิก ภายใน 48, 4 และ 4 ชั่วโมงตามลำดับ ส่วนการทดสอบในหลอดชนิด Gel & Heparin โดยไม่แยกซีรัมหรือพลาสมาในการทดสอบ BUN, creatinine และ ALT ที่เวลา 48 ชั่วโมง ค่าอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับทางคลินิก และไม่แตกต่างจากค่าที่ได้หลังตรวจวิเคราะห์ทันที ($p = 0.067, 0.161$ และ 1.000 ตามลำดับ) สำหรับการตรวจวิเคราะห์ ALT พบว่ามีค่าอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับทางคลินิก แต่ค่าแตกต่างจากค่าที่ตรวจวัดทันทีอย่างมีนัยสำคัญที่เวลา 24 ชั่วโมง ($p < 0.001$)

คำสำคัญ: ความคงทน สารชีวเคมี หลอดเก็บเลือด

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: mu_mt_ning@hotmail.com

บทนำ

ปัจจุบันการส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ มีทั้งการส่งตรวจภายในโรงพยาบาล การตรวจสุขภาพจากหน่วยตรวจสุขภาพเคลื่อนที่ หรือการส่งจากหน่วยย่อยมายังศูนย์ห้องปฏิบัติการกลาง โดยกระบวนการเก็บรักษาและระยะเวลาที่ใช้ในการขนส่งส่งตรวจมายังห้องปฏิบัติการอาจมีผลทำให้ผลการวิเคราะห์มีค่าคลาดเคลื่อนหรือแตกต่างกัน จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับสารเคมีในเลือดที่มีผู้ศึกษาไว้พบว่า การเปลี่ยนแปลงของสารเคมีในเวลาต่างๆ กันของแต่ละการทดสอบ มีการเปลี่ยนแปลงไม่เท่ากัน โดย glucose จะมีระดับลดลงภายใน 1 ชั่วโมง ในหลอดเลือดชนิด clotted blood แต่ในหลอดเลือดชนิด Gel & Clot จะมีความคงทนของระดับ glucose, total bilirubin, blood urea nitrogen (BUN) และ uric acid เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นานถึง 1 สัปดาห์ แต่ aspartate aminotransferase (AST) จะมีระดับสูงขึ้นใน 48 ชั่วโมง⁽¹⁾ การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับสารเคมีในซีรัม ได้แก่ glucose, BUN, creatinine, sodium (Na^+), potassium (K^+), chloride (Cl^-) และ total CO_2 (TCO_2) หลังจากปั่นแยกเม็ดเลือดกับน้ำเหลืองและตั้งหลอดเก็บเลือดไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) นาน 7 ชั่วโมง โดยตรวจวัดสารเคมีทันทีภายในเวลาไม่เกิน 30 นาที แล้วตั้งหลอดเก็บเลือดไว้ที่อุณหภูมิห้อง และนำมาตรวจ เมื่อเวลาครบ 1, 3, 5 และ 7 ชั่วโมง พบว่า ค่าเฉลี่ยของระดับ BUN และ creatinine ในซีรัมหลังตั้งไว้ 7 ชั่วโมงไม่แตกต่างจากค่าที่ตรวจวัดทันที ค่าเฉลี่ยระดับ K^+ ที่ตั้งไว้ 1 ชั่วโมงไม่แตกต่างจากค่าที่ตรวจวัดทันที ส่วนค่าเฉลี่ยระดับ glucose, Na^+ , Cl^- และ TCO_2 ที่ตั้งไว้ 1 ชั่วโมงมีค่าแตกต่างจากค่าที่ตรวจวัดทันทีอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)⁽²⁾ และจากการศึกษาที่ผ่านมาของระดับ glucose ในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด NaF

โดยแยกเก็บพลาสมาแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องพบว่าสามารถรักษาระดับความคงทนได้นานถึง 72 ชั่วโมง⁽³⁾ นอกจากนี้ปัจจุบันยังมีบริการเจาะเลือดจากโรงพยาบาลชุมชน เพื่อลดความแออัดภายในโรงพยาบาลและเพื่ออำนวยความสะดวกให้แก่ประชาชน ซึ่งต้องใช้ระยะเวลาในการขนส่งมายังโรงพยาบาล การแยกเก็บพลาสมาหรือซีรัมออกจากเม็ดเลือดแดงแล้วเก็บไว้ในตู้เย็นจะทำให้สามารถทำการทดสอบได้เกือบทุกรายการภายใน 7 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส⁽⁴⁾ แต่งานเคมีคลินิกและภูมิคุ้มกันวิทยา กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ สถาบันประสาทวิทยา ไม่ได้ปั่นเก็บซีรัมเนื่องจากมีปริมาณงานมาก โดยปัจจุบันหน่วยงานได้เก็บหลอดเลือดที่ทดสอบเสร็จแล้วทั้งหมดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง และเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน (48 ชั่วโมง) เพื่อการทวนสอบกรณีมีความผิดพลาดเกิดขึ้น การทดสอบที่แพทย์นิยมส่งตรวจเพิ่มได้แก่ glucose, BUN, creatinine, AST และ ALT

จากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการเจาะเก็บเลือดและตรวจวิเคราะห์ทันที (freshly drawn serum) จะทำให้ได้ค่าผลการตรวจวิเคราะห์ที่ใกล้เคียงกับผู้ป่วยมากที่สุด ซึ่งในกรณีที่ต้องตรวจวิเคราะห์ล่าช้าออกไป หรือมีการขอเพิ่มรายการทดสอบในภายหลัง ก็จะมีผลทำให้ค่าการตรวจวิเคราะห์ผิดไปจากความเป็นจริงได้ และปัจจุบันหลอดที่ใช้ในการบรรจุเลือดมีหลายชนิดด้วยกัน ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาค่าความคงทนของผลการตรวจวิเคราะห์ glucose, BUN, creatinine, AST และ ALT ในเลือดโดยใช้หลอดเก็บเลือดสุญญากาศชนิดต่างๆ ได้แก่ Clot Activator, Gel & Clot, Heparin Sodium Fluoride (NaF) และ Gel & Heparin เพื่อนำไปใช้เป็นเกณฑ์ในการเก็บรักษา และขนส่งส่งตรวจมายังห้องปฏิบัติการ ตลอดจนเกณฑ์

ระยะเวลาที่สามารถเพิ่มการทดสอบในหลอดเลือดแต่ละชนิดเพื่อเพิ่มความสะดวกในการเพิ่มการทดสอบและเพื่อให้ได้รับผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องแม่นยำ

วิธีการศึกษา

1. ประชากรที่ศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้เป็นเลือดที่เจาะจากอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี เพศชายและหญิง อายุ 20 - 60 ปี สามารถอ่านออกเขียนได้ และยินดีเข้าร่วมโครงการโดยสมัครใจ จำนวน 90 ราย โดยคำนวณขนาดตัวอย่างจากความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่าง 2 กลุ่ม (detecting the difference between 2 population means) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ power of test 80% เจาะเก็บเลือดจากหลอดเลือดดำ (venous blood) โดยเจาะเก็บเลือดในหลอดสุญญากาศ IMPROVACUTER® ชนิด Clot Activator, Gel & Clot, Heparin, Gel & Heparin และ NaF ตามลำดับ การศึกษานี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการวิจัยและจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์สถาบันประสาทวิทยา หมายเลขโครงการ 62002

2. ขั้นตอนการทดสอบ

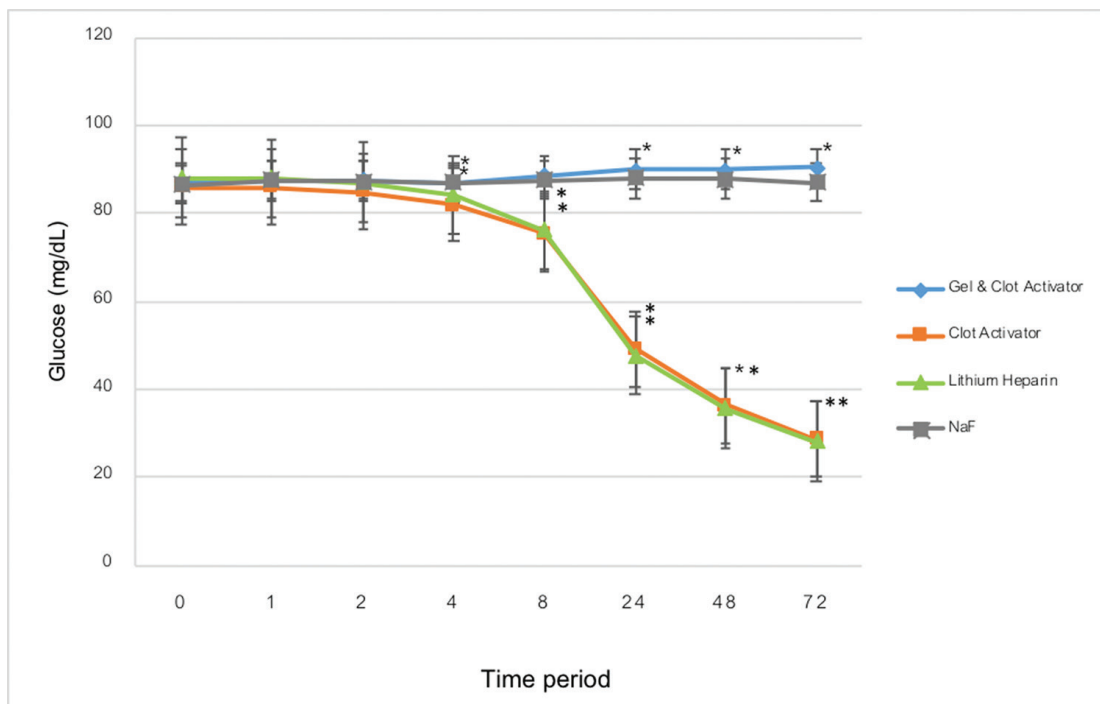
ตัวอย่างเลือดที่เจาะเก็บด้วยหลอดสุญญากาศชนิด Clot Activator, Gel & Clot และ Gel & Heparin จะตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที ก่อนปั่นตกด้วยเครื่องปั่นตกตะกอน (centrifuge) โดยหลอดชนิด Gel & Clot และ Gel & Heparin นำมาปั่นที่ความเร็ว 2,000 g เป็นเวลา 10 นาที และสำหรับตัวอย่างเลือดที่เจาะเก็บด้วยหลอดสุญญากาศชนิด Clot Activator, Heparin และ NaF นำมาปั่นตกที่ความเร็ว 1,800 g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปตรวจวิเคราะห์ ด้วยเครื่องอัตโนมัติ Unicel Dx C 800 Synchron Clinical System ของบริษัท Beckman Coulter, USA จัดจำหน่ายโดย

บริษัท PCL Holding ในห้องปฏิบัติการงานเคมีคลินิกและภูมิคุ้มกันวิทยา กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ สถาบันประสาทวิทยา โดยควบคุมคุณภาพการตรวจวัดด้วยสารควบคุมคุณภาพ (control material) ทุกครั้งก่อนตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง

ตรวจค่า glucose ในหลอดสุญญากาศชนิด Gel & Clot, Clot Activator, Heparin และ NaF ที่เวลา 0, 1, 2, 4 และ 8 ชั่วโมง จากนั้นเก็บหลอดเลือดไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส และตรวจที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ สำหรับการทดสอบค่า BUN, creatinine, AST และ ALT ในหลอดสุญญากาศชนิด Gel & Heparin ที่เวลา 0, 2, 4 และ 8 ชั่วโมง จากนั้นเก็บหลอดเลือดไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส และตรวจที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS 18.0 for Windows (ลิขสิทธิ์ SPSS Inc. & IBM) โดยข้อมูลทั่วไปวิเคราะห์โดยใช้สถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ ร้อยละ ค่าเฉลี่ย และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และเปรียบเทียบค่าผลการตรวจที่ได้ในเวลาต่างๆ กับค่าที่ตรวจวัดทันที (เวลาที่ 0) โดยใช้สถิติ paired t-test เปรียบเทียบค่าผลการตรวจที่วัดทันทีที่ 0 ชั่วโมง กับที่เวลาต่างๆ คือ 1, 2, 4, 8, 24, 48 และ 72 ชั่วโมงหลังจากเจาะเลือด โดยค่าความแตกต่างไม่เกิน allowable total error (TEa)⁽⁵⁾ และไม่เกินเกณฑ์การยอมรับทางคลินิก (significant change limit; SCL) คือค่าเฉลี่ยที่ 0 ชั่วโมง ± 3 USD⁽⁶⁾ (usual standard deviation) ซึ่งได้มาจากค่า standard deviation (SD) ของสารควบคุมคุณภาพ ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเคมีคลินิกและภูมิคุ้มกันวิทยา สถาบันประสาทวิทยา ในระยะ 3 เดือน



* indicates that the mean value is significantly changed with $p < 0.05$

**USD of glucose = 1.0 and SCL range = mean at 0 hours $\pm$ 3.0

Fig.1 Changes of glucose levels (mg/dL) at various times in 4 types of blood collection tube

ผลการศึกษา

ผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครจำนวน 90 ราย โดยเปรียบเทียบค่าผลตรวจวัดทันทีที่ 0 ชั่วโมง กับที่เวลาต่างๆ ของการทดสอบพบว่าระดับ glucose ค่อยๆ ลดลง (Fig. 1) โดยเฉพาะในหลอดชนิด Clot Activator และ Heparin มีค่าลดลงแตกต่างจากค่าที่ตรวจวัดทันทีอย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 และอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับทางคลินิก ภายใน 4 ชั่วโมง ส่วนในหลอดสุญญากาศชนิด Gel & Clot มีความแตกต่างจากค่าที่ตรวจวัดทันทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในชั่วโมงที่ 24 แต่ยังอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับทางคลินิก ภายใน 48 ชั่วโมงและในหลอดชนิด NaF

ไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับทางคลินิก ตลอดการทดสอบที่เวลา 72 ชั่วโมง (Table 1)

เมื่อเขียนกราฟค่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงจากเวลาที่ 0 ชั่วโมง ที่เวลาต่างๆ กับค่าความแตกต่าง allowable total error (TEa) พบว่าการทดสอบ glucose ในหลอดชนิด Gel & Clot มีค่าไม่เกิน TEa (10%) ภายใน 48 ชั่วโมง สำหรับชั่วโมงที่ 72 มีค่าเกิน TEa 1 ราย (ร้อยละ 1.11) (Fig. 2) ในหลอดเลือดชนิด Clot Activator มีค่าไม่เกิน TEa ภายใน 2 ชั่วโมง สำหรับชั่วโมงที่ 4 มีค่าเกิน TEa 2 ราย (ร้อยละ 2.22) (Fig. 3) ในหลอดเลือดชนิด Heparin มีค่าไม่เกิน TEa ภายใน 2 ชั่วโมง สำหรับชั่วโมงที่ 4

Table 1 The comparison of the results at various times of glucose levels (mg/dL) in 4 types of blood collection tube

Time period	Gel & Clot Activator	P	Clot Activator	P	Lithium Heparin	P	NaF	P
0	87.11 ± 7.89	-	86.04 ± 7.67	-	88.16 ± 8.80	-	86.46 ± 9.68	-
1	87.59 ± 8.04	0.688	86.00 ± 7.82	0.969	88.02 ± 8.75	0.919	87.47 ± 7.25	0.429
2	87.52 ± 7.98	0.728	84.92 ± 7.79	0.332	87.10 ± 9.03	0.428	87.36 ± 7.45	0.487
4	86.83 ± 11.60	0.606	82.04 ± 7.83 ^a	0.001*	84.28 ± 9.03 ^a	0.004*	87.13 ± 7.43	0.599
8	88.71 ± 8.01	0.179	75.43 ± 8.09 ^a	<0.001*	76.22 ± 9.27 ^a	<0.001*	87.58 ± 7.18	0.378
24	90.04 ± 8.18	0.015*	49.28 ± 8.50 ^a	<0.001*	47.73 ± 9.31 ^a	<0.001*	87.99 ± 7.60	0.239
48	90.02 ± 8.11	0.016*	36.22 ± 9.28 ^a	<0.001*	35.61 ± 8.11 ^a	<0.001*	87.90 ± 7.43	0.263
72	90.40 ± 8.34 ^a	0.007*	28.61 ± 9.29 ^a	<0.001*	28.06 ± 7.33 ^a	<0.001*	87.13 ± 8.79	0.270

* indicates that the mean value is significantly changed with p < 0.05

^a indicates that the value is over SCL (significant change limit)

มีค่าเกิน TEa 4 ราย (ร้อยละ 4.44) (Fig. 4) และ
ในหลอดเลือดชนิด NaF มีค่าไม่เกิน TEa ภายใน 72
ชั่วโมงที่ทำการศึกษา (Fig. 5)

การทดสอบ BUN, creatinine, AST และ
ALT ในหลอดสุญญากาศชนิด Gel & Heparin
เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับค่าผลตรวจวัดทันทีที่ 0 ชั่วโมง

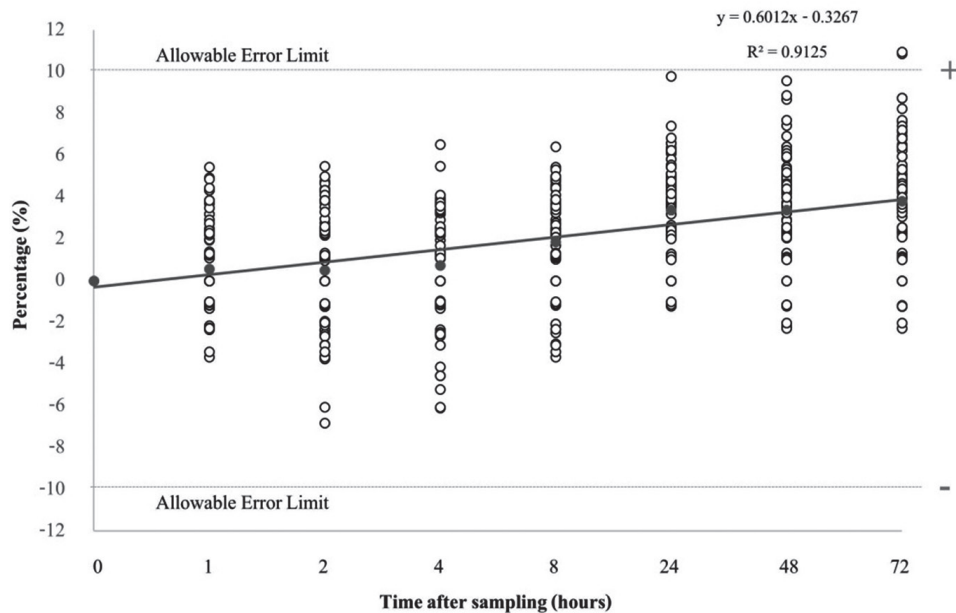


Fig. 2 Changes in glucose values in Gel & Clot tube after sampling at various times

