



Journal of the Medical Technologist

Association of Thailand

วารสารเทคนิคการแพทย์

Vol. 48 No. 2 August 2020

ปีที่ 48 ฉบับที่ 2 สิงหาคม 2563

CONTENTS



Review Article

- Roles of MHC Molecules in Immune Responses and Accomplishment of Viral Vaccines 7331
Tirasak Pasharawipas

Original Articles

- Development of Colony Multiplex PCR for Rapid Identification of *Streptococcus suis* serotype 2 and 1/2 7344
Nisarat Poonanan and Rerngwit Boonyom
- Biological and Anti-cancer Activity of Binary Toxin from *Lysinibacillus sphaericus* 7358
*Kanokporn Srisucharitpanit
Worapan Rojanatiranan
Chirapond Chonanant
Chontida Tangsongcharoen and
Panadda Boonserm*
- Serum Levels of Nitric Oxide Metabolites in Dyslipidemia Individuals 7370
*Apinya Mechuer
Kornwipa Tanapermpool
Natpicha Kongklay
Somsak Fongsupa and
Sudawadee Kongkhum*

- The Effect of Phytohaemagglutinin on Measurement and Evaluation of Lymphocytes using MTT Assay 7381
*Kittima Tungprasertpol
Suparat Wichitwiengrat
Sasirapa Thongbopit and
Tatsanee Phermthai*
- Emergence of Colistin Resistance in Carbapenems Resistant *Enterobacteriaceae* strains 7394
Nittaya Singpolat
- Prevalence of Thalassemia Carriers of Foreign Spouses Attending at the Antenatal Clinic, Metropolitan Health and Wellness Institution, Bangkok 7407
Nutchia Hiriotuppa
- Outcome of The Prenatal Beta-Thalassemia Control Program 7415
*Molthicha Soonklang
Nopporn Sawatjui
Suppagira Soepsrisook
Manasicha Mekjarasnapha and
Monthana Chantharaniyom*



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**

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

อ่านค่าเตือนในฉลากและเอกสารกำกับเครื่องมือแพทย์ก่อนใช้
หมายเหตุ : โฆษณาต่อผู้ประกอบการวิชาชีพทางการแพทย์ และสาธารณสุข
ใบอนุญาตเลขที่ : พพ.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 : พพ.429/2562

CONTACT FOR INFORMATION
(66) 0 2274 8331

www.gibthai.com/laboratory

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

[LINE @gibthai](https://www.line.me/@gibthai)

จัดจำหน่ายและนำเข้าโดย บริษัท กิบทัย จำกัด

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



วารสาร เทคนิคการแพทย์

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย
ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

ปีที่ 48 ฉบับที่ 2 สิงหาคม 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 “บทบาทของโมเลกุล MHC กับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและผลสัมฤทธิ์ของวัคซีนไวรัส” บทความนิพนธ์ต้นฉบับ (Original article) จำนวน 7 เรื่อง ซึ่งประกอบด้วย บทความภาษาอังกฤษ 3 เรื่อง และบทความภาษาไทย 4 เรื่อง โดยเนื้อหาของบทความ จัดตามกลุ่มวิชาดังนี้ 1) บทความทางด้านจุลชีววิทยาคลินิก จำนวน 2 เรื่อง 2) บทความทางด้านชีววิทยาระดับโมเลกุล จำนวน 1 เรื่อง 3) บทความทางด้านจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก จำนวน 3 เรื่อง และ 4) บทความทางด้านเคมีคลินิก จำนวน 1 เรื่อง

สมชาย วิริยะยุทธกร
บรรณาธิการวารสารเทคนิคการแพทย์



วารสาร เทคนิคการแพทย์

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย
ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

ปีที่ 48 ฉบับที่ 2 สิงหาคม 2563

สารบัญ

บทความปริทัศน์

- บทบาทของโมเลกุล MHC กับการ
ตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและผลสัมฤทธิ์
ของวัคซีนไวรัส
ธีระศักดิ์ พัทธวิภาส 7331