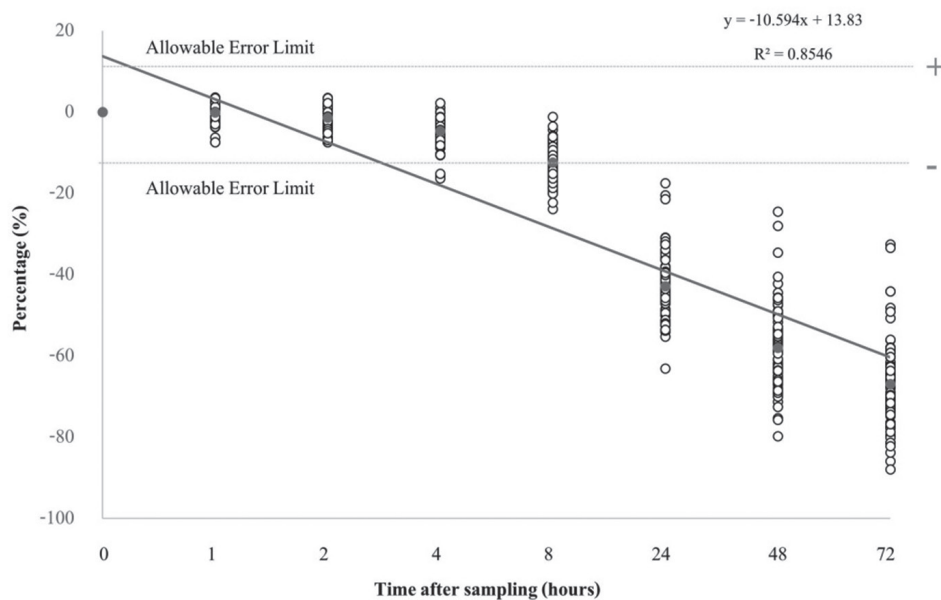


Fig. 3 Changes in glucose values in Clot Activator tube after sampling at various times

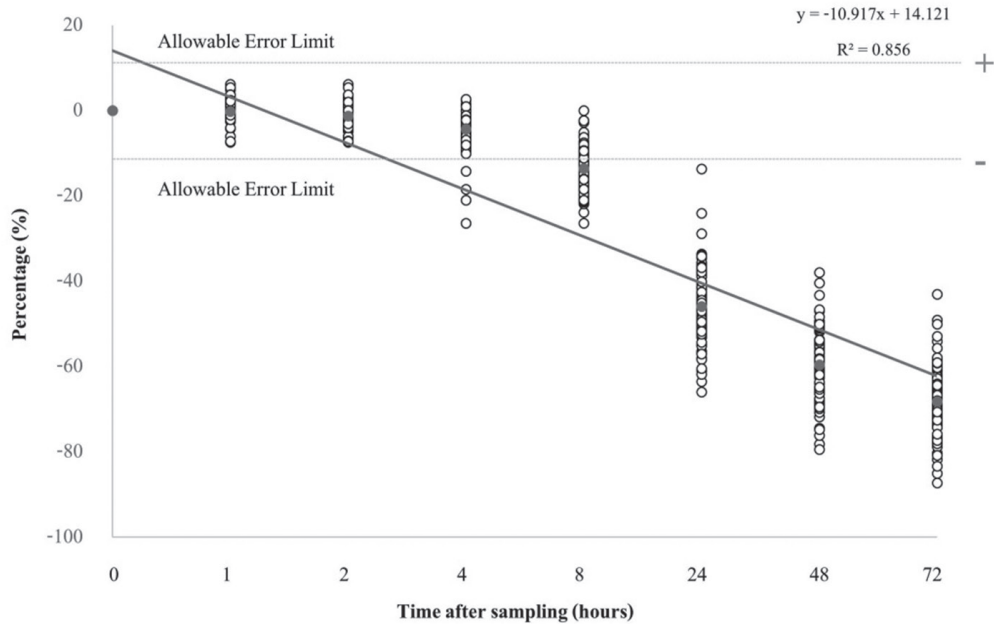


Fig. 4 Changes in glucose values in Heparin tube after sampling at various times

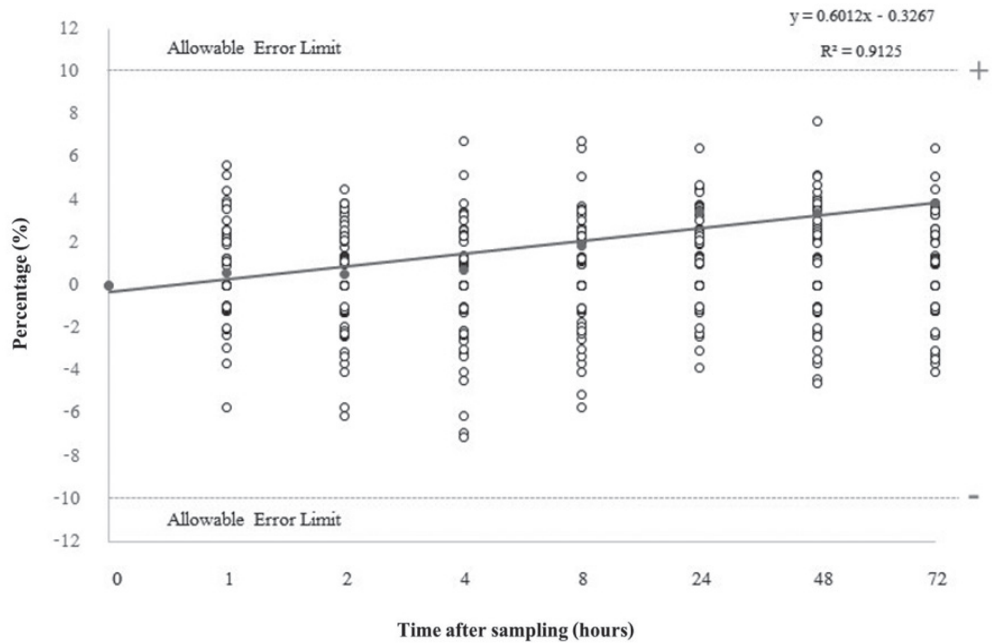


Fig. 5 Changes in glucose values in NaF tube after sampling at various times

กับที่เวลาต่างๆ คือ 1, 2, 4, 8, 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าการทดสอบ AST มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในชั่วโมงที่ 24 ส่วนการทดสอบ BUN, creatinine และ ALT ไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตลอดการทดสอบที่เวลา 48 ชั่วโมง (Table 2)

เมื่อเขียนกราฟค่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงจากเวลาที่ 0 ชั่วโมง กับที่เวลาต่างๆ เกี่ยวกับค่าความแตกต่าง TEa ของการทดสอบในหลอดชนิด Gel & Heparin พบว่า

การทดสอบ BUN มีค่าเกิน TEa ใน 2 ชั่วโมง จำนวน 4 ราย (ร้อยละ 4.44) ชั่วโมงที่ 4 มีค่าเกิน TEa 6 ราย (ร้อยละ 6.66) ชั่วโมงที่ 8 มีค่าเกิน TEa 5 ราย (ร้อยละ 5.55) ชั่วโมงที่ 24 และ 48 มีค่าเกิน TEa 3 ราย (ร้อยละ 3.33) (Fig. 6) แต่ค่าการทดสอบตลอดทั้ง 48 ชั่วโมง พบว่าอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับทางคลินิกทั้งหมด (Table 3)

การทดสอบ creatinine มีค่าไม่เกิน TEa ในชั่วโมงที่ 2, 4, 24 และ 48 สำหรับชั่วโมงที่ 8 มีค่าเกิน TEa 1 ราย (ร้อยละ 1.11) (Fig. 7) และค่าการทดสอบตลอดทั้ง 48 ชั่วโมง พบว่าอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับทางคลินิกทั้งหมด (Table 3)

การทดสอบ AST มีค่าไม่เกิน TEa ภายใน 8 ชั่วโมง สำหรับชั่วโมงที่ 24 และ 48 มีค่าเกิน TEa 7 ราย (ร้อยละ 7.77) (Fig. 8) แต่ค่าการทดสอบอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับทางคลินิกทั้งหมดภายใน 8 ชั่วโมง (Table 3)

สำหรับการทดสอบ ALT มีค่าไม่เกิน TEa และอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับทางคลินิก ภายใน 48 ชั่วโมงที่ทำการศึกษา (Fig. 9) (Table 3)

วิจารณ์และสรุป

จากการศึกษาความคงทนของผลตรวจ

วิเคราะห์ glucose, BUN, creatinine, AST และ ALT ในเลือดหลังปั่นแยกชั้นเม็ดเลือด โดยใช้หลอดเก็บเลือดสุญญากาศชนิด IMPROVACUTER พบว่า

1. การทดสอบ Glucose

ในหลอดสุญญากาศชนิด Gel & Clot มีค่าความคงทนของผลตรวจวิเคราะห์ดี โดยสามารถรักษาระดับ glucose ได้นาน 48 ชั่วโมง เนื่องจากหลอดชนิดนี้จะมี gel กั้นระหว่างเม็ดเลือดและซีรัม ทำให้ไม่เกิดกระบวนการใช้ glucose ของเซลล์ (glycolysis) แต่ค่าที่ตรวจได้ในหลอดสุญญากาศชนิด Gel & Clot มีแนวโน้มสูงขึ้น ซึ่งมีสาเหตุมาจากการวางหลอดเลือดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องโดยไม่ปิดฝาจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าอุณหภูมิ และระยะเวลา ก่อนการปั่นแยกเลือดมีผลทำให้ค่าการทดสอบเพิ่มสูงขึ้น⁽⁷⁾ แต่ไม่เกินค่า TEa และอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับทางคลินิกภายใน 48 ชั่วโมง ส่วนหลอดชนิด Clot Activator และ Heparin มีการเปลี่ยนแปลงลดลง เนื่องจากไม่มีสารที่ไปยับยั้งการใช้ glucose ซึ่งค่าไม่เกิน TEa และอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับทางคลินิก ภายใน 4 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Boyanton และคณะ⁽⁸⁾ ที่ได้ศึกษาความเปลี่ยนแปลงของค่าการทดสอบในพลาสมาและซีรัม ของหลอดเลือด Vacutainer® ชนิด Serum Separator Tube (SST) และ Heparin ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ที่เวลา 0, 4, 8, 16, 24, 32, 40, 48 และ 56 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบผลกับที่เวลา 0 ชั่วโมง พบว่าค่าอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับทางคลินิก ภายใน 4 ชั่วโมง ในหลอดเลือดทั้ง 2 ชนิด และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Li และคณะ⁽⁹⁾ ที่ได้ศึกษาระดับ glucose ในหลอดเลือด 3 ชนิดได้แก่ Gel & Clot, Heparin และ NaF ในอาสาสมัคร 18 ราย โดยตั้งหลอดเลือดไว้ที่อุณหภูมิห้อง 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และตรวจวัดระดับ

Table 2 The comparison of the results at various times of BUN, creatinine, AST, and ALT in Gel & Heparin tube

Time period	BUN	P	Creatinine	P	AST	P	ALT	P
0	11.91 ± 3.29	-	0.75 ± 0.17	-	21.88 ± 5.05	-	18.16 ± 10.43	-
2	11.97 ± 3.33	0.910	0.76 ± 0.16	0.877	22.13 ± 5.12	0.736	18.11 ± 10.33	0.977
4	11.91 ± 3.42	1.000	0.76 ± 0.17	0.837	22.47 ± 5.07	0.436	18.13 ± 10.45	0.989
8	12.06 ± 3.40	0.772	0.76 ± 0.17	0.683	23.14 ± 5.21	0.099	18.26 ± 10.43	0.949
24	12.67 ± 3.48	0.136	0.78 ± 0.18	0.243	25.08 ± 5.56	<0.001*	18.02 ± 10.32	0.931
48	12.84 ± 3.51	0.067	0.79 ± 0.18	0.161	26.69 ± 5.40	<0.001*	18.16 ± 10.09	1.000

* indicates that the mean value is significantly changed with p < 0.05

Table 3 USD, SCL range and average results after sampling at various times of BUN, creatinine, AST and ALT

Test	Unit	%TEa	Time of analysis (hours)						USD value	SCL range
			0 (SD)	2 (SD)	4 (SD)	8 (SD)	24 (SD)	48 (SD)		
BUN	mg/dL	9%	11.91 ± 3.29	11.97 ± 3.33	11.91 ± 3.42	12.06 ± 3.40	12.67 ± 3.48	12.84 ± 3.51	0.5	10.41 – 13.41
Creatinine	mg/dL	15%	0.75 ± 0.17	0.76 ± 0.16	0.76 ± 0.17	0.76 ± 0.17	0.78 ± 0.18	0.79 ± 0.18	0.022	0.684 – 0.816
AST	U/L	20%	21.88 ± 5.05	22.13 ± 5.12	22.47 ± 5.07	23.14 ± 5.21	25.08 ± 5.56*	26.69 ± 5.40*	1.0	18.88 – 24.88
ALT	U/L	20%	18.16 ± 10.43	18.11 ± 10.33	18.13 ± 10.45	18.26 ± 10.43	18.02 ± 10.32	18.16 ± 10.09	1.0	15.16 – 21.16

* indicates the value over SCL (Significant Change Limit)

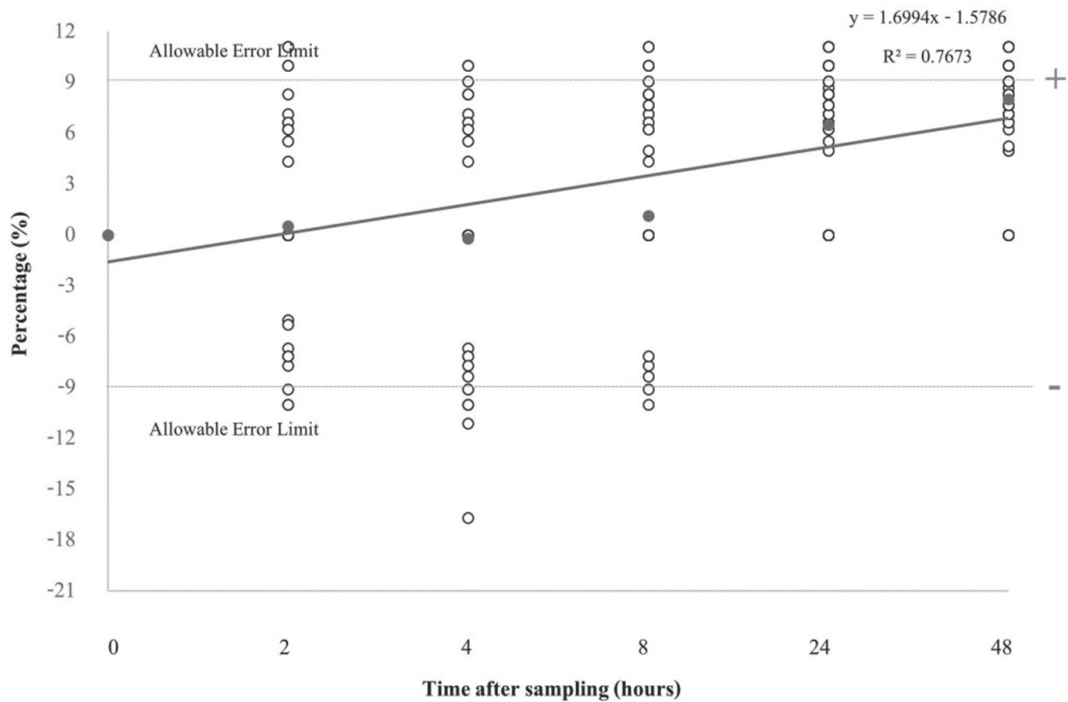


Fig. 6 Changes in BUN values in Gel & Heparin tube after sampling at various times

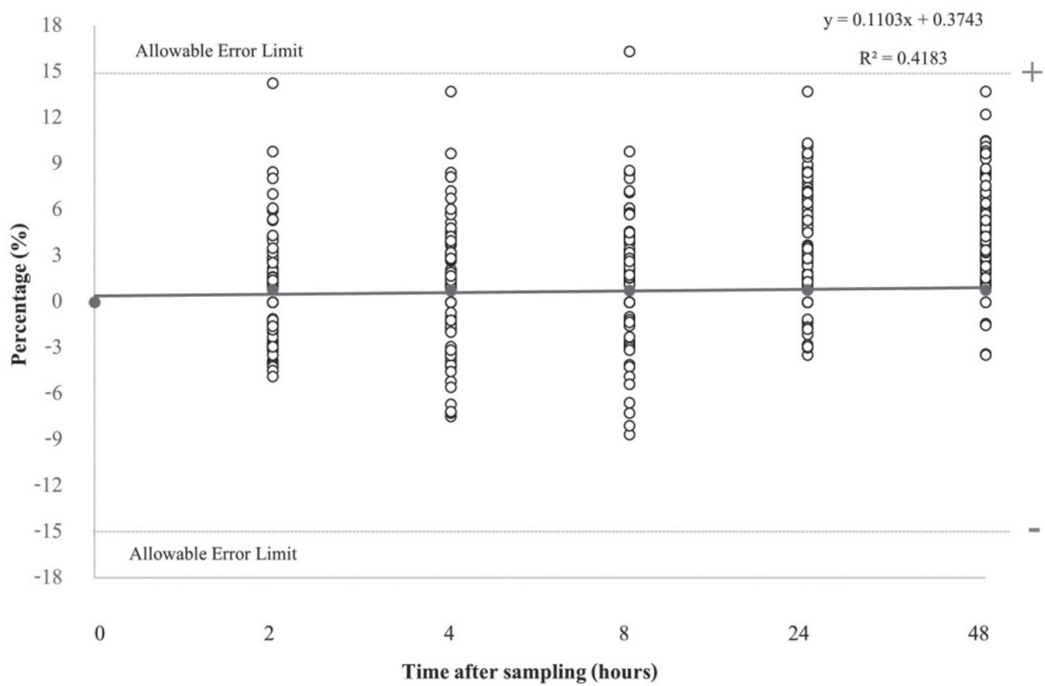


Fig. 7 Changes in creatinine values in Gel & Heparin tube after sampling at various times

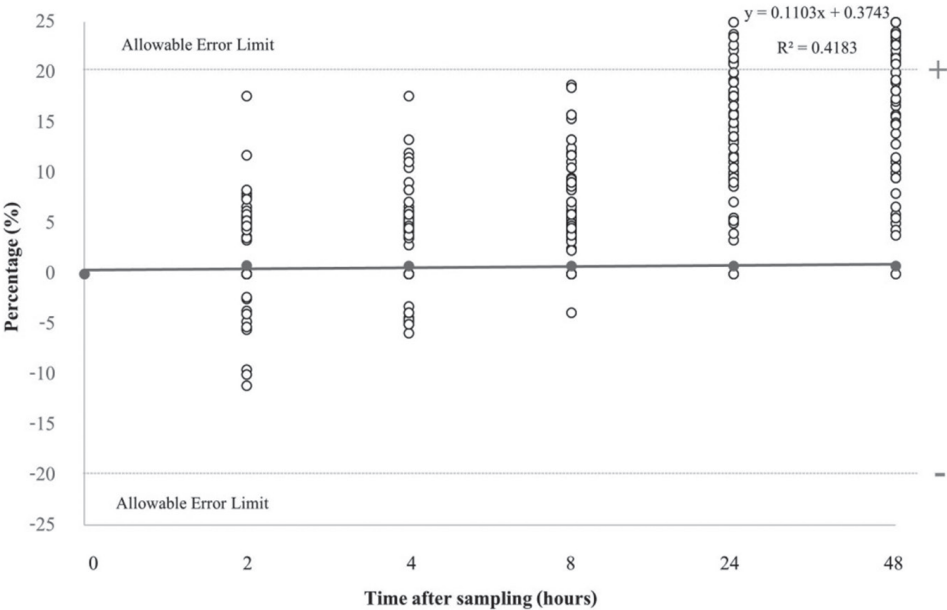


Fig. 8 Changes in AST values in Gel & Heparin tube after sampling at various times

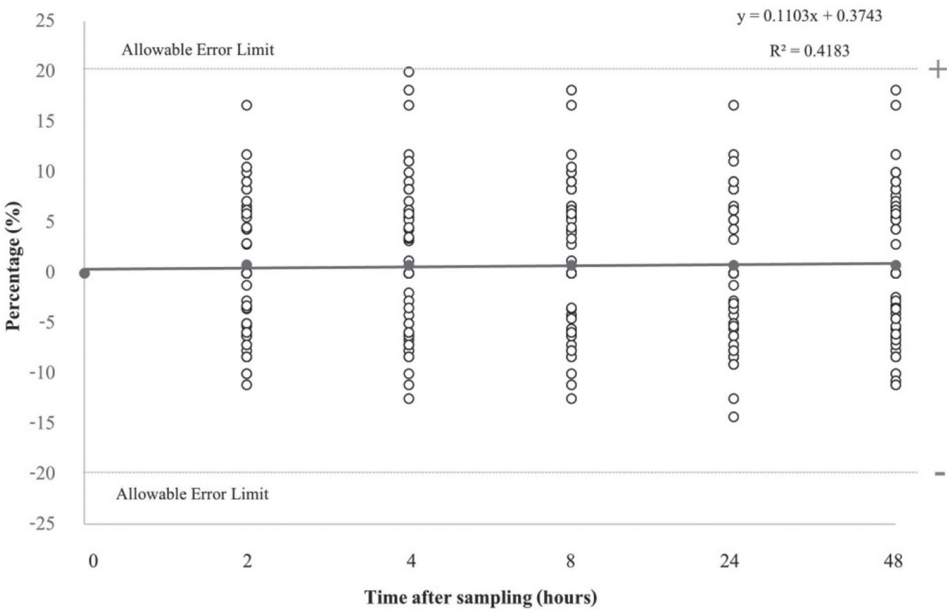


Fig. 9 Changes in ALT values in Gel & Heparin tube after sampling at various times

glucose ที่ 4 ชั่วโมงแรก หลังจากแช่เย็น 6 ชั่วโมง และทดสอบเมื่อครบ 1 วัน จนกระทั่งวันที่ 5 หลังการเก็บเลือด พบว่าระดับ glucose ในหลอด Gel & Clot และ NaF มีค่าความคงทนของระดับ glucose ได้ถึงวันที่ 5 ในขณะที่หลอด Heparin มีค่าลดลงหลังจากชั่วโมงที่ 4 แสดงให้เห็นว่าการตรวจ glucose ในหลอดเลือดชนิด Clot Activator และ Heparin จะต้องตรวจวิเคราะห์ภายใน 2-4 ชั่วโมงหลังการเจาะเลือด เนื่องจากกระบวนการเผาผลาญ glucose จะยังดำเนินอยู่โดยเซลล์เม็ดเลือดแดง ทำให้เกิดกระบวนการ glycolysis ในสิ่งส่งตรวจ ซึ่งจะมีผลทำให้ระดับกลูโคสที่ได้น้อยกว่าความเป็นจริง นอกจากนี้ อุณหภูมิในการเก็บรักษาส่งตรวจก่อนปั่นเหวี่ยงและแยกซีรัมหรือพลาสมาก็มีผลต่อระดับ glucose เช่นกัน โดยถ้าเก็บไว้ในตู้เย็นระดับ glucose จะค่อนข้างเสถียรอยู่ได้เป็นเวลาหลายชั่วโมง⁽¹⁰⁾ สำหรับ การทดสอบในหลอดสุญญากาศชนิด NaF มีค่าความคงทนของผลการตรวจวิเคราะห์ที่ดีที่สุด โดยสามารถรักษาระดับ glucose ให้มีค่าไม่เกิน TEa และอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับทางคลินิก ได้นานมากกว่า 72 ชั่วโมง เนื่องจากหลอดชนิด NaF มีสาร potassium oxalate (KOx) ซึ่งสามารถยับยั้งกระบวนการใช้น้ำตาลของเซลล์ (glycolysis)⁽¹¹⁾ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Steele และคณะ⁽¹²⁾ ที่ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของค่า plasma glucose ในหลอดเลือดชนิด NaF โดยได้ศึกษาทั้งการปั่นแยกในทันที กับตั้งทิ้งไว้โดยไม่ปั่น และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง กับแช่ในน้ำแข็งที่เวลา 0, 2, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าหลอดชนิด NaF สามารถรักษาความคงทนของระดับ glucose ได้มากกว่า 48 ชั่วโมง โดยไม่จำเป็นต้องปั่นแยกเลือดในทันที และไม่จำเป็นต้องแช่ในน้ำแข็งในระหว่างการขนส่ง แสดงให้เห็นว่าหลอดชนิด NaF สามารถรักษาความคงทนของระดับ glucose ได้ดี

กล่าวได้ว่าหลอดเก็บเลือด Clot Activator

และ Heparin สามารถนำมาใช้ แทนหลอดเก็บเลือด NaF ได้ โดยไม่มีผลกระทบต่อระดับ glucose ในเลือด เมื่อทำการตรวจวิเคราะห์ภายใน 4 ชั่วโมง หลังการเจาะเลือด นอกจากนี้หลอดเก็บเลือด Clot Activator และ Heparin ยังสามารถเก็บเลือดเพื่อไปตรวจสารชีวเคมีในรายการอื่นได้อีกด้วย เป็นการประหยัดเวลา และลดต้นทุนของห้องปฏิบัติการได้อีกด้วย

2. การทดสอบ BUN, Creatinine, AST และ ALT ในหลอดสุญญากาศชนิด Gel & Lithium Heparin

การทดสอบ BUN พบว่ามีระดับการเปลี่ยนแปลงค่าเฉลี่ยเพิ่มขึ้น แต่ค่าที่เพิ่มขึ้นไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับค่าหลังตรวจวิเคราะห์ทันที ($p > 0.05$) ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการวางหลอดเลือดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องโดยไม่ปิดฝา ส่งผลให้ค่าสูงขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Oddoze C และคณะ ที่พบว่าระยะเวลา ชนิดของหลอดเลือด อุณหภูมิ และระยะเวลาก่อนการปั่นแยกเลือด มีผลทำให้ค่าการทดสอบเพิ่มสูงขึ้น⁽⁷⁾ โดยมีค่าเกิน TEa เฉลี่ยร้อยละ 3.87 แต่ค่าที่ได้อยู่ในช่วงเกณฑ์ยอมรับทางคลินิก ทั้ง 48 ชั่วโมง การทดสอบ creatinine และ ALT มีค่าไม่เกิน TEa และอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับทางคลินิก ภายใน 48 ชั่วโมง ที่ทำการศึกษา และการทดสอบ AST มีค่าไม่เกิน TEa และอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับทางคลินิก ภายใน 8 ชั่วโมง ซึ่งมีสาเหตุมาจากการหลังของ AST ที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงออกมา ทำให้ค่าสูงขึ้นเล็กน้อย สอดคล้องกับงานวิจัยของ Cuhadar และคณะ⁽¹⁾ ที่ศึกษาความคงทนของการทดสอบในหลอดชนิด Plain tube และ Serum gel separator ที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 24 องศาเซลเซียส ที่เวลา 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าระดับ BUN ที่เก็บในหลอด Plain tube ทั้งที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 24 องศา

เซลเซียส และในหลอด Serum gel separator ที่เก็บที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส มีระดับเปลี่ยนแปลงใน 6 ชั่วโมงแรกของการทดสอบ แต่ในหลอด Serum gel separator ที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าค่าไม่เปลี่ยนแปลงภายใน 30 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhang และคณะ⁽¹³⁾ ที่ได้ศึกษาความเปลี่ยนแปลงของสารเคมีที่เวลา 0.5, 3, 6, 24 ชั่วโมง พบว่าค่า creatinine, AST และ ALT ไม่เปลี่ยนแปลงใน 48 ชั่วโมงของการศึกษา ซึ่งค่า AST ที่ไม่สอดคล้องกันกับงานวิจัยครั้งนี้ อาจเนื่องมาจากการศึกษาของ Zhang และคณะ ใช้เลือดที่ได้ปั่นแยกซีรัมและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาทดสอบ ในขณะที่งานวิจัยครั้งนี้ไม่ได้แยกพลาสมาออกจากเม็ดเลือดแดง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการทดสอบ AST หากไม่ได้แยกซีรัมหรือพลาสมาออกจากเม็ดเลือดแดงและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะต้องตรวจวิเคราะห์ภายใน 8 ชั่วโมงหลังการเจาะเลือด ในขณะที่การทดสอบ BUN, creatinine และ ALT สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ภายใน 48 ชั่วโมงหลังการเจาะเลือด โดยไม่จำเป็นต้องแยกซีรัมหรือพลาสมา

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่งานเคมีคลินิกและภูมิคุ้มกันวิทยา กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ สถาบันประสาทวิทยา ที่ให้คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างและการทดสอบในครั้งนี้ รวมทั้งขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.นริสา เก่งตรง บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี คณะสหเวชศาสตร์ ม.ธรรมศาสตร์ ที่กรุณาเป็นที่ปรึกษาโครงการวิจัยนี้ และโครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก บริษัท เมดิทอป จำกัด

เอกสารอ้างอิง

1. Cuhadar S, Atay A, Koseoglu M, *et al.* Stability studies of common biochemical analytes in serum separator tubes with or without gel barrier subjected to various storage conditions. *Biochem Med* 2012; 22: 202-14.
2. Choosongsang P, Musigavon P, Wilairat B, *et al.* Changes in Levels of Glucose, BUN, Creatinine, Na⁺, K⁺, Cl⁻ and TCO. *Songklanagarind Med J* 2012; 29: 203-14.
3. Chan A, Swaminathan R, Cockram C. Effectiveness of sodium fluoride as a preservative of glucose in blood. *Clin Chem* 1989; 35: 315-7.
4. Lolekha P. *Applied clinical chemistry*. Bangkok: Chaicharoen; 1990; 18-214.
5. dgrhoads.com [homepage on the Internet]. South Burlington: Allowable Total Error Table Online Resources, Inc.; c2004 [updated 2009 Jul 1; cited 2019 Jan 9]. Available from: <http://www.dgrhoads.com/db2004/ac2004.php>.
6. Passey RB. Quality control for the clinical chemistry laboratory. In: Kaplan LA, Pesce JA, editors. *Clin Chem: theory, analysis, and correlation*. 3rd ed. St. Louis: Mosby; 1996; p. 385-91.
7. Oddoze C, Lombard E, Portugal H. Stability study of 81 analytes in human whole blood, in serum and in plasma. *Clin Biochem* 2012; 45:464-9.

8. Boyanton BL, Blick KE. Stability Studies of Twenty-Four Analytes in Human Plasma and Serum. Clin Chem 2002; 48: 2242-7.
9. Li G, Cabanero M, Wang Z, *et al.* Comparison of glucose determinations on blood samples collected in three types of tubes. Ann Clin Lab Sci 2013; 43: 278-84.
10. Ganapathy UK, Ramachandran N. D, L Glyceraldehyde-Will it be an effective Antiglycolytic Agent? Int J Clin Biochem Res 2016; 3: 449-52.
11. Lippi G, Nybo M, Cadamuro J, *et al.* Blood glucose determination: effect of tube additives. Advances in clinical chemistry. 84: Elsevier; 2018. p. 101-23.
12. Steele A, Wensley K, Brewer E, *et al.* Preanalytical sample handling of venous blood: how to ensure your glucose measurement is accurate and reliable. Practical Diabetes Int 2013; 30: 128-31.
13. Zhang DJ, Elswick R, Miller WG, *et al.* Effect of serum-clot contact time on clinical chemistry laboratory results. Clin Chem. 1998; 44: 1325 - 33.

The Administration according to McKinsey's 7S Framework of Medical Laboratory in the First-level Hospital, Ministry of Public Health in Health Region 11, Thailand

Thaveesak Sai-ong^{1*} Supreecha Kaewsawat¹ and Wiyada Kwanhian²

¹*Master of Public Health Program, School of Public Health, Walailak University
Nakhon Si Thammarat Province, Thailand*

²*Bachelor of Science (Medical Technology) Program, School of Allied Health Science,
Walailak University, Nakhon Si Thammarat Province, Thailand*

Abstract

Laboratory accreditation (LA) is a guarantee of quality and reliability of laboratory result. The purpose of this descriptive research was to study the administration according to McKinsey's 7S framework of medical laboratory and its influences on LA success. The samples consisted of 114 personnel, medical technologists (75.44%) and medical science officers (24.56%), from first-level hospitals under the Ministry of Public Health in health region 11 with Re-LA from the Medical Technology Council of Thailand. The study was conducted by using questionnaire examination and analyzed by descriptive statistics to describe demographic characteristics and administration according to McKinsey's 7S framework. The findings revealed that 64.00 percent of personnel had a high average score of the organizational management and development according to McKinsey's 7S framework ($\bar{x} = 3.95$, S.D. = 0.59). Considering each aspect, the results found that the average quality of organization management in descending score were shared value ($\bar{x} = 4.09$, SD = 0.54), strategy ($\bar{x} = 4.06$, SD = 0.56), structure ($\bar{x} = 4.03$, SD = 0.55), system ($\bar{x} = 3.95$, SD = 0.51), skills ($\bar{x} = 3.89$, SD = 0.58), style ($\bar{x} = 3.84$, SD = 0.82) and staff ($\bar{x} = 3.83$, SD = 0.57). Problems and obstacles suggested by 68.42 percent of the personnel included budget allocation, support and personnel development and inappropriate manpower. Therefore, the organization should attach great importance to all factors of organizational management that have the potential to be useful for the development of an organization.

Keywords: Administration, Laboratory accreditation, Medical technology standard Medical laboratory, McKinsey's 7S framework

*Corresponding author E-mail address: thaveesaksaiongmph@gmail.com

การบริหารจัดการองค์กรตามกรอบแนวคิด McKinsey's 7S ของห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ โรงพยาบาลชุมชน สังกัดกระทรวงสาธารณสุข เขตสุขภาพที่ 11

ทวีศักดิ์ สายอ่อง^{1*} สุปริษา แก้วสวัสดิ์¹ และ วิยดา กวานเทียน²

¹หลักสูตรสาธารณสุขศาสตรมหาบัณฑิต สำนักวิชาสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ จังหวัดนครศรีธรรมราช

²หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) สำนักวิชาสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ จังหวัดนครศรีธรรมราช

บทคัดย่อ

การผ่านการรับรองระบบบริหารคุณภาพของห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ เป็นหลักประกันคุณภาพ และสร้างความน่าเชื่อถือของผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพ การวิจัยเชิงพรรณนาคั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษา การบริหารจัดการองค์กรตามกรอบแนวคิด McKinsey's 7S ของห้องปฏิบัติการ และผลต่อความสำเร็จในการขอรับรองระบบบริหารคุณภาพตามมาตรฐานงานเทคนิคการแพทย์ กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา จำนวน 114 คน ประกอบด้วย นักเทคนิคการแพทย์ ร้อยละ 75.44 และเจ้าพนักงานวิทยาศาสตร์การแพทย์ ร้อยละ 24.56 จากโรงพยาบาลชุมชน 32 แห่ง สังกัดกระทรวงสาธารณสุข เขตสุขภาพที่ 11 ซึ่งผ่านการรับรองระบบบริหารคุณภาพและดำรงรักษาคุณภาพการพัฒนายอย่างต่อเนื่องจากสภาเทคนิคการแพทย์ เก็บรวบรวมข้อมูลโดยใช้แบบสอบถามที่ผู้วิจัยพัฒนาขึ้น และวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) เพื่อบรรยายข้อมูลคุณลักษณะประชากรและระดับคะแนนเฉลี่ยความคิดเห็นต่อการบริหารจัดการองค์กรตามกรอบแนวคิด McKinsey's 7S ผลการวิจัยพบว่า ร้อยละ 64.00 ของบุคลากรมีระดับคะแนนเฉลี่ยความคิดเห็นต่อการบริหารจัดการองค์กรตามกรอบแนวคิด McKinsey's 7S ภาพรวมอยู่ในระดับสูง ($\bar{X} = 3.95$, S.D. = 0.59) เมื่อพิจารณารายด้าน พบว่า คะแนนเฉลี่ยความคิดเห็นต่อการบริหารจัดการองค์กรเรียงจากมากไปน้อย ได้แก่ ด้านค่านิยมร่วมและวัฒนธรรมองค์กร ($\bar{X} = 4.09$, S.D. = 0.54) ด้านความชัดเจนของยุทธศาสตร์ ($\bar{X} = 4.06$, S.D. = 0.56) ด้านความชัดเจนของโครงสร้างองค์กร ($\bar{X} = 4.03$, S.D. = 0.55) ด้านความพร้อมของระบบงาน ($\bar{X} = 3.95$, S.D. = 0.51) ด้านทักษะของบุคลากร ($\bar{X} = 3.89$, S.D. = 0.58) ด้านรูปแบบภาวะผู้นำ ($\bar{X} = 3.84$, S.D. = 0.82) และด้านบุคลากร ($\bar{X} = 3.83$, S.D. = 0.57) ส่วนปัญหาอุปสรรคต่อการบริหารจัดการองค์กรพบว่ากลุ่มตัวอย่างร้อยละ 68.42 เห็นว่าควรให้มีการจัดสรรงบประมาณสนับสนุนและมีการพัฒนาบุคลากรและอัตรากำลังคนให้เหมาะสมกับปริมาณงาน ดังนั้น องค์กรควรให้ความสำคัญกับปัจจัยการบริหารจัดการองค์กรทุกด้านอย่างเคร่งครัด เพื่อส่งเสริมกระบวนการพัฒนาคุณภาพในการปฏิบัติงานของบุคลากร เพื่อนำพาองค์กรไปสู่ระดับคุณภาพสูงสุด

คำสำคัญ: การบริหารจัดการองค์กร ระบบบริหารคุณภาพ มาตรฐานงานเทคนิคการแพทย์ ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ McKinsey's 7S framework

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: thaveesaksaiongmp@gmail.com

รับบทความ: 22 มิถุนายน 2562

แก้ไขบทความ: 11 กันยายน 2562

รับตีพิมพ์บทความ: 24 กุมภาพันธ์ 2563

บทนำ

ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์เป็นหน่วยงานที่มีความสำคัญต่อระบบบริการสุขภาพ มีบทบาทและหน้าที่ตรวจวิเคราะห์สิ่งส่งตรวจที่เก็บจากผู้ป่วยและผู้ใช้บริการ ด้วยกระบวนการทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ และรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ เพื่อวินิจฉัย รักษา ติดตามการรักษา ควบคุม ป้องกัน และเฝ้าระวังการเกิดโรค ตลอดจนวางแผนการให้บริการด้านสุขภาพเพื่อช่วยสนับสนุนการรักษาได้อย่างมีประสิทธิภาพ⁽¹⁾ การดำเนินงานที่มีคุณภาพด้วยระบบมาตรฐานจึงช่วยสนับสนุนการให้บริการมีความน่าเชื่อถือและนำไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น จากรายงานความแม่นยำของการวินิจฉัยโรคทาง การแพทย์ พบว่าร้อยละ 60-80 ที่มีผลการตรวจจากห้องปฏิบัติการร่วมด้วยจะมีความไวและความจำเพาะมากกว่าการตรวจร่างกายเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ มีการคาดการณ์ว่า ร้อยละ 6-12 ส่งผลให้เกิดความเสียหายและผลข้างเคียงจากการรักษา และร้อยละ 26-30 ของความผิดพลาดดังกล่าวจะส่งผลเสียต่อผู้รับบริการและระบบการดูแลรักษา⁽²⁾ มาตรฐานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์จึงเป็นข้อกำหนดสำคัญของระบบคุณภาพ ที่ทำให้ผลวิเคราะห์ถูกต้องตามหลักวิชาการและเชื่อถือได้ และสามารถนำไปใช้ได้ อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อรองรับปัญหาสาธารณสุขของพื้นที่โดยการสร้างเครือข่ายการบริการในแต่ละระดับ และการสร้างความร่วมมือในเขตพื้นที่ให้สอดคล้องกับแผนพัฒนาระบบบริการสุขภาพ ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์จึงจำเป็นต้องได้รับการพัฒนาการรับรองมาตรฐาน

การรับรองระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการ (accreditation) เป็นกระบวนการตรวจประเมินระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการ ที่มีการวางระบบพัฒนาคุณภาพตามเกณฑ์และเงื่อนไขการรับรองตามมติสภาเทคนิคการแพทย์ที่จะช่วยสร้างความน่าเชื่อถือ

เป็นหลักประกันคุณภาพทางห้องปฏิบัติการ⁽³⁾ และสนับสนุนระบบบริการสุขภาพได้อย่างมีประสิทธิภาพและประสิทธิผล ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์จะได้รับการประเมินและรับรองคุณภาพด้วยมาตรฐานสากล คือ ISO 15189⁽⁴⁾ ส่วนมาตรฐานระดับชาติ คือ มาตรฐานงานเทคนิคการแพทย์⁽¹⁾ และมาตรฐานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข⁽⁵⁾ ที่กำหนดขึ้นเพื่อให้ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ใช้เป็นแนวทางในการจัดตั้งระบบคุณภาพ บำรุงรักษาและพัฒนาคุณภาพอย่างต่อเนื่องทั้งระบบ ซึ่งเป็นการประเมินความพร้อมห้องปฏิบัติการว่าได้ปฏิบัติตามระบบคุณภาพอย่างสมบูรณ์ และยึดถือโดยพนักงานทุกระดับ ทั้งนี้ต้องครอบคลุมการตรวจสอบเชิงบริหารจัดการระบบคุณภาพ เชิงเทคนิควิชาการ และระบบความปลอดภัย

ด้วยเหตุนี้ การขอรับรองมาตรฐานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์จึงไม่ได้พิจารณาเฉพาะคุณภาพของการตรวจวิเคราะห์เท่านั้น แต่จะรวมความพร้อมของกระบวนการบริหารงานภายในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ด้วยเหตุนี้หลักการบริหารจึงเข้ามามีบทบาทอย่างมากในงานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ซึ่งประกอบด้วยการจัดทำแผนกลยุทธ์ การบริหารทรัพยากรมนุษย์ การบริหารต้นทุน และการประกันและควบคุมคุณภาพ ทำให้ผู้บริหารงานห้องปฏิบัติการยุคใหม่ต้องมีความรู้และความเข้าใจในการบริหารอย่างรอบด้าน เพื่อให้สามารถรองรับการเปลี่ยนแปลงจากปัจจัยภายนอกองค์กร เช่น ภาวะเศรษฐกิจ การเปลี่ยนแปลงทางสังคม และการพัฒนาเทคโนโลยีต่างๆ และการเปลี่ยนแปลงภายในองค์กร เช่น การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างองค์กร การเปลี่ยนแปลงด้านการบริหารทรัพยากรมนุษย์ เพื่อเพิ่มศักยภาพการแข่งขันให้กับองค์กรได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถนำพาห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ไปสู่ความสำเร็จในการขอรับรองระบบบริหาร

คุณภาพ เครื่องมืออย่างหนึ่งที่ถูกนำมาใช้เพื่อวิเคราะห์การบริหารจัดการองค์กร คือ แนวทางวิเคราะห์ปัจจัยภายในองค์กรด้วยกรอบแนวคิด McKinsey's 7S ซึ่งได้รับการเผยแพร่ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2523 โดย Robert Waterman, Tom Peter และ Julien Phillips แนวคิดนี้ได้นำเสนอว่าประสิทธิภาพขององค์กรธุรกิจเกิดจากความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆ 7 ด้าน ประกอบด้วย 1. กลยุทธ์องค์กร (strategy) 2. โครงสร้างองค์กร (structure) 3. ระบบการปฏิบัติงาน (system) 4. บุคลากร (staff) 5. ทักษะความรู้ ความสามารถ (skill) 6. รูปแบบการบริหารงาน (style) และ 7. ค่านิยมร่วม (shared values)⁽⁶⁾ ซึ่งตัวแปรแต่ละตัวมีความสอดคล้องและมีความสำคัญต่อการบริหารจัดการองค์กร จากการศึกษาวิจัยเชิงปริมาณตามกรอบแนวคิดปัจจัยความสำเร็จการบริหารจัดการองค์กร McKinsey 7-S model พบว่ามีปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จของการพัฒนาองค์กรซึ่งประกอบด้วย ความชัดเจนของยุทธศาสตร์ ความชัดเจนของโครงสร้างองค์กร ความพร้อมของระบบงาน รูปแบบภาวะผู้นำ บุคลากร ทักษะของบุคลากร และค่านิยมร่วมและวัฒนธรรมองค์กร^(3, 7-9) ด้วยเหตุนี้ผู้บริหารห้องปฏิบัติการทางการแพทย์จึงจำเป็นต้องแสวงหากลยุทธ์การบริหารจัดการองค์กร เพื่อพัฒนาห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ไปสู่มาตรฐานคุณภาพ

โรงพยาบาลชุมชนสังกัดกระทรวงสาธารณสุขเป็นโรงพยาบาลที่ให้บริการเน้นหนักในด้านการรักษาพยาบาลมากกว่าสถานบริการในระดับต้น ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์จึงเป็นหนึ่งในหน่วยงานที่ต้องได้รับการรับรองมาตรฐานเพื่อตอบสนองต่อนโยบายที่มุ่งเน้นความปลอดภัยในการรักษาที่มีมาตรฐาน ข้อมูลจากสภาเทคนิคการแพทย์พบว่าห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ โรงพยาบาลชุมชนสังกัดกระทรวงสาธารณสุข เขตสุขภาพที่ 11 ผ่านการรับรองระบบบริหารคุณภาพห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน

งานเทคนิคการแพทย์ จำนวน 52 แห่ง คิดเป็นร้อยละ 96.30 ผ่านการรับรองระบบบริหารคุณภาพรอบที่ 1, 2 และ 3 จำนวน 19, 27 และ 6 แห่ง คิดเป็นร้อยละ 35.19, 50.00 และ 11.11 ตามลำดับ การผ่านการรับรองระบบบริหารคุณภาพตั้งแต่ครั้งที่ 2 (Re-LA2) เป็นตัวชี้วัดความสำเร็จการบริหารจัดการทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ขั้นการธำรงรักษาคุณภาพการพัฒนาอย่างต่อเนื่องของห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ที่พหุสกันในด้านต่างๆ ทั้งด้านการวางแผนทรัพยากรและการจัดการ ด้านการให้บริการและการบริหารคุณภาพ และความปลอดภัย เพื่อแสดงถึงประสิทธิภาพ ประสิทธิผล ความรวดเร็ว การตอบสนองต่อผู้รับบริการ และคุณภาพของห้องปฏิบัติการ

จากความสำคัญดังกล่าว การบริหารห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ให้มีคุณภาพจำเป็นต้องมีการศึกษาการบริหารจัดการองค์กรของห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ตามมาตรฐาน เพื่อใช้เพิ่มศักยภาพและขีดความสามารถ และเป็นแนวทางให้ผู้บริหารห้องปฏิบัติการและผู้บริหารระดับสูงเล็งเห็นความสำคัญในการปรับกลยุทธ์การบริหารจัดการเพิ่มศักยภาพการแข่งขันเพื่อให้ผู้ป่วยได้รับการบริการรักษาพยาบาลที่มีคุณภาพและมีมาตรฐาน ดังนั้น การศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการบริหารจัดการองค์กรตามกรอบแนวคิด McKinsey's 7S ของห้องปฏิบัติการทางการแพทย์โรงพยาบาลชุมชนสังกัดกระทรวงสาธารณสุข เขตสุขภาพที่ 11 เพื่อศึกษาแนวทางพัฒนาการบริหารจัดการห้องปฏิบัติการทางการแพทย์และเป็นตัวอย่างในการพัฒนาห้องปฏิบัติการให้ธำรงรักษาคุณภาพอย่างต่อเนื่องตามมาตรฐานงานเทคนิคการแพทย์และมาตรฐานสากล ตลอดจนให้หน่วยงานอื่นที่เกี่ยวข้องได้นำไปส่งเสริมให้มีการศึกษา วางแผน และกำหนดเป็นนโยบายเพื่อปรับปรุงการบริหารจัดการภายในองค์กรให้ดียิ่งขึ้นต่อไป

วัสดุและวิธีการ

การศึกษานี้เป็นการวิจัยพรรณนา โดยเก็บรวบรวมข้อมูลจากห้องปฏิบัติการที่ผ่านการรับรองระบบบริหารคุณภาพและธำรงรักษาคุณภาพการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง (Re-LA) ในโรงพยาบาลชุมชน สังกัดกระทรวงสาธารณสุข เขตสุขภาพที่ 11 ระหว่างเดือนธันวาคม พ.ศ. 2561 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2562 การวิจัยครั้งนี้ได้ผ่านการพิจารณาโดยคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ตามเอกสารเลขที่ WU-EC-AH-2-138-61

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง: บุคลากรตำแหน่งนักเทคนิคการแพทย์ และเจ้าพนักงานวิทยาศาสตร์การแพทย์ โรงพยาบาลชุมชนขนาดเล็ก (first-level hospital: F3) จนถึงโรงพยาบาลชุมชนแม่ข่าย (middle-level hospital: M2) สังกัดกระทรวงสาธารณสุข เขตสุขภาพที่ 11 ที่ผ่านการรับรองระบบบริหารคุณภาพและธำรงรักษาคุณภาพการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง (Re-LA)

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย: เก็บรวบรวมข้อมูลโดยใช้แบบสอบถาม ผู้ให้ข้อมูลสามารถตอบด้วยตนเอง ตามเครื่องมือที่ผู้วิจัยได้พัฒนาขึ้น ประกอบด้วย 3 ส่วน ได้แก่

- 1) แบบสอบถามข้อมูลทั่วไปแบบสำรวจรายการ
- 2) แบบสอบถามความคิดเห็นต่อการบริหารจัดการองค์กรตามกรอบแนวคิด McKinsey's 7S แบบมาตราส่วนประมาณค่า 5 ระดับ ตามรูปแบบ Likert's scale
- 3) แบบสอบถามข้อคำถามปลายเปิดเกี่ยวกับปัญหา อุปสรรคการทำงาน และข้อเสนอแนะการบริหารจัดการห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ตามมาตรฐานงานเทคนิคการแพทย์

การตรวจสอบคุณภาพเครื่องมือ: ทดสอบความเที่ยงตรงเชิงเนื้อหา (content validity) ผู้วิจัย

นำแบบสอบถามให้ผู้ทรงคุณวุฒิ 3 ท่าน ที่มีความเชี่ยวชาญในเนื้อหาพิจารณา หลังจากนั้นนำแบบสอบถามที่ผ่านการตรวจสอบความเที่ยงตรงด้านเนื้อหา โครงสร้างของคำถาม และภาษาของเครื่องมือวิจัยหาค่าดัชนีความสอดคล้อง (Index of item objective congruence; IOC)⁽¹⁰⁾ หลังจากนั้นผู้วิจัยปรับปรุงเนื้อหาตามคำแนะนำของผู้ทรงคุณวุฒิ เพื่อให้แบบสอบถามถูกต้องสมบูรณ์ก่อนนำไปทดลองใช้กับกลุ่มตัวอย่าง จำนวน 30 คน ที่มีคุณลักษณะใกล้เคียงกับกลุ่มตัวอย่างที่เก็บจริง ผู้วิจัยทดสอบความเที่ยงตรงเชิงเนื้อหา ได้ค่า IOC เท่ากับ 0.67-0.99 และวิเคราะห์ความเชื่อมั่น (reliability) โดยวิธีของ Cronbach's Alpha⁽¹¹⁾ เพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์แอลฟา (Alpha coefficient) ผู้วิจัยทดสอบความเชื่อมั่นของแบบสอบถาม ได้เท่ากับ 0.97

การเก็บรวบรวมข้อมูล: เก็บรวบรวมข้อมูลโดยใช้แบบสอบถามที่สร้างขึ้น ทำหนังสือขอความร่วมมือตอบแบบสอบถาม และชี้แจงรายละเอียดการทำวิจัยตามจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ โดยแจกแบบสอบถามไปยังห้องปฏิบัติการแต่ละโรงพยาบาล คัดเลือกแบบสอบถามที่ได้รับคืนมาเฉพาะที่ตอบได้ครบถ้วนสมบูรณ์ นำมาบันทึกลงรหัส ตรวจสอบให้คะแนนตามเกณฑ์ที่ได้กำหนดไว้ และนำไปวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูปและจัดเก็บไฟล์อิเล็กทรอนิกส์ในคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคล

การวิเคราะห์ข้อมูล: วิเคราะห์ข้อมูลด้วยสถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) สรุปบรรยายข้อมูลคุณลักษณะประชากรและการบริหารจัดการองค์กรตามกรอบแนวคิด McKinsey's 7S โดยนำเสนอการแจกแจงความถี่ (frequencies distribution) ค่าร้อยละ (percentage) ค่าเฉลี่ยเลขคณิต (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD)

ผลการวิจัย

ผลการเก็บข้อมูลจากประชากร 127 คน ผู้วิจัยได้รับแบบสอบถามกลับมาจำนวน 114 ชุด ซึ่งมีผลการวิเคราะห์ข้อมูล ดังนี้

1. ข้อมูลทั่วไปของผู้ตอบแบบสอบถาม

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทั่วไปของบุคลากรที่ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ประกอบด้วย เพศ อายุ สถานภาพสมรส ระดับการศึกษา ตำแหน่งงานปัจจุบัน ตำแหน่งราชการ ระยะเวลาการปฏิบัติงาน และประสบการณ์การฝึกอบรม พบว่าจากจำนวนประชากรทั้งหมด 127 คน ได้รับแบบสอบถามกลับมา 114 ชุด (ร้อยละ 89.76) ส่วนใหญ่เป็นเพศหญิง 96 คน (ร้อยละ 84.22) อายุระหว่าง 31-40 ปี

จำนวน 55 คน (ร้อยละ 48.25) สถานภาพสมรส 62 คน (ร้อยละ 54.39) ระดับการศึกษาปริญญาตรี หรือเทียบเท่า 90 คน (ร้อยละ 78.95) ตำแหน่งนักเทคนิคการแพทย์ 86 คน (ร้อยละ 75.44) ตำแหน่งข้าราชการ 90 คน (ร้อยละ 78.95) ระยะเวลาที่ปฏิบัติงานมากกว่า 5 ปี 85 คน (ร้อยละ 74.56) เคยเข้าร่วมการฝึกอบรมการรับรองระบบบริหารคุณภาพตามมาตรฐานงานเทคนิคการแพทย์ 91 คน (ร้อยละ 79.82) ส่วนใหญ่มีประสบการณ์การเข้าร่วม 1-2 ครั้ง 55 คน (ร้อยละ 48.25) และห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ส่วนใหญ่ผ่านการรับรองระบบบริหารคุณภาพครั้งที่ 2 (Re-LA2) 28 แห่ง (ร้อยละ 87.5) จำนวนบุคลากร 80 คน ร้อยละ 70.18 (Table 1)

Table 1 Demographic characteristics of respondents (n = 114)

Demographic characteristic	Number	Percent	Level				
			Very low	Low	Moderate	More	Most
			N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
Sex							
Male	18	15.78	0(0.00)	0(0.00)	2(1.75)	12(10.53)	4(3.51)
Female	96	84.22	0(0.00)	0(0.00)	10(8.77)	61(53.51)	25(21.93)
Age (year)							
≤ 30	33	28.95	0(0.00)	0(0.00)	4(3.51)	24(21.05)	5(4.39)
31-40	53	46.49	0(0.00)	0(0.00)	3(2.63)	33(28.95)	17(14.91)
41-50	17	14.91	0(0.00)	0(0.00)	5(4.39)	9(7.89)	3(2.63)
≥ 51	11	9.65	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	7(6.14)	4(3.51)
Status							
Single	46	40.35	0(0.00)	0(0.00)	7(6.14)	33(28.95)	6(5.26)
Married	62	54.39	0(0.00)	0(0.00)	5(4.39)	39(34.21)	18(15.79)
Divorced	6	5.26	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	1(0.88)	5(4.39)

Table 1 Demographic characteristics of respondents (n = 114) (Continued)

Demographic characteristic	Number	Percent	Level				
			Very low	Low	Moderate	More	Most
			N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
Education							
Certificate in Medical Science Officer	14	12.28	0(0.00)	0(0.00)	1(0.88)	8(7.02)	5(4.39)
Bachelor degree or equivalent	90	78.95	0(0.00)	0(0.00)	10(8.77)	57(50.00)	23(20.18)
Master degree and higher	10	8.77	0(0.00)	0(0.00)	1(0.88)	8(7.02)	1(0.88)
Position							
Medical Science Officer	28	24.56	0(0.00)	0(0.00)	3(2.63)	17(14.91)	8(7.02)
Medical Technologist	86	75.44	0(0.00)	0(0.00)	9(7.89)	56(49.12)	21(18.42)
Official position							
Government officer	90	78.95	0(0.00)	0(0.00)	10(8.77)	56(49.12)	24(21.05)
Ministry of Public Health employees	9	7.89	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	7(6.14)	2(1.75)
Government employees	15	13.16	0(0.00)	0(0.00)	2(1.75)	10(8.77)	3(2.63)
Employees							
Work experience (year)							
1-2	16	14.04	0(0.00)	0(0.00)	2(1.75)	12(10.53)	2(1.75)
3-4	13	11.40	0(0.00)	0(0.00)	2(1.75)	8(7.02)	3(2.63)
≥ 5	85	74.56	0(0.00)	0(0.00)	8(7.02)	53(46.49)	24(21.05)
Training experience, Certification of Laboratory Accreditation							
Yes (time)	91	79.82	0(0.00)	0(0.00)	6(5.26)	61(53.51)	24(21.05)
1-2	55	48.25	0(0.00)	0(0.00)	3(2.63)	37(32.46)	15(13.16)
3-4	21	18.42	0(0.00)	0(0.00)	3(2.63)	13(11.40)	5(4.39)
≥ 5	15	13.16	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	11(9.65)	4(3.51)
No	23	20.18	0(0.00)	0(0.00)	6(5.26)	12(10.53)	5(4.39)

2. ผลการวิเคราะห์ข้อมูลการบริหารจัดการองค์กรตามกรอบแนวคิด McKinsey's 7S

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลการบริหารจัดการองค์กรตามกรอบแนวคิด McKinsey's 7S ของบุคลากรที่ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ โรงพยาบาลชุมชนสังกัดกระทรวงสาธารณสุข เขตสุขภาพที่ 11 ที่ผ่านการรับรองระบบบริหารคุณภาพและธำรงรักษาคุณภาพการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง (Re-LA) การศึกษาครั้งนี้ ประกอบด้วย ความชัดเจนของยุทธศาสตร์ ความชัดเจนของโครงสร้างองค์กร ความพร้อมของระบบงาน รูปแบบภาวะผู้นำ บุคลากร ทักษะของบุคลากร และค่านิยมร่วมและวัฒนธรรมองค์กร

2.1 ผลการศึกษากิจการการบริหารจัดการองค์กรตามกรอบแนวคิด McKinsey's 7S จำแนกตามคุณลักษณะประชากร พบว่า บุคลากรที่ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์มีระดับคะแนนความคิดเห็นเฉลี่ยต่อการบริหารจัดการองค์กรตามกรอบแนวคิด McKinsey's 7S ส่วนใหญ่อยู่ในระดับสูง ประกอบด้วย บุคลากรเพศหญิง 61 คน (ร้อยละ 63.54) อายุอยู่ในช่วง 31-40 ปี จำนวน 33 คน (ร้อยละ 62.26) สถานภาพโสด 39 คน (ร้อยละ 62.90) ตำแหน่ง นักเทคนิคการแพทย์ 56 คน (ร้อยละ 65.12) ตำแหน่งข้าราชการ 56 คน (ร้อยละ 62.22) ระยะเวลาที่ปฏิบัติงาน 5 ปีขึ้นไป 53 คน (ร้อยละ 62.35) เคยได้รับการฝึกอบรมมาตรฐานงานเทคนิคการแพทย์ 61 คน (ร้อยละ 67.03) และส่วนใหญ่เคยเข้ารับการฝึกอบรม 1-2 ครั้ง 37 คน (ร้อยละ 67.27) (Table 1)

2.2 ผลการศึกษากิจการการบริหารจัดการองค์กรตามกรอบแนวคิด McKinsey's 7S พบว่า บุคลากร

ที่ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์มีระดับคะแนนความคิดเห็นเฉลี่ยต่อการบริหารจัดการองค์กรตามกรอบแนวคิด McKinsey's 7S ภาพรวมอยู่ในระดับสูง ($\bar{X} = 3.96$, $SD = 0.72$) เมื่อพิจารณารายด้านพบว่า บุคลากรมีความเห็นว่าห้องปฏิบัติการทางการแพทย์มีคะแนนเฉลี่ยด้านค่านิยมร่วมและวัฒนธรรมองค์กรสูงสุด ($\bar{X} = 4.09$, $SD = 0.65$) รองลงมาคือด้านความชัดเจนของยุทธศาสตร์ ($\bar{X} = 4.06$, $SD = 0.65$) ด้านความชัดเจนของโครงสร้างองค์กร ($\bar{X} = 4.03$, $SD = 0.72$) ด้านความพร้อมของระบบงาน ($\bar{X} = 3.95$, $SD = 0.67$) ด้านทักษะของบุคลากร ($\bar{X} = 3.89$, $SD = 0.70$) ด้านรูปแบบภาวะผู้นำ ($\bar{X} = 3.84$, $SD = 0.90$) และด้านบุคลากร มีคะแนนเฉลี่ยต่ำสุด ($\bar{X} = 3.83$, $SD = 0.74$) (Table 2)

3. ผลการวิเคราะห์ปัญหา/อุปสรรคและข้อเสนอแนะ การบริหารจัดการห้องปฏิบัติการทางการแพทย์เพื่อขอรับการรับรองระบบบริหารคุณภาพห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานงานเทคนิคการแพทย์ จากข้อคำถามปลายเปิด เมื่อนำมาวิเคราะห์ ผู้วิจัยสรุปเป็นประเด็นปัญหาและอุปสรรค พบว่า บุคลากรส่วนใหญ่แสดงความคิดเห็น (ร้อยละ 68.42) ในกลุ่มที่แสดงความคิดเห็นส่วนใหญ่มองว่าปัญหาและอุปสรรคต่อการพัฒนา คือ ด้านงบประมาณ การสนับสนุน (ร้อยละ 28.07) รองลงมาคือด้านกระบวนการพัฒนามบุคลากร/ อัตรากำลังคน จำนวนบุคลากรมีไม่เพียงพอต่อการดำเนินงานตามเกณฑ์มาตรฐาน (ร้อยละ 23.68) ด้านภาระงานที่ได้รับมอบหมาย (ร้อยละ 10.53) และด้านนโยบายระดับหน่วยงาน/โรงพยาบาล (ร้อยละ 6.14) (Table 3)

Table 2 The average scores ($\bar{X}$), standard deviation (SD) and interpretation level of organizational management according to McKinsey's 7S framework (n = 114)

Organizational management according to McKinsey's 7S framework	$\bar{X}$	SD	Interpretation level
Shared Values	4.09	0.65	High
Strategy	4.06	0.65	High
Structure	4.03	0.72	High
Systems	3.95	0.51	High
Skills	3.95	0.67	High
Style	3.84	0.90	High
Staff	3.83	0.74	High
Total	3.96	0.72	High

Table 3 Problems and obstacles to obtaining laboratory accreditation

Issues	Number	Percent
Comment	78	68.42
1. Budget	32	28.07
2. Human resource development/ Staff	27	23.68
3. Work load	12	10.53
4. Policy	7	6.14
No comment	36	31.58
Total	114	100

วิจารณ์และสรุป

ผลการศึกษาการบริหารจัดการองค์กรตามกรอบแนวคิด McKinsey's 7S ของห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ โรงพยาบาลชุมชนสังกัดกระทรวงสาธารณสุข เขตสุขภาพที่ 11 ที่ผ่านการรับรองระบบบริหารคุณภาพและธำรงรักษาคุณภาพการพัฒนาดังต่อไปนี้ (Re-LA) จากสถานเทคนิคการแพทย์ พบว่า

บุคลากรส่วนใหญ่มีคะแนนเฉลี่ยความคิดเห็นต่อการบริหารจัดการห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ภาพรวมอยู่ในระดับสูงทุกด้าน ($\bar{X} = 3.96$, $SD = 0.72$) อธิบายได้ว่า บุคลากรนักเทคนิคการแพทย์และเจ้าหน้าที่งานวิทยาศาสตร์การแพทย์มีการทำงานที่มุ่งเน้นพัฒนาคุณภาพตามมาตรฐานวิชาชีพเป็นหลักสำคัญ เนื่องจากงานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์เป็นงานบริการที่ต้อง

เกี่ยวข้องกับคุณภาพชีวิตของผู้รับบริการ ความถูกต้องแม่นยำ จากการตรวจวิเคราะห์เป็นหลักในการสร้างความน่าเชื่อถือที่ทำให้ผู้รับบริการยอมรับ⁽¹²⁾ บุคลากรจึงมุ่งมั่นพัฒนาระบบบริหารคุณภาพเพื่อให้ได้รับการรับรองจากสภาวิชาชีพ จากข้อมูลที่ได้ศึกษา พบว่ามีห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ที่ผ่านการรับรองระบบบริหารคุณภาพและธำรงรักษาคุณภาพการพัฒนอย่างต่อเนื่องครั้งที่ 2 (Re-LA2) ถึงร้อยละ 70.18 แสดงว่าแรงจูงใจภายในของบุคลากรเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลให้การปฏิบัติงานประสบความสำเร็จได้ ทั้งในด้านการรักษาและการพัฒนาระบบคุณภาพควบคู่ไปด้วย ส่งผลให้บุคลากรรู้สึกพึงพอใจที่ได้ปฏิบัติงานที่ทำทนายความสามารถและพึงพอใจในความรู้ ความสามารถในการปฏิบัติงานของตนเอง ทำให้ปฏิบัติงานด้วยความตั้งใจอย่างเต็มกำลังความสามารถ บรรลุหน้าที่ที่จะก้าวไปสู่ความสำเร็จในการสร้างมาตรฐานให้กับห้องปฏิบัติการทางการแพทย์มุ่งมั่นและใช้ความพยายามมากขึ้นเพื่อบรรลุเป้าหมายที่ต้องการ⁽¹³⁾ สามารถพัฒนาองค์กรไปสู่คุณภาพดังคำอธิบายรายด้านเรียงตามระดับคะแนนเฉลี่ยการบริหารจัดการองค์กรจากมากไปน้อย ดังนี้

ด้านค่านิยมร่วมและวัฒนธรรมองค์กร พบว่า คะแนนเฉลี่ยการบริหารจัดการองค์กรอยู่ในระดับสูง ($\bar{x} = 4.09$, $SD = 0.65$) เนื่องจากบุคลากรที่ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ในโรงพยาบาลเหล่านี้มีแนวคิด การเรียนรู้ร่วมกันและปฏิบัติงานเป็นรูปแบบการปฏิบัติงานที่มีอิทธิพลต่อองค์กร ทำให้ห้องปฏิบัติการผ่านมาตรฐาน เมื่อพิจารณาคำถามรายข้อพบว่า บุคลากรมีความซื่อสัตย์สุจริตในการปฏิบัติงาน มีคะแนนเฉลี่ยอยู่ในระดับสูง ($\bar{x} = 4.26$, $SD = 0.64$) แสดงว่าวัฒนธรรมองค์กรของห้องปฏิบัติการทางการแพทย์มุ่งเน้นการทำงานอย่างมีคุณธรรมและจริยธรรมที่บุคลากรต้องรับรู้และปฏิบัติร่วมกัน ซึ่งเป็นค่านิยมร่วมและเป็นวัฒนธรรมองค์กร สะท้อนให้เห็นกระบวนการคิด และการตัดสินใจ

การปฏิบัติงานที่เป็นไปในทางเดียวกัน สอดคล้องกับการศึกษารายข้อ ที่พบว่าบุคลากรมีความมุ่งมั่นในการพัฒนาองค์กรตามเป้าหมายที่กำหนดไว้ ($\bar{x} = 4.13$, $SD = 0.59$) ค่านิยมร่วมและวัฒนธรรมองค์กรจึงเป็นเสมือนรากแก้วขององค์กรที่จะช่วยส่งเสริมให้การปฏิบัติงานบรรลุเป้าหมายที่กำหนดไว้⁽⁹⁾ อีกทั้งยังพบว่าค่านิยมร่วมและวัฒนธรรมองค์กรส่งผลต่อประสิทธิผลการทำงานของบุคลากรในองค์กร^(14, 15) เนื่องจากวัฒนธรรมองค์กรจะช่วยหล่อหลอมให้บุคลากรที่ปฏิบัติงานมีความผูกพันต่อองค์กร ซึ่งจากข้อคำถามรายข้อพบว่า บุคลากรที่ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์มีความผูกพันและผลักดันให้หน่วยงานพัฒนาตามเกณฑ์มาตรฐานงานเทคนิคการแพทย์ มีคะแนนเฉลี่ยอยู่ในระดับสูง ($\bar{x} = 3.68$, $SD = 0.72$) นอกจากนี้ยังทำให้บุคลากรเกิดการปรับตัวที่เหมาะสมกับการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมทั้งภายในและภายนอกองค์กร ทั้งนี้เพราะค่านิยมร่วมและวัฒนธรรมขององค์กรเป็นรากฐานของระบบการบริหาร และวิธีปฏิบัติของบุคลากร หากบุคลากรมีการปฏิบัติตามหรือมีวัฒนธรรมที่เข้มแข็งย่อมทำให้การดำเนินงานบรรลุความสำเร็จสามารถพัฒนาไปสู่คุณภาพได้ตามเป้าหมาย⁽¹⁶⁾ ยังสอดคล้องกับการศึกษาของทิพย์วรรณ จุมแพง กุหลาบรัตนสังธรรม และวัลลภ ใจดี⁽¹⁷⁾ และอนุพงษ์ อินฟ้าแสง⁽¹⁸⁾ ที่พบว่าค่านิยมร่วมขององค์กรมีความสัมพันธ์ทางบวกและมีผลต่อการพัฒนาระบบบริหารคุณภาพในการปฏิบัติงาน

ด้านความชัดเจนของยุทธศาสตร์ พบว่า คะแนนเฉลี่ยการบริหารจัดการองค์กรอยู่ในระดับสูง ($\bar{x} = 4.06$, $SD = 0.65$) อธิบายได้ว่า ความชัดเจนของยุทธศาสตร์ทำให้การทำงานของบุคลากรและองค์กรบรรลุเป้าหมายที่ต้องการอย่างมีประสิทธิภาพและประสิทธิผลได้⁽¹⁹⁾ แต่ทั้งนี้องค์กรต้องมีการกำหนดวิสัยทัศน์ พันธกิจ วัตถุประสงค์ เป้าหมาย

ขององค์กรให้ชัดเจนทั้งในระยะสั้นและระยะยาว รวมไปถึงการกำหนดโครงการหรือกิจกรรมต่างๆ จึงจะทำให้องค์กรสามารถดำเนินงานตามพันธกิจ บรรลุวัตถุประสงค์ตามเป้าหมายที่กำหนดไว้⁽²⁰⁾ ทั้งนี้พบว่า ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์มีการจัดทำแผนปฏิบัติการที่สอดคล้องกับยุทธศาสตร์ในการดำเนินการพัฒนาองค์กร มีคะแนนเฉลี่ยอยู่ในระดับสูง ($\bar{x} = 4.11$, $SD = 0.67$) ขณะเดียวกันผู้บริหารและพนักงานต้องมีการตื่นตัวต่อการเปลี่ยนแปลง เห็นโอกาสใหม่ๆ และข้อจำกัดที่อาจเกิดขึ้นในการทำงาน เปิดโอกาสให้ผู้ร่วมงานในระดับต่างๆ มีส่วนร่วมในการบริหารงาน⁽²¹⁾ อย่างไรก็ตามการพัฒนาห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ไปสู่การรับรองมาตรฐานต้องมีการบริหารกลยุทธ์ที่ดี การกำหนดกลยุทธ์ที่ชัดเจนจะเป็นปัจจัยบวกที่สามารถทำนายความสำเร็จในการพัฒนาคุณภาพการบริหารจัดการขององค์กรได้⁽¹⁷⁾ จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ส่วนใหญ่มีการกำหนดยุทธศาสตร์ที่ชัดเจน และมีแผนการดำเนินงานสอดคล้องตามมาตรฐานคุณภาพ มีคะแนนเฉลี่ยอยู่ในระดับสูง ($\bar{x} = 4.11$, $SD = 0.67$) ด้วยเหตุนี้การบริหารกลยุทธ์ที่มีประสิทธิภาพจะเป็นจุดเริ่มต้นที่ดีด้วยการมีแผนยุทธศาสตร์ที่เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมทั้งภายในและภายนอกองค์กร และห้องปฏิบัติการทางการแพทย์มีการทบทวนแผนงานอย่างสม่ำเสมอ เหมาะสมกับสถานการณ์ปัจจุบัน มีคะแนนเฉลี่ยอยู่ในระดับสูง ($\bar{x} = 3.91$, $SD = 0.68$) อย่างไรก็ตามองค์ประกอบของแผนยุทธศาสตร์องค์กรต้องมีความสอดคล้องกลมกลืนกันเพื่อเป็นปัจจัยเกื้อหนุนซึ่งกันและกัน สอดคล้องกับการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จในการได้รับการรับรองระบบคุณภาพมาตรฐาน คือ การกำหนดกลยุทธ์และวิสัยทัศน์ที่ชัดเจน ซึ่งมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับความสำเร็จในการได้รับการรับรองระบบคุณภาพมาตรฐาน ISO 9002 นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ

รุ่งชัชดาพร เวหะชาติ⁽²²⁾ ที่ได้อธิบายไว้ว่า ปัจจัยด้านการวางแผนกลยุทธ์มีผลต่อการพัฒนาในเรื่องการบริหารคุณภาพทั่วทั้งองค์กร และสอดคล้องกับการศึกษาของพวงผกา มะเสนา และ ประณต นันทิยะกุล⁽⁸⁾ ที่อธิบายไว้ว่าผู้บริหารควรให้ความสำคัญในด้านกลยุทธ์องค์กรเป็นอันดับแรกเพื่อพัฒนาองค์กรไปสู่คุณภาพ

ด้านความชัดเจนของโครงสร้างองค์กรพบว่า คะแนนเฉลี่ยคุณภาพการบริหารจัดการองค์กรอยู่ในระดับสูง ($\bar{x} = 4.03$, $SD = 0.72$) เมื่อพิจารณาจากข้อคำถามรายชื่อพบว่าห้องปฏิบัติการทางการแพทย์มีการจัดทำแผนผังการบังคับบัญชาของหน่วยงานที่ชัดเจน มีคะแนนเฉลี่ยในระดับสูง ($\bar{x} = 4.32$, $SD = 0.68$) ทำให้การปฏิบัติงานมีความคล่องตัวสามารถมอบหมายให้ผู้อื่นปฏิบัติหน้าที่แทนกันได้ ($\bar{x} = 4.00$, $SD = 0.65$) มีการกำหนดบทบาทหน้าที่และจำนวนของบุคลากรไว้อย่างชัดเจน ($\bar{x} = 4.31$, $SD = 0.63$) และเพียงพอในการปฏิบัติงานให้ประสบความสำเร็จอย่างมีประสิทธิภาพตามเกณฑ์มาตรฐานงานเทคนิคการแพทย์ อธิบายได้ว่าโครงสร้างองค์กรเป็นสิ่งสำคัญในการสร้างอิทธิพลต่อพฤติกรรมของคน ที่บ่งชี้ถึงหน้าที่ความรับผิดชอบ และเป็นการจัดระเบียบกิจกรรมต่างๆ ให้ประสบความสำเร็จตามเป้าหมายที่วางไว้ แสดงให้เห็นแผนภาพแสดงตำแหน่งงาน หน้าที่งานต่างๆ และเส้นเชื่อมโยงความสัมพันธ์ของงานต่างๆ โครงสร้างจะครอบคลุมแนวทางกลไกการประสานงาน การติดต่อสื่อสารและระบบต่างๆ ที่เกี่ยวเนื่องกัน เช่น การมอบหมายงาน การกำหนดตำแหน่งและหน้าที่การงานด้านต่างๆ อย่างชัดเจน⁽²³⁾ บุคลากรย่อมปฏิบัติงานได้อย่างถูกต้องทำให้เกิดความแน่นอนในการประสานงาน ไม่ว่าองค์กรจะมีความซับซ้อนเพียงใด ผู้บริหารและสมาชิกในองค์กรก็จะสามารถทำงานร่วมกันได้ง่ายยิ่งขึ้น⁽²⁴⁾ ตามแนวคิดของคูลิค และเออร์วิค⁽²⁵⁾ ที่ชี้ให้เห็นถึง

ความสำคัญของการจัดรูปแบบโครงการหรือเค้าโครงการบริหารที่กำหนดอำนาจหน้าที่ของแต่ละหน่วยงานย่อย รวมทั้งความชัดเจนในการกำหนดอำนาจหน้าที่ตำแหน่งต่างๆ ของหน่วยงาน พร้อมกำหนดลักษณะและวิธีการติดต่อกันที่สัมพันธ์กันตามลำดับชั้นและอำนาจหน้าที่⁽²⁶⁾ ส่วนแนวคิดการบริหารจัดการภาครัฐแนวใหม่เสนอให้มีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างหน่วยงานราชการให้มีขนาดเล็กลงในรูปแบบหน่วยงานอิสระในกำกับโดยเฉพาะการแยกส่วนระหว่างภารกิจงานเชิงพาณิชย์และไม่ใช่เชิงพาณิชย์ การโอนถ่ายอำนาจการควบคุมจากส่วนกลางเพื่อให้อิสระและความคล่องตัวแก่ผู้บริหารของแต่ละหน่วยงาน ด้วยเหตุนี้ปัจจัยด้านโครงสร้างองค์กรจึงส่งผลต่อความสำเร็จในการนำมาใช้เพื่อบริหารองค์กรเช่นกัน

ด้านความพร้อมของระบบงาน พบว่า คะแนนเฉลี่ยคุณภาพการบริหารจัดการองค์กรอยู่ในระดับสูง ($\bar{x} = 3.95$, $SD = 0.67$) กล่าวคือความพร้อมในระบบการทำงานมีความสัมพันธ์กับความสำเร็จในการปฏิบัติงานและนำไปสู่การรับรองมาตรฐานระบบบริหารคุณภาพ เนื่องจากความพร้อมการจัดระบบการทำงาน (working system) ของห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ เช่น ระบบพัสดุ ซึ่งต้องได้รับงบประมาณสนับสนุนการดำเนินการอย่างเพียงพอ ระบบสารสนเทศห้องปฏิบัติการ (Laboratory Information System; LIS) ระบบควบคุมคุณภาพ (Quality Control; QC) ซึ่งมีคะแนนเฉลี่ยอยู่ในระดับสูง ($\bar{x} = 4.27$, $SD = 0.60$) สามารถจัดการความเสี่ยงเพื่อป้องกันข้อผิดพลาดภายในหน่วยงาน เช่น มีระบบรายงานอุบัติการณ์ ระบบ miss/near miss ($\bar{x} = 4.11$, $SD = 0.60$) การมีกระบวนการและลำดับขั้นตอนการปฏิบัติงานที่เป็นระบบ ($\bar{x} = 4.11$, $SD = 0.56$) ตลอดจนมีแนวทางประสานการทำงานภายในและภายนอกหน่วยงานเพื่อให้บรรลุเป้าหมายที่กำหนด ($\bar{x} = 4.00$, $SD = 0.61$) และ

สามารถนำความคาดหวังของผู้รับบริการและผู้มีส่วนได้ส่วนเสีย มาช่วยผลักดันการพัฒนาหน่วยงาน ($\bar{x} = 3.96$, $SD = 0.64$) อธิบายได้ว่า ความสำเร็จที่เกิดขึ้นเนื่องจากห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ได้ดำเนินงานตามข้อกำหนดมาตรฐานวิชาชีพเพื่อให้การดำเนินงานครบถ้วนและถูกต้องตามกระบวนการ ส่งผลให้บุคลากรห้องปฏิบัติการมีระบบการทำงานที่ชัดเจนและถูกต้อง สอดคล้องกับกลยุทธ์และโครงสร้างขององค์กร นอกจากนี้ความพร้อมของระบบงานเป็นปัจจัยบวกที่สามารถทำนายความสำเร็จในการพัฒนาคุณภาพการบริหารจัดการภาครัฐโดยรวมและรายด้าน การวิเคราะห์ข้อมูล/ปัจจัยที่สนับสนุนการดำเนินงานด้านการรายงานข้อมูล แผน/ผลการดำเนินงานตามตัวชี้วัดด้านผลสัมฤทธิ์ การจัดการความรู้ของหน่วยงาน ด้านความร่วมมือดำเนินการตามแผนปรับปรุงระบบการเรียนรู้และด้านการให้ความร่วมมือในการดำเนินการตามแผนพัฒนาของหน่วยงานระดับเขตกระทรวงสาธารณสุข อาจเนื่องจากระบบงานเป็นการทำงานที่ประกอบด้วยระบบย่อยหลายระบบรวมกันและทำงานร่วมกันซึ่งต้องปฏิบัติงานเพื่อประโยชน์หรือวัตถุประสงค์ร่วมกันหรืออย่างเดียวกัน ถือได้ว่าเป็นกระจกสะท้อนให้เห็นถึงฐานะขององค์กร⁽²⁷⁾ และพบว่าระบบงานในองค์กรมีความสัมพันธ์ทางบวกกับความเป็นไปได้ของการนำระบบคุณภาพ ISO 9002 มาใช้กับการบริหารงานของกองตรวจคนเข้าเมือง ณ ท่าอากาศยานพบว่าระบบงานด้านระบบข้อมูลมีผลต่อผลสัมฤทธิ์ในการดำเนินงานตามแนวทางการจัดการองค์กร⁽³⁵⁾

ด้านทักษะของบุคลากร พบว่า คะแนนเฉลี่ยคุณภาพการบริหารจัดการองค์กรอยู่ในระดับสูง ($\bar{x} = 3.89$, $SD = 0.70$) อธิบายได้ว่า บุคลากรที่ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์มีทักษะและความสามารถในการปฏิบัติงาน มีคะแนนเฉลี่ยอยู่ในระดับสูง ($\bar{x} = 4.04$, $SD = 0.63$) เนื่องจากบุคลากร

ที่ปฏิบัติงานส่วนใหญ่เป็นนักเทคนิคการแพทย์ที่ผ่านการรับรองจากสภาวิชาชีพ คิดเป็นร้อยละ 75.44 นอกจากนี้องค์กรยังมีการทบทวนผลการปฏิบัติงานประจำปีอย่างต่อเนื่องเพื่อทราบจุดอ่อน จุดแข็งของการปฏิบัติงานทำให้บุคลากรมีการพัฒนาตัวเองและองค์กรอยู่ตลอดเวลา ($\bar{X} = 3.81$, $SD = 0.75$) ทักษะที่ดีของบุคลากรจึงมีความสำคัญต่อการดำเนินงานในองค์กรเพื่อให้ประสบความสำเร็จได้ตามเป้าหมายที่กำหนดไว้⁽²⁶⁾ บุคลากรมีความคิดริเริ่มแสวงหาสิ่งใหม่ๆ ในการปฏิบัติงานเพื่อช่วยผลักดันให้หน่วยงานประสบผลสำเร็จตามเกณฑ์มาตรฐานงานเทคนิคการแพทย์ได้ ($\bar{X} = 3.68$, $SD = 0.72$) ทั้งนี้ผู้บริหารและบุคลากรควรได้รับการพัฒนาความรู้และเพิ่มพูนประสบการณ์ในการทำงานอย่างต่อเนื่อง เช่น มีโอกาสเข้าร่วมการประชุม สัมมนา ศึกษาดูงาน ($\bar{X} = 3.94$, $SD = 0.76$) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของสุนิสา ธิปไตย และบดินทร์ รัชมีเทศ (พ.ศ. 2558) ที่สรุปว่าบุคลากรที่มีทักษะและความชำนาญในการปฏิบัติงานได้อย่างเหมาะสมย่อมส่งผลให้การทำงานมีประสิทธิภาพ และยังสอดคล้องกับผลการศึกษาของชาลัญญ์ พรหมพิงค์ และนรินทร์ชัย พัฒนพงศา⁽²⁾ ที่อธิบายว่าบุคลากรที่ได้รับการศึกษาอบรมอย่างต่อเนื่องจะทำให้มีทักษะในการปฏิบัติงานที่ดีขึ้น และนำไปสู่การได้รับการรับรองมาตรฐาน

ด้านรูปแบบภาวะผู้นำ พบว่า คะแนนเฉลี่ยคุณภาพการบริหารจัดการองค์กรอยู่ในระดับสูง ($\bar{X} = 3.84$, $SD = 0.90$) เนื่องจากผู้บริหารระดับหัวหน้าห้องปฏิบัติการมีทัศนคติในการทำงานหรือการบริหารจัดการช่วยผลักดันให้หน่วยงานพัฒนาไปสู่คุณภาพได้ ($\bar{X} = 3.93$, $SD = 0.89$) ให้ความสำคัญและให้การสนับสนุนในการนำระบบเกณฑ์มาตรฐานงานเทคนิคการแพทย์มาใช้ ช่วยสร้างขวัญกำลังใจที่ดีในการปฏิบัติงาน ($\bar{X} = 3.78$, $SD = 0.93$) เป็นแบบอย่างที่ดีของบุคลากรในหน่วยงาน ($\bar{X} = 3.75$,

$SD = 0.93$) และเปิดโอกาสให้ซักถามและแสดงความคิดเห็นเพื่อพัฒนางานตามเกณฑ์มาตรฐานงานเทคนิคการแพทย์ ($\bar{X} = 3.77$, $SD = 0.94$) แสดงให้เห็นว่าผู้นำหรือผู้บริหารห้องปฏิบัติการเป็นผู้ที่มีทั้งศาสตร์และศิลป์อยู่ในตนเองที่สามารถสร้างการยอมรับของบุคลากร ให้เกิดความไว้วางใจและเชื่อใจว่าจะสามารถนำพาไปสู่ความสำเร็จ ทำให้ได้รับความร่วมมือและได้รับความเคารพนับถือ ในยุคปฏิรูประบบสาธารณสุขผู้นำจึงไม่ใช่เพียงแต่มีความรู้เท่านั้นแต่ต้องมีความสามารถในการจัดการและมีวิสัยทัศน์ในการบริหารงานสาธารณสุข เท่าทันการเปลี่ยนแปลง ผู้บริหารควรมีลักษณะที่สำคัญ คือ เป็นนักพัฒนานักแก้ปัญหา นักตัดสินใจ นักประนีประนอม นักวางแผน ดังนั้นรูปแบบการบริหารที่เกิดขึ้นในองค์กรจึงเป็นไปตามลักษณะของผู้นำแต่ละองค์กร ซึ่งควรเป็นผู้ที่สามารถสื่อสารวิสัยทัศน์ได้อย่างชัดเจน โดยผู้นำอาจเป็นผู้ที่ได้รับการเลือกตั้ง หรือแต่งตั้ง หรือเป็นผู้ที่แสดงตัวเป็นผู้มีอิทธิพลในกลุ่มเพื่อกำกับและประสานงานที่จะนำไปสู่เป้าหมายด้วยพลังของกลุ่ม⁽²⁸⁾ กล่าวได้ว่าผู้นำที่กล้าคิด กล้าทำ กล้าตัดสินใจ และกล้าเปลี่ยนแปลง เป็นผู้ที่สามารถนำองค์กรไปสู่เป้าหมาย มีความยืดหยุ่น ให้อิสระแก่ผู้ใต้บังคับบัญชาในการทำงาน เป็นผู้นำที่เน้นการทำงานเชิงรุกการทำงานอย่างมีเหตุผลมุ่งเน้นที่ผลสัมฤทธิ์ของงาน และส่งเสริมให้ผู้ใต้บังคับบัญชามีส่วนร่วมในการแสดงความคิดเห็น รับฟังความคิดเห็นหรือปัญหาของผู้ใต้บังคับบัญชา และมีการตอบสนองเป็นอย่างดี มีความสามารถในการให้คำแนะนำ นิเทศงาน และพัฒนาทักษะการทำงานของผู้ใต้บังคับบัญชาให้มีศักยภาพสูงขึ้น ซึ่งลักษณะภาวะผู้นำดังกล่าวส่งผลให้ผู้ใต้บังคับบัญชาสามารถพัฒนาทักษะการทำงาน การตัดสินใจ มีความคิดสร้างสรรค์ สอดคล้องกับทฤษฎีสถานการณ์ของ Hersey และ Blanchard ภาวะผู้นำแบบมีส่วนร่วมและภาวะผู้นำแบบปรึกษา (counseling)⁽²⁹⁾

นอกจากนี้พบว่าผู้นำเป็นผู้ที่มีอิทธิพลเหนือผู้ตาม สามารถนำพาหรือจูงใจให้บุคคลหรือกลุ่มดำเนินการ ให้บรรลุวัตถุประสงค์ของผู้นำหรือองค์กรได้ ทั้งนี้ผู้นำ ต้องเป็นผู้ที่มีวิสัยทัศน์สามารถคาดการณ์หรือมอง สถานการณ์ในอนาคตได้อย่างทะลุปรุโปร่ง⁽²⁶⁾ มีภาวะ ความเป็นผู้นำ (leadership) ทั้งผู้นำองค์กร และผู้นำ ชุมชน ซึ่งเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการบริหารองค์กร ภาวะผู้นำเหล่านี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ ภูษิตา อินทรประสงค์⁽³⁰⁾ ที่พบว่าลักษณะภาวะผู้นำมี ความสัมพันธ์เชิงบวกต่อการบริหารองค์กร และ สอดคล้องกับการศึกษาของบุญนาค บุญโพธิ์ จารุวรรณ ธาตาเดช ปิยธิดา ศรีเดช และปรารณา สติธยวิภาว⁽³¹⁾ ที่พบว่าปัจจัยด้านภาวะผู้นำมีผลต่อความสำเร็จใน การบริหารงานเช่นกัน ส่วนการศึกษาของเขาวภา ปฐมศิริกุล⁽³²⁾ (พ.ศ. 2554) พบว่าภาวะผู้นำมีความ สัมพันธ์กับแรงจูงใจทำให้บุคลากรสามารถพัฒนา องค์กรไปสู่มาตรฐานได้ ภาวะผู้นำจึงมีความสำคัญต่อ การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายในองค์กรและยังส่งผล ให้เกิดความสำเร็จในการปฏิบัติงานของบุคลากร

ด้านบุคลากร พบว่า คะแนนเฉลี่ยคุณภาพ การบริหารจัดการองค์กรอยู่ในระดับสูง ($\bar{x} = 3.83$, $SD = 0.74$) เนื่องจากบุคลากรที่ปฏิบัติงานในห้อง ปฏิบัติการทางการแพทย์มีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับ บทบาทหน้าที่ของตนเอง ($\bar{x} = 4.01$, $SD = 0.63$) และสามารถปฏิบัติงานทดแทนกันได้ในกรณีที่มี จำนวนบุคลากรไม่เพียงพอ ($\bar{x} = 3.88$, $SD = 0.90$) ทั้งนี้กระบวนการทำงานของบุคลากรถูกควบคุมและ ติดตามด้วยระบบมาตรฐานคุณภาพ ทำให้บทบาท หน้าที่การทำงานของบุคลากรในห้องปฏิบัติการ ทางการแพทย์ถูกกำหนดด้วยมาตรฐานงานเทคนิค การแพทย์ สอดคล้องกับการศึกษาของเขาวภา ปฐมศิริกุล⁽³²⁾ ซึ่งกล่าวว่าปัจจัยด้านบุคลากรเป็น ปัจจัยที่มีความสำคัญมากที่สุดที่ขับเคลื่อนงานใน องค์กรให้บรรลุเป้าหมายได้ ฉะนั้นการคัดเลือก

บุคลากรที่มีประสิทธิภาพ มีความรู้ความเข้าใจในระบบ การปฏิบัติงานจะทำให้การปฏิบัติงานในองค์กรเป็นไป ตามมาตรฐานที่กำหนดได้ แต่จากการศึกษาพบว่า จำนวนบุคลากร (Full-Time Equivalent: FTE) ยัง ไม่เพียงพอตามเกณฑ์มาตรฐานงานเทคนิคการแพทย์ ($\bar{x} = 3.32$, $SD = 0.86$) สืบเนื่องจากปัจจัยภายนอก ที่ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ไม่สามารถบริหารจัดการเองได้ เช่น นโยบายของรัฐในการเพิ่มจำนวน บุคลากรของโรงพยาบาล หรือการจัดสรรตำแหน่งงาน จากกระทรวงสาธารณสุข อย่างไรก็ตามการปฏิบัติงาน ของบุคลากรในห้องปฏิบัติการในภาพรวมพบว่า คุณภาพการบริหารจัดการยังอยู่ในระดับสูง และการ ดำเนินงานของห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ก็ยังสามารถพัฒนาไปสู่ระดับคุณภาพได้โดยอาศัยปัจจัย ด้านอื่นๆ ตามกรอบแนวคิด McKinsey's 7S และ สอดคล้องตามแนวคิดของ Herberg, *et al.*⁽³³⁾ ซึ่ง กล่าวว่าบุคลากรจะปฏิบัติงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อขับเคลื่อนองค์กรไปสู่เป้าหมายได้ โดยมีแรงจูงใจ และการธำรงรักษามูลค่าเป็นปัจจัยสนับสนุนที่ สำคัญ เนื่องจากปัจจัยจูงใจหรือปัจจัยที่เป็นตัวกระตุ้น ในการทำงาน (motivation factors หรือ motivators) คือปัจจัยภายในหรือความต้องการภายในของบุคลากร ที่มีอิทธิพลในการสร้างความพึงพอใจในการปฏิบัติงาน และเป็นปัจจัยที่นำไปสู่ทัศนคติทางบวกและการ จูงใจที่แท้จริง นอกจากนี้ปัจจัยธำรงรักษามูลค่า (maintenance หรือ hygiene factors) แม้จะเป็น ปัจจัยที่ไม่เกี่ยวข้องกับงานโดยตรง แต่เป็นปัจจัยที่ ช่วยให้บุคลากรในองค์กรเกิดความพึงพอใจ มีความ รักและผูกพันกับองค์กร ร่วมมือร่วมใจทำงานอย่าง กระตือรือร้นช่วยกันพัฒนาองค์กรให้ไปสู่การได้รับรอง มาตรฐาน จึงกล่าวได้ว่าการบริหารทรัพยากรบุคลากร ของห้องปฏิบัติการเป็นไปตามแนวคิดของ Herberg⁽³³⁾ จึงทำให้ห้องปฏิบัติการสามารถดำเนินงานได้อย่าง มีคุณภาพ ดังนั้นหากบุคลากรมีแรงจูงใจ (motivation)

ในการทำงานแล้ว ย่อมทำให้บุคลากร มีความตั้งใจ กระตือรือร้นในการทำงานเพิ่มขึ้น เป็นเสมือนแรงขับ (driving force) ที่ซ่อนอยู่ภายในจิตใจของบุคลากร ช่วยขับเคลื่อนพลังในการทำงานให้รุกไปข้างหน้ามุ่งต่อการบรรลุเป้าหมายความสำเร็จขององค์กรทำให้องค์กรได้รับผลลัพธ์ที่พึงประสงค์ได้ง่ายขึ้น⁽³⁴⁾

การวิจัยการบริหารจัดการองค์กรตามกรอบแนวคิด McKinsey's 7S ของห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ เขตสุขภาพที่ 11 อธิบายการบริหารจัดการองค์กรเพื่อพัฒนาระบบบริหารคุณภาพของห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ให้เป็นไปตามมาตรฐานงานเทคนิคการแพทย์พบว่า คณะกรรมการบริหารจัดการองค์กรภาพรวมอยู่ในระดับสูง เรียงจากมากไปน้อย ได้แก่ ค่านิยมร่วมและวัฒนธรรมองค์กร ความชัดเจนของยุทธศาสตร์ ความชัดเจนของโครงสร้างองค์กร ความพร้อมของระบบงานด้านทักษะของบุคลากร รูปแบบภาวะผู้นำ และทัศนคติของบุคลากร ตามลำดับ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นความสัมพันธ์ของปัจจัยทั้ง 7 ตามกรอบแนวคิดการบริหารจัดการองค์กร McKinsey's 7S ซึ่งช่วยสนับสนุนให้การปฏิบัติงานพัฒนาได้ตามกระบวนการการรับรองระบบบริหารคุณภาพ อธิบายได้ว่า บุคลากรนักเทคนิคการแพทย์และเจ้าพนักงานวิทยาศาสตร์การแพทย์มีการทำงานที่มุ่งเน้นพัฒนาคุณภาพตามมาตรฐานวิชาชีพเป็นหลักสำคัญ เนื่องจากงานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์เป็นงานบริการเกี่ยวกับคุณภาพชีวิตของผู้รับบริการ ความถูกต้อง แม่นยำจากการตรวจวิเคราะห์จึงเป็นหลักสำคัญในการสร้างความน่าเชื่อถือแก่ผู้รับบริการ บุคลากรจึงมุ่งมั่นพัฒนาระบบบริหารคุณภาพเพื่อให้ได้รับการรับรองจากสภาวิชาชีพ แสดงให้เห็นแรงจูงใจภายในของบุคลากรที่ส่งผลให้การปฏิบัติงานประสบความสำเร็จได้ ทั้งในด้านการรักษาและการพัฒนาระบบคุณภาพควบคู่ไปด้วยกัน ส่งผลให้บุคลากรรู้สึกพึงพอใจที่ได้ปฏิบัติงานที่ท้าทายความสามารถและ

พึงพอใจในความรู้ ความสามารถในการปฏิบัติงานของตนเอง ซึ่งทำให้บุคลากรมีแรงจูงใจในการทำงานก็จะปฏิบัติงานด้วยความตั้งใจและเต็มกำลังความสามารถ และเมื่อบุคลากรเหล่านี้มีความปรารถนาที่จะก้าวไปสู่ความสำเร็จในการสร้างมาตรฐานให้กับห้องปฏิบัติการก็จะมีคามมุ่งมั่นและใช้ความพยายามมากขึ้นเพื่อบรรลุเป้าหมายและความสำเร็จในการทำงานของบุคลากรก็ย่อมนำองค์กรพัฒนาไปสู่คุณภาพเช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่า การบริหารจัดการองค์กรของห้องปฏิบัติการแม้จะมีบางปัจจัยที่ไม่เอื้ออำนวยต่อการบริหารจัดการองค์กร แต่ผลลัพธ์การได้รับการรับรองระบบบริหารคุณภาพก็ยังเป็นไปตามมาตรฐานงานเทคนิคการแพทย์ ทั้งนี้เนื่องจากการทำงานที่มีมาตรฐานวิชาชีพเฉพาะเป็นตัวกำหนด ทำให้บุคลากรที่ปฏิบัติงานร่วมกันในห้องปฏิบัติการมีค่านิยมและวัฒนธรรมองค์กรเป็นไปในทิศทางเดียวกัน มุ่งเน้นการให้บริการ เห็นความสำคัญของความถูกต้อง แม่นยำ และยึดความถูกต้องน่าเชื่อถือของผลการตรวจวิเคราะห์เป็นหลักสำคัญ โดยห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ในสังกัดกระทรวงสาธารณสุข เขตบริการสุขภาพที่ 11 ทราบถึงกระบวนการพัฒนาคุณภาพของห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานงานเทคนิคการแพทย์ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจัดการวางแผนและกำหนดนโยบายการบริหารจัดการห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ให้เหมาะสมและสอดคล้องกับบริบทของขนาดแต่ละหน่วยบริการตามเกณฑ์การรับรองระบบบริหารคุณภาพห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานงานเทคนิคการแพทย์ในการเสนอแนะเชิงนโยบายต่อผู้บริหารระดับสูง และเพื่อเป็นข้อมูลสารสนเทศสำหรับห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ได้ทราบแนวทางในการพัฒนาการบริหารจัดการห้องปฏิบัติการทางการแพทย์สำหรับการพัฒนาหน่วยงานต้นแบบในการบริหารจัดการให้กับหน่วยงานอื่นๆ ในโรงพยาบาลต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ (สัญญาเลขที่ 20/2562) ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ทรงคุณวุฒิที่ให้ความอนุเคราะห์ประเมินแบบสอบถามและขอขอบคุณ ผู้อำนวยการโรงพยาบาล หัวหน้าห้องปฏิบัติการ และบุคลากรทุกท่านในโรงพยาบาลชุมชนจังหวัดพัทลุง และโรงพยาบาลชุมชนเขตสุขภาพที่ 11 ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ อำนวยความสะดวก และให้ความร่วมมือเป็นอย่างดียิ่งในการเก็บข้อมูล และตอบแบบสอบถาม จนทำให้การวิจัยครั้งนี้สำเร็จตามวัตถุประสงค์

เอกสารอ้างอิง

1. The Medical Technology Council. Thailand Medical Technology Standard: 2017. Bangkok, Thailand; 2017. (in Thai)
2. Promping C, Patanapongsa N. Guidelines to develop medical laboratory, Ministry of Public Health, to the quality systems. Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2016; 49: 227-35. (in Thai)
3. Thipat S, Rassameethes B. Factors Affecting Medical Laboratory Accreditation in Royal Thai Army Hospitals. Royal Thai Army Medical Journal 2015; 68: 61-9. (in Thai)
4. International Organization for Standardization. ISO 15189 Medical laboratories - particular requirements for quality and competence. 2nd ed. Geneva, Switzerland; 2007.
5. Department of Medical Science. Ministry of Public Health Medical Laboratory Standard. Bangkok, Thailand; 2014. (in Thai)
6. Peter Tomas J, Robert H, Waterman Jr. In Search of Excellence: Lessons from America's Best-Run Companies. New York: Harper & Row Publishers; 1982.
7. Saiyen P. Keys of Success for Quality Development System in Phetchaburi Laboratory Network during 2009-2013. J Med Tech Assoc Thailand 2013; 41: 4717-38. (in Thai)
8. Masena P, Nantiyakul P. The Administration of Hospital Service Quality in the Ministry of Public Health. EAU Health Journal 2014; 4: 88-101. (in Thai)
9. Nutdechanan Y. Factors affecting the success of organization development based on quality criteria. Public administration of the Department of Mental Health, Ministry of Public Health. Nonthaburi: Department of Mental Health, Ministry of Public Health; 2015. (in Thai)
10. Thaveerat P. Behavioral and social science research methods 8th ed. Bangkok: Bureau of Educational and Psychological Testing Srinakharinwirot University; 2000.
11. Phongwichai S. Statistical analysis by computer. 20th edition, Bangkok: Publisher of Chulalongkorn University; 2009. (in Thai)
12. Kedin S. Evaluation on the Development of Laboratory Quality System Regional Medical Sciences Center 10th Ubon Ratchatani During 2009 - 2013. Journal of Health System Research 2014; 8: 167-75. (in Thai)

13. Khongwijit M, Boonyoung N, Thiangchanya P. Staff Nurses, Engagement in Work and Being a Magnet Nursing Department as Perceived by Staff Nurses at Tertiary Hospitals, Southern Thailand. *Songklanagarind J Nurs* 2017; 37: 41-52. (in Thai)
14. Denison DR. Corporate culture and organizational effectiveness. NY: John Wiley & Son; 1990
15. Plodprong M. The study of organizational culture affecting new public administration of bang saphan police station in Prachuap Khiri Khan province. [Master Degree's Thesis]. Phetchaburi: Phetchaburi Rajabhat University; 2011. (in Thai)
16. Serirat S. Organizational Behavior. Bangkok: Thira Ferm and Saitex; 1998. (in Thai)
17. Jumpang T, Rudtanasudjatun K, Jaidee W. Factors Influencing the Success of Public Sector Management Quality Award Based on Perception of the Personnel at the Regional Level, Ministry of Public Health The Public Health Journal of Burapha University 2012; 7: 38-52. (in Thai)
18. Infahsaeng A. Organizational Culture: Factors for Success. *FEU Academic Review* 2016; 10: 35-46. (in Thai)
19. Greenberg J, Baron RA. Behavior in organizations. 4th ed. NY: Simon & Scuster; 1993.
20. Vorahan W. Strategic Management in Nursing. *Journal of nurses' association of Thailand, north-eastern division* 2013; 3: 6-15. (in Thai)
21. Saritwanich S. Strategic Management: Concepts and Theories. Bangkok: Thammasat University; 2010. (in Thai)
22. Vehachart R. The Development of a model of total Quality Management in Basic Education Institutions. [Ph.D. Thesis in Educational Administration]. Chonburi: Burapha University; 2005. (in Thai)
23. Jongcharoen Y. The Administration for the Organization of Excellence from McKinsey Approach: A Case Study the Office of Phetchaburi Primary Educational Service Area 2. Bangkok: Phetchaburi Rajabhat University; 2012. (in Thai).
24. Scott WR. Organizations rational natural and open systems. 3rd ed. NJ: Prentice- Hall; 1992.
25. Gulick L, Urwick L. The Science of Administration. New York: Columbia University; 1973.
26. Prasert-Sri R. Human resource planning process. Teaching documents for government organization administration unit 1.4, Sukhothai Thammathirat University, Management Science Program. Nonthaburi; 2005: 1-8 (in Thai)
27. Somyot N. Strategic management & business policy. 4th ed. Bangkok: manager; 1997. (in Thai)

28. Prutipinyo C. Public Health Administration. Bangkok: Mahidol University; 2017. (in Thai)
29. Ratnatilaka Na Bhuket P. Organization and management. Bangkok: Think Beyond Books; 2009. (in Thai)
30. Intaraprasong B. Factors affecting the performance administration effectiveness of the district hospitals of the Office of the Permanent Secretary for Public Health, Ministry of Public Health. (Ph. D. Thesis). National Institute of Development Administration, Thailand; 1996. (in Thai)
31. Boonpo B, Tadadej C, Tridech P, Satitvipawee P. Factors Related to Achievement Motivation of Personnel in a University Hospital in Bangkok. JHS 2015; 24: 1157-66. (in Thai)
32. Pathomsirikul Y. Success factors model for health service business management of private hospitals in Thailand. J Bus Adn 2011; 34: 14-35. (in Thai)
33. Herzberg F. The Motivation to work. NY: John Wiley and Sons; 1959.
34. Kalyanamitra K. Two Powerful Motivation Factors to Success. Valaya Alongkorn Review (Humanities and Social Science) 2016; 6: 175-83. (in Thai)
35. Mingmai P, A Feasibility Study of Employing The Quality System ISO 9002 in The Administration of The Immigration Division at BANGKOK International Airport. [Master Degree's Thesis]. Bangkok: Kasetsart University; 2000. (in Thai)



วารสาร เทคนิคการแพทย์

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

Suggestion for Authors

คำแนะนำสำหรับผู้เขียน

นโยบายการรับพิจารณาบทความ

วารสารเทคนิคการแพทย์ เป็นวารสารทางวิชาการของสมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

มีวัตถุประสงค์เพื่อส่งเสริมการเผยแพร่ความรู้ทางวิชาการ และผลงานวิจัยโดยมีหลักเกณฑ์การพิจารณาบทความดังนี้

1. เป็นบทความด้านเทคนิคการแพทย์ (สาขาเคมีคลินิก สาขาจุลชีววิทยาคลินิก สาขาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก สาขาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก สาขาปรสิตวิทยาทางการแพทย์ สาขาโลหิตวิทยา สาขาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด) วิทยาศาสตร์การแพทย์ และสาขาวิชาอื่นที่เกี่ยวข้องกับงานทางห้องปฏิบัติการทางคลินิก

2. บทความต้องไม่เคยนำไปเผยแพร่ในวารสารฉบับอื่นมาก่อน และไม่อยู่ระหว่างการพิจารณาในวารสารใดๆ

3. บทความจะต้องมีการอ่านตรวจทานต้นฉบับ จากคณะกรรมการหรือผู้ทรงคุณวุฒิเฉพาะสาขาจากภายนอกอย่างน้อย 2 ท่าน ทั้งนี้เพื่อให้วารสารมีคุณภาพในระดับมาตรฐานสากลและนำไปอ้างอิงได้

4. บทความที่ดีพิมพ์ลงในวารสารเทคนิคการแพทย์แล้วถือว่าเป็นลิขสิทธิ์ของวารสารเทคนิคการแพทย์ สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

5. ข้อเขียนและข้อคิดเห็นใดๆ ในวารสารนี้เป็นความคิดเห็นส่วนตัว และเป็นความรับผิดชอบของ

ผู้เขียนทั้งสิ้น ไม่ใช้ความเห็นของคณะกรรมการวารสารเทคนิคการแพทย์ และสมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

6. การถอนบทความระหว่างขั้นตอนการพิจารณาโดยไม่มีเหตุผลสมควร กองบรรณาธิการขอสงวนสิทธิ์ได้รับพิจารณาตีพิมพ์บทความครั้งต่อไปเป็นระยะเวลา 2 ปี

7. บทความประเภทนิพนธ์ต้นฉบับ รายงานกรณีศึกษา และบทความวิจัยอย่างสั้น ผู้นิพนธ์ต้องแนบหนังสือรับรองที่ได้รับอนุญาตจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน (Ethic committee)

8. บทความที่ดีพิมพ์ในวารสาร ผู้เขียนตั้งคำถามให้ผู้อ่านตอบแบบทดสอบ ลักษณะคำถามเป็นปรนัย มี 4 ตัวเลือก จำนวน 5 ข้อ หรือ 10 ข้อ ตอบบทความแล้วแต่กรณี โดยผู้เขียนและผู้อ่านที่ตอบแบบสอบถามถูกต้องทุกข้อจะได้หน่วยคะแนน ในกิจกรรมประเภทที่ 4 กิจกรรมชนิดที่ 16 การศึกษาด้วยตนเองผ่านสื่อสำเร็จรูป และผู้เขียนจะได้หน่วยคะแนน จากกิจกรรมประเภทที่ 5 กิจกรรมชนิดที่ 25 การตีพิมพ์ผลงานวิชาการทางเทคนิคการแพทย์ ในวารสารวิชาการ จากศูนย์การศึกษาต่อเนื่องเทคนิคการแพทย์ สภาเทคนิคการแพทย์ ดูรายละเอียดเพิ่มเติมได้ที่เว็บไซต์ www.mtcouncil.org หรือ www.cmtethai.net

ประเภทของบทความ แบ่งออกเป็น 9 ประเภท คือ

1. บทบรรณาธิการ (Editorials) เป็นบทความซึ่งวิเคราะห์ผลงานทางเวชศาสตร์การแพทย์ที่มีความสำคัญในวิชาชีพเทคนิคการแพทย์ หรือ

วิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้อง หรืออาจจะเป็นข้อคิดเห็นเพื่อประโยชน์ในด้านการยกระดับวิชาชีพเทคนิคการแพทย์ให้สูงขึ้น

2. บทความปริทัศน์ (Review Article)

เป็นบทความเพื่อฟื้นฟูวิชาการซึ่งรวบรวมผลงานเกี่ยวกับเรื่องใดเรื่องหนึ่งโดยเฉพาะ ที่เคยลงตีพิมพ์ในวารสารอื่นมาแล้วโดยนำเรื่องมาวิเคราะห์ วิวิจารณ์ และเปรียบเทียบเพื่อให้เกิดความกระจ่างแก่ผู้อ่านเกี่ยวกับเรื่องนั้น

3. นิพนธ์ต้นฉบับ (Original Article)

เป็นรายงานเกี่ยวกับผลการวิจัยทางด้านเทคนิคการแพทย์และวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่เกี่ยวข้องโดยไม่เคยตีพิมพ์ที่ไหนมาก่อน

4. บทความพิเศษ (Special Article)

เป็นบทความเกี่ยวกับเรื่องทั่วๆ ไปที่มีเนื้อหาและสาระที่เป็นประโยชน์และสร้างสรรค์ เพื่อพัฒนาผู้อ่านวารสารทุกระดับให้ได้รับความรู้ เพื่อนำองค์ความรู้ไปประยุกต์ใช้ในชีวิตประจำวัน เช่น เรื่องเกี่ยวกับหลักธรรมะ ศิลปะการพูด ฯลฯ

5. รายงานการประชุมวิชาการ (Seminar Report) เป็นรายงานจากการประชุมสัมมนาวิชาการที่เป็นประโยชน์แก่ผู้อ่านวารสารเทคนิคการแพทย์

6. รายงานกรณีศึกษา (Case Report)

เป็นรายงานเกี่ยวกับการวินิจฉัยโรคในผู้ป่วยรายที่น่าสนใจทั้งทางด้านประวัติผลการตรวจร่างกาย และการตรวจทางห้องปฏิบัติการคลินิกร่วมกัน

7. บทความวิจัยอย่างสั้น (Short Communication) เป็นบทความวิจัยฉบับย่อ เป็นรูปแบบการรายงานการศึกษาแบบกระชับ อันเนื่องมาจากข้อจำกัดของการศึกษา แต่มีความสมบูรณ์ในเนื้อหาที่น่าสนใจ รูปแบบที่เขียนเป็นลักษณะคล้ายนิพนธ์ต้นฉบับ แต่จะสั้นและกระชับกว่า

8. จดหมายถึงบรรณาธิการ (Letter to the Editor) เป็นบทความซึ่งเสนอข้อคิดเห็นและประสบการณ์ทางด้านวิชาการที่เกี่ยวข้องกับงานในสาขาวิชาชีพเทคนิคการแพทย์อย่างสั้นๆ ในรูปของจดหมายถึงบรรณาธิการ

9. ย่อวารสาร (Abstract Review) เป็นการย่อบทความทางวิชาการด้านเทคนิคการแพทย์และวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องและน่าสนใจ ซึ่งได้รับการตีพิมพ์แล้วในวารสารนานาชาติ เป็นภาษาไทย

การเตรียมต้นฉบับ

เพื่อให้การตีพิมพ์บทความเป็นไปอย่างถูกต้องและรวดเร็ว ผู้นิพนธ์จะต้องปฏิบัติตามรายละเอียด ดังนี้

1. ภาษา ให้ใช้ได้ 2 ภาษาคือภาษาไทย และ/หรือภาษาอังกฤษ ถ้าต้นฉบับเป็นภาษาไทยควรพยายามใช้ถ้อยคำและศัพท์ภาษาไทยมากที่สุด โดยใช้ตามพจนานุกรมศัพท์แพทย์อังกฤษ-ไทย และพจนานุกรมศัพท์วิทยาศาสตร์ฉบับราชบัณฑิตยสถาน สำหรับคำศัพท์ภาษาอังกฤษที่บัญญัติเป็นภาษาไทยแล้วแต่ยังไม่เป็นที่ทราบกันอย่างแพร่หลาย หรือแปลแล้วเข้าใจยาก ให้กำกับภาษาเดิม (อังกฤษ) ในวงเล็บ หรืออนุโลมให้ใช้ภาษาอังกฤษได้

2. ต้นฉบับ พิมพ์ด้วยโปรแกรม Word for Windows ด้วยอักษร Cordia New ขนาด 14 และพิมพ์เลขหน้าที่ตรงกลางขอบล่างของทุกหน้า โดยไม่ต้องพิมพ์ชื่อสกุลผู้นิพนธ์ในต้นฉบับ

ส่งต้นฉบับของบทความหรือบทความต่างๆ ทางเว็บไซต์ของวารสารฯ <http://www.jmt-amtt.com>

3. ชื่อเรื่อง ชื่อผู้นิพนธ์ ชื่อหน่วยงานและสถาบันให้แยกไฟล์ต่างหาก

3.1 ชื่อเรื่อง มีทั้งภาษาไทย และภาษาอังกฤษ ซึ่งควรให้สั้นแต่ได้ใจความ ไม่ควรใช้คำย่อในเรื่อง ยกเว้นคำที่เป็นที่ยอมรับกันทั่วไป เช่น NADH ความยาวของชื่อเรื่องควรมีความชัดเจน สามารถบ่งบอกผู้อ่านให้ทราบถึงสาระสำคัญของเนื้อหาและรายละเอียดในตัวบทความ

3.2 ชื่อผู้นิพนธ์ ให้เขียนชื่อต้นและนามสกุลตัวเต็มทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ไม่ต้องระบุปริญญา ตำแหน่งทางวิชาการ หรือ ตำแหน่งทางราชการ ในกรณีที่มีผู้แต่งหลายคน ระบุชื่อผู้รับผิดชอบบทความและ E-mail address ที่สามารถติดต่อได้

3.3 ชื่อหน่วยงานและสถาบันระบุสถานที่ และ E-mail address ของผู้พิมพ์ทุกคนที่สามารถติดต่อได้

4. รายละเอียดของนิพนธ์ต้นฉบับและบทความวิจัยอย่างสั้นให้เรียงหัวข้อ ตามลำดับต่อไปนี้

1) บทคัดย่อ (Abstract) มีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ความยาวไม่เกิน 300 คำ
2) คำสำคัญ (keywords) มีทั้งภาษาไทย และภาษาอังกฤษ จำนวน 3-5 คำ) บทนำ (introduction) ประกอบด้วยเหตุผลและวัตถุประสงค์ ในการวิจัย
4) วัสดุและวิธีการ (materials and methods) รายละเอียดของเครื่องมือและน้ำยา รวมทั้งขั้นตอนที่สำคัญควรระบุให้ชัดเจน 5) ผลการวิจัย (results) เขียนใจความสั้นและชัดเจน อาจใช้ตารางหรือภาพประกอบคำอธิบาย คำอธิบายภาพและตาราง ให้เป็นภาษาอังกฤษ 6) วิจารณ์ (discussion) 7) สรุป (conclusion) 8) กิตติกรรมประกาศ (acknowledgements) 9) เอกสารอ้างอิง (references) ให้เรียงลำดับเลขตามทีปรากฏก่อนหลังในเนื้อเรื่อง

5. ตาราง แผนภูมิ ภาพประกอบ ให้แยกไว้ท้ายบทความโดยใช้หนึ่งหน้าต่อหนึ่งตาราง หรือหนึ่งแผนภูมิ สำหรับภาพเป็นระบบอิเล็กทรอนิกส์ให้บันทึกภาพโดยใช้นามสกุล .jpg หรือ .tif สำหรับข้อความและคำอธิบายในตารางและภาพให้เป็นภาษาอังกฤษ

6. การเขียนเอกสารอ้างอิง ให้ใช้ตามระบบ Vancouver ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

1. ถ้ามาจากเอกสารภาษาอังกฤษ ให้ใช้ชื่อผู้พิมพ์เป็นภาษาอังกฤษ เขียนชื่อสกุลตัวเต็ม นำหน้าตามด้วยอักษรย่อของชื่อต้น

2. ถ้ามาจากเอกสารภาษาไทย ให้แปลเป็นภาษาอังกฤษและต่อท้ายด้วย (in Thai)

3. ถ้ามาจากภาษาอื่นให้แปลเป็นภาษาอังกฤษ และให้วงเล็บภาษาเดิมไว้ตอนท้าย

4. ปีที่อ้างอิงเป็นแบบ ค.ศ.

5. การอ้างอิงเอกสารให้ใช้ชื่อย่อของวารสารที่นำมาอ้างอิงตามแบบของ Index Medicus ปีที่ตีพิมพ์ ฉบับที่ (volume) หน้าต้นและหน้าสุดท้าย

6.1 ตัวอย่างการอ้างอิงเอกสาร

6.1.1 ผู้พิมพ์ตั้งแต่ 1 คนถึง 6 คน ใส่ชื่อผู้แต่งทุกคน ถ้ามีผู้พิมพ์มากกว่า 6 คน ให้ใส่ชื่อผู้แต่งเพียง 3 คนแรกตามด้วยคำว่า *et al.*

- Solter NA, Wasserman SI, Austern KF, *et al.* Cold urticaria: release into the circulation of histamine and eosinophilic chemotactic factor of anaphylaxis during cold challenge. *N Engl J Med* 1976; 294: 687-90.

- Manakul S, Inthachang N. Rapid haemocultures report. *J Med Tech Assoc Thailand.* 2012; 40: 4300-10. (in Thai)

6.1.2 ผู้พิมพ์เป็นคณะหรือกลุ่มบุคคล

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

6.1.3 ไม่มีชื่อผู้พิมพ์ Anonymous.

- Coffee drinking and cancer of the pancreas (Editorial). *Br Med J* 1981; 283: 628.

6.1.4 วารสารประเภท supplement

- Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional asplenia: demonstration of splenic activity by bone marrow scan (abstract). *Blood* 1979; 54 (suppl 1): 26a.

6.2 ตัวอย่างการอ้างอิงหนังสือ

6.2.1 ผู้พิมพ์คนเดียว

- Eisen HN. Immunology: an Introduction to molecular and cellular principle of the immune response, 5th ed. New York: Harper and Row; 1974: 406

- Wijarm B. The Management of Knowledge toward Performance. Bangkok: Expernet Company; 2004. (in Thai)

- Chomeya R. Organizational Effectiveness on Health Care Criteria for Performance Excellence Framework in Government Hospitals in Public Health Region 6. [Ph.D. Thesis in Applied Behavioral Science Research]. Bangkok: Faculty of Graduate School, Srinakharinwirot University; 2003. (in Thai)

6.2.2 ผู้นิพนธ์เป็นคณะหรือกลุ่มบุคคล

- American Medical Association Department of Drugs. AMA drug evaluations. 3rd ed. Littleton: Publishing Sciences Group, 1977.

6.2.3 บรรณาธิการ ผู้รวบรวม ประ찬เป็นผู้แต่ง

- Finegold SM, Martin WJ. Diagnostic Microbiology. 6th ed. St.Louis: C.V. Mosby Company, 1982.

6.2.4 บทในหนังสือ

- Weinstein L, Swartz MN. Pathogenic properties of invading Microorganisms. In: Sodenman Wa Jr., Sidenman Wa, editors. Pathologic physiology: mechanisms of disease. Philadelphia: WB Saunders; 1974. p. 457-72.

- Tienboon P. Anthropometric nutritional assessment. In: Chardapisak W, Gosarat C, editors. Ambulatory Pediatrics. Chiang Mai: Sangsilp Publishing; 2007. p. 363-9. (in Thai)

6.2.5 สิ่งตีพิมพ์ขององค์กรต่างๆ

- National Center for Health Statistics. Acute condition: incidence and associated disability, United State July 1968-June 1969. Rockville, MD: National Center for Health Statistics, 1972 (Vital and health statistics, Series 10: Data from the National Health Survey, no 69) (DHEW publication no. (HSM) 72-1036).

6.2.6 หนังสือรายเดือนและรายปักษ์

- Roueche B. Annals of medicine: the Santa Claus culture. The New York 1971 Sep. 4: 66-81.

6.2.7 หนังสือพิมพ์รายวัน

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

6.3 ตัวอย่างการอ้างอิงเอกสารอิเล็กทรอนิกส์

6.3.1 CD-ROM

- Anderson SC, Poulsen KB, Anderson's electronic atlas of hematology [CD-ROM]. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002.

6.3.2 บทความวารสารทางอินเทอร์เน็ต (Journal article on the Internet)

- Sanders GD, Bayourni AM, Holodnity M, *et al.* Cost-effectiveness of HIV screening in patients older than 55 year of age. Ann Intern Med [serial on the Internet]. 2008 Jun [cited 2008 Oct 7]; 148 (12). Available from: <http://www.annals.org/cgi/reprint/148/12/889.pdf>

6.3.3 หนังสือทางอินเทอร์เน็ต (Monograph on the Internet)

- Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer [monograph on the Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2002 Jul 9]. Available form: <http://www.nep.edu/books/0309074029/html/>

6.3.4 โฮมเพจ/เว็บไซต์ (Homepage/Website)

- Cancer-Pain. org [homepage on the Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c 2000-01 [cited 2008 Oct 3]. Available from: <http://www.cancer-pain.org/>



วารสาร

เทคนิคการแพทย์

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

Check list การเตรียมต้นฉบับ วารสารเทคนิคการแพทย์

เอกสารประกอบพิจารณา และความรับผิดชอบของผู้แต่งหรือคณะผู้แต่ง

- ☐ ผู้แต่งหรือคณะผู้แต่งออกหนังสือรับรองว่า กำลังส่งให้วารสารเทคนิคการแพทย์พิจารณาเท่านั้น บทความนี้หรือบางส่วนของบทความไม่เคยตีพิมพ์ที่ไหนมาก่อน ถ้าบทความได้รับการยอมรับจากกองบรรณาธิการ บทความและบางส่วนของบทความนี้ จะตีพิมพ์โดย “วารสารเทคนิคการแพทย์” เพียงแห่งเดียวเท่านั้น
- ☐ การเสนอชื่อผู้ทรงคุณวุฒิเป็น Reviewer โดยผู้ทรงคุณวุฒิเป็นผู้มีผลงานวิชาการอย่างสม่ำเสมอ และต้องเป็นบุคคลจากภายนอกสถาบันของผู้แต่ง 2 ท่าน พร้อมสถานที่ทำงาน โทรศัพท์ และ E-mail address
- ☐ หนังสือรับรองที่ได้รับอนุญาตจากกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ (Ethic committee) (สำหรับบทความประเภทนิพนธ์ต้นฉบับ และรายงานผู้ป่วย)

การพิมพ์ต้นฉบับ

- ☐ พิมพ์ต้นฉบับด้วยโปรแกรม Microsoft Word for Window
- ☐ ตั้งค่ากระดาษ ขนาด A4
- ☐ ตัวอักษร Cordia New ขนาด 14
- ☐ ตาราง พิมพ์แยกจากเนื้อหาแต่รวมอยู่ในไฟล์เดียวกัน และเขียนคำว่า (Table...) ใน text
- ☐ รูปภาพ มีความคมชัด ความละเอียดไม่ต่ำกว่า 300 pixels/inches และเขียนคำว่า (Fig. ...) ใน text
- ☐ คำย่อ: ใช้เฉพาะที่เป็นสากลเท่านั้น และเขียนคำเต็ม วงเล็บคำย่อครั้งแรกใน Abstract บทคัดย่อหรือ text
- ☐ ชื่อยาหรือสารเคมีใช้ generic name เท่านั้น
- ☐ บทความภาษาไทย: การเขียนคำศัพท์ภาษาอังกฤษ ให้ยึดหลักการเขียนทับศัพท์หรือใช้ศัพท์บัญญัติตามพจนานุกรมฉบับราชบัณฑิตยสถาน ยกเว้นคำที่แปลแล้วอาจได้ใจความไม่ชัดเจน ให้ใช้คำศัพท์ภาษาอังกฤษหรือเขียนคำแปลเป็นภาษาไทยแล้ววงเล็บศัพท์ภาษาอังกฤษ ปีให้ใช้เป็นปี พ.ศ. โดยไม่ต้องวงเล็บปี ค.ศ. โดยรวมควรใช้เป็นภาษาไทยให้มากที่สุด

การอ้างอิงเอกสาร: วิทยานิพนธ์ไม่สามารถนำมาเป็นเอกสารอ้างอิงได้

- ☐ ใส่หมายเลขเรียงลำดับที่อ้างอิง
- ☐ พิมพ์กระดาษเหนือข้อความและมีวงเล็บ
- ☐ อ้างอิงท้ายบทความตามคำแนะนำผู้แต่ง (Suggestion for Authors: www.jmt-amtt.com)

หน้าแรก (title page) เขียนเป็นภาษาไทย และ อังกฤษ

- | | | |
|--|----------------------------------|-------------------------------------|
| ☐ ชื่อเรื่อง | ☐ ภาษาไทย | ☐ ภาษาอังกฤษ |
| ☐ ชื่อ-สกุล ของผู้แต่งและคณะ | ☐ ภาษาไทย | ☐ ภาษาอังกฤษ |
| ☐ สถานที่ทำงานของผู้แต่งและคณะ | ☐ ภาษาไทย | ☐ ภาษาอังกฤษ |
| ☐ E-mail address: ของผู้แต่งและคณะ | | |
| ☐ หมายเลขโทรศัพท์ผู้รับผิดชอบบทความ | | |

ประเภทบทความ

- | | | |
|---|---|--|
| ☐ บทบรรณาธิการ | ☐ บทความปริทัศน์ | ☐ นิพนธ์ต้นฉบับ |
| ☐ บทความพิเศษ | ☐ รายงานการประชุมวิชาการ | ☐ รายงานกรณีศึกษา |
| ☐ บทความวิจัยอย่างสั้น | ☐ จดหมายถึงบรรณาธิการ | ☐ ข่อยวารสาร |

นิพนธ์ต้นฉบับและบทความวิจัยอย่างสั้น ให้ลำดับเนื้อหาดังต่อไปนี้

- | | |
|---|--|
| ☐ บทคัดย่อ ไม่เกิน 300 คำ | ☐ คำสำคัญ (เรียงตามอักษร) จำกัด 3-5 คำ |
| ☐ Abstract ไม่เกิน 300 คำ | ☐ Keywords (เรียงตามอักษร) จำกัด 3-5 คำ |
| ☐ เนื้อหา ประกอบด้วย | |
| ☐ บทนำ (Introduction) | |
| ☐ วัสดุและวิธีการ (Materials and methods) | |
| ☐ ผลการศึกษา (Results) | |
| ☐ วิจารณ์ (Discussions) | |
| ☐ สรุป (Conclusion) | |
| ☐ เอกสารอ้างอิง (References) เป็นภาษาอังกฤษ (ตามคำแนะนำ) | |
| ☐ ตาราง และ รูปภาพ เป็นภาษาอังกฤษ (ตามคำแนะนำ) | |

บทความปริทัศน์

อนุโลมตามผู้แต่ง แต่ให้มีขอบข่ายรูปแบบการเขียน ประกอบด้วย บทคัดย่อ บทนำ เนื้อเรื่อง สรุป

- | | |
|--|--|
| ☐ บทคัดย่อ ไม่เกิน 300 คำ | ☐ คำสำคัญ (เรียงตามอักษร) จำกัด 3-5 คำ |
| ☐ Abstract ไม่เกิน 300 คำ | ☐ Keywords (เรียงตามอักษร) จำกัด 3-5 คำ |

ลงชื่อ ผู้รับผิดชอบบทความ

(.....)

iSED®

the *perfect* ESR system



Simply insert the primary EDTA tubes and walk away!

iSED Advanced Rheology Technology

iSED's micro-flow cell captures the critical kinetics of Red Blood Cells in a highly Controlled testing environment. Utilizing a very small sample - 100 microliters- the iSED captures the impact of the most critical phase of the early-phase in the phenomenon of RBC sedimentation, the so-called Rouleaux formation, to produce ESR results that are unaffected by the variables commonly associated with traditional ESR testing, such as mixing of the sample and temperature.

Most importantly, iSED results are not affected by the hematocrit.

- ▶ Results in 20 seconds
- ▶ 100µL sample
- ▶ No disposables
- ▶ Works directly off primary EDTA tubes
- ▶ Closed container sampling
- ▶ Fully automated
- ▶ Random access
- ▶ Continuous feed operation
- ▶ High throughput (up to 180 samples per hour!)



Seditrol® ESR Quality Control Exclusively for iSED

- ▶ 18 month shelf life
- ▶ 31 day open vial stability
- ▶ No refrigeration required
- ▶ Barcoded, piercable vials, ready to load
- ▶ No transfer of QC material required
- ▶ Free QC Data Management Program with peer data and 24/7 access

order information

Cat.	Description	Packaging
112-00101	iSED® Automated ESR Analyzer	1 each
112-05000	Test Card; 5000 iTests	1 card
112-10000	Test Card; 10,000 iTests	1 card
112-20000	Test Card; 20,000 iTests	1 card
112-40000	Test Card; 40,000 iTests	1 card
DSC06	Seditrol® Quality Control Kit	6 x 4.5mL
112-12-001	iWash™	4 x 500mL

specifications

Principle of Measure	photometrical rheoscope
Results	printed results (1-130mm/hr)
Sample Requirements	100µL whole blood (500µL dead volume)
Tube Requirements	13 x 75mm test tube in EDTA anti-coagulant, capped
Barcode Reader	Internal
Printer	Internal
Interface	Serial RS232 port for LIS connection
Power Requirements	100-240VAC; 50-60Hz; 160W
Weight	13.6 kgs (30 lbs)
Dimensions	36 x 27 x 34 cm (14.3 x 10.5 x 13.4 in)

ALCOR
SCIENTIFIC

WWW.ALCORSCIENTIFIC.COM

DISTRIBUTOR :

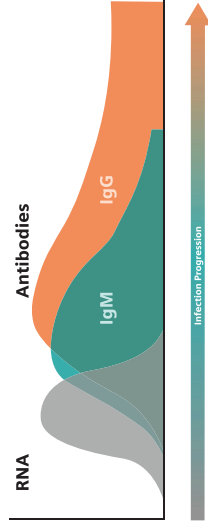
Bangkok Inter Products Co., Ltd,
91/247-251 Suwinthawong Road, Minburi, Bangkok 10510
Tel: 662 543-7430 Fax: 662 543-7900
Email: info@b-i-p.co.th Website: www.b-i-p.co.th

Not all antibody tests are created equal

High quality, extensive reach and targeting the right protein are all essential to ensure we effectively manage the threat of COVID-19

The SARS-CoV-2 Total Assay¹ is a highly sensitive and accurate antibody test

A total antibody test enables a clearer clinical picture over longer period of time.



What is sensitivity and specificity?

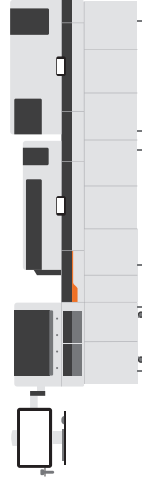
A highly sensitive test should capture nearly all true positive results. A highly specific test should avoid nearly all false positive results.

100% sensitivity²

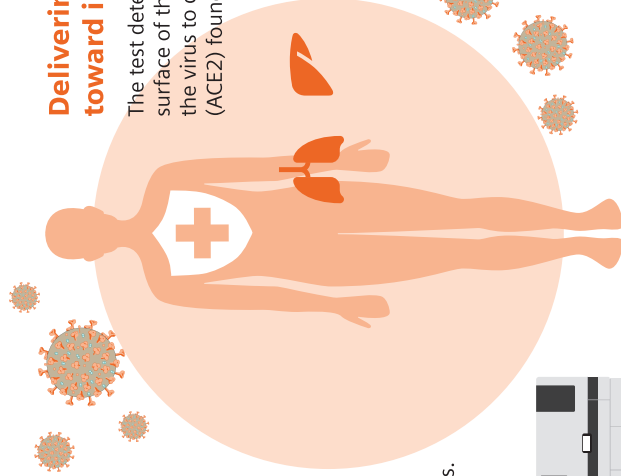
99.8% specificity³

Rapid

Identify SARS-CoV-2 antibodies in as little as 10 minutes.⁵

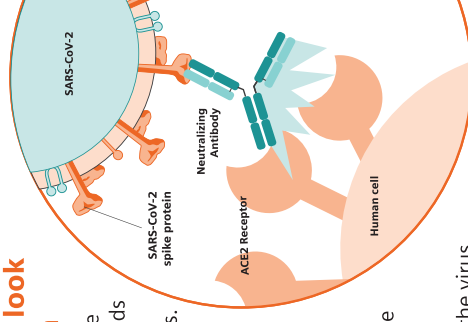


Total antibody blood tests, which run on laboratory analyzers, detect antibodies to SARS-CoV-2 (including IgG and IgM), that are used to identify those with an immune response that indicates recent infection or prior exposure.



Delivering long-term value as we look toward immunity and vaccination

The test detects antibodies to a key protein on the surface of the virus – a **spike protein**, which binds the virus to cells via a distinct human receptor (ACE2) found in lungs, heart, and multiple organs.



Studies indicate that certain (neutralizing) antibodies to the spike protein can **disarm** SARS-CoV-2, presumably by interfering with the ability of the virus to bind, penetrate and infect human cells.



Reaching millions of patients

~20,000

50M/month

analysts worldwide⁴ with the largest installed base in the U.S.

Production according to market demand as pandemic evolves

1. This test has not been FDA cleared or approved. This test has been authorized by FDA under an EUA for use by authorized laboratories. This test has been authorized only for detecting the presence of antibodies against SARS-CoV-2, not for any other viruses or pathogens. This test is only authorized for the duration of the declaration that circumstances exist justifying the authorization of emergency use of in vitro diagnostics for detection and/or diagnosis of COVID-19 under Section 564(b)(1) of the Act, 21 U.S.C. § 360bbb-3(a)(1), unless the authorization is terminated or revoked sooner. Product availability may vary by country and is subject to regulatory requirements.

2. For samples collected ≥ 14 days after positive PCR results.

3. For samples collected ≥ 14 days after positive PCR results.

4. Installed base of ADVIA Centaur XP, ADVIA Centaur XPT, ADVIA Centaur CP, Aelitia Solution, Dimension Vista and Dimension EXL analyzers.

5. Dependent on test mix and configuration using Aelitia Solution.

HOOD05162003035228