นิพนธ์ต้นฉบับ

- การพัฒนาวิธี Multiplex PCR จาก
โคลนีเพื่อแยกเชื้อ *Streptococcus suis*
serotype 2 ออกจาก serotype 1/2
นิสารัตน์ พูลอนันต์ และ
เริงวิทย์ บุญโสม 7344
- ฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง
ของโปรตีนสารพิษไบโแนรีจากแบคทีเรีย
Lysinibacillus sphaericus
กนกพร ศรีสุจริตพานิช
วรพรรณ โรจนดิรนนท์
จิราพร จรอนันต์
ชลธิดา ตั้งทรงเจริญ และ
ปนัดดา บุญเสริม 7358
- ระดับเมแทบอลิต์ของไนตริกออกไซด์ใน
ซีรัมของคนที่มีความผิดปกติของระดับ
ไขมันในเลือด
อภิัญญา มีเชื้อ
กรวิภา ชนะเพิ่มพูน
ณัฐริชา คงคล้าย
สมศักดิ์ ฟองสุภา และ
สุดาวดี คงขำ 7370

- ความเข้มข้นของไฟโตฮีแมกกลูตินินใน
ปฏิกิริยามีผลต่อการวัดและวิเคราะห์ปริมาณ
เซลล์ลิมโฟไซต์ด้วยเทคนิค MTT assay
กฤติมา ดังประเสริฐผล
ศุภรัตน์ วิจิตรเวียงรัตน์
ศศิประภา ทองบพิตร และ
ทัศนีย์ เพิ่มไทย 7381
- อุบัติการณ์การดื้อยาโคลิสตินในเชื้อ
Enterobacteriaceae สายพันธุ์ที่ดื้อ
ต่อยากลุ่ม Carbapenems
นิตยา สิงห์พลทัน 7394
- ความชุกพาหะธาลัสซีเมียในกลุ่มรสบต่างด้าว
ที่มาฝากครรภ์ของสถาบันพัฒนาสุขภาพ
เขตเมือง กรุงเทพฯ
ณัชชา หิริไธด่ปะ 7407
- ผลลัพธ์ของการควบคุมและป้องกันโรค
เบตาธาลัสซีเมียแบบครบวงจรร่วมกับการ
ตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด
มลทิชา สุญกลาง
นพพร สวัสดิ์จ้อย
ศุภจิรา สืบสีสุข
มนสิชา เมฆจรสันภา และ
มนธนา จันทรมิยม 7415



วารสาร เทคนิคการแพทย์

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย
ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

Vol. 48 No. 2 August 2020

CONTENTS

Review Article

- Roles of MHC Molecules in Immune Responses and Accomplishment of Viral Vaccines 7331
Tirasak Pasharawipas

Original Articles

- Development of Colony Multiplex PCR for Rapid Identification of *Streptococcus suis* serotype 2 and 1/2 7344
Nisarat Poonanan and Rerngwit Boonyom
- Biological and Anti-cancer Activity of Binary Toxin from *Lysinibacillus sphaericus* 7358
*Kanokporn Srisucharitpanit
Worapan Rojanatiranan
Chirapond Chonanan
Chontida Tangsongcharoen and Panadda Boonserm*
- Serum Levels of Nitric Oxide Metabolites in Dyslipidemia Individuals 7370
*Apinya Mechuer
Kornwipa Tanapermpool
Natpicha Kongklay
Somsak Fongsupa and Sudawadee Kongkhum*

- The Effect of Phytohaemagglutinin on Measurement and Evaluation of Lymphocytes using MTT Assay 7381
*Kittima Tungprasertpol
Suparat Wichitwiengrat
Sasiprapa Thongbopit and Tatsanee Phermthai*
- Emergence of Colistin Resistance in Carbapenems Resistant *Enterobacteriaceae* strains 7394
Nittaya Singpoltan
- Prevalence of Thalassemia Carriers of Foreign Spouses Attending at the Antenatal Clinic, Metropolitan Health and Wellness Institution, Bangkok 7407
Nutcha Hiriotuppa
- Outcome of The Prenatal Beta-Thalassemia Control Program 7415
*Molthicha Soonklang
Nopporn Sawatjui
Suppagira Soeprisook
Manasicha Mekjarasnapha and Monthana Chantharaniyom*



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	เจ็ดเสริมอนันต์	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.พิไลวรรณ	ศิริพฤกษ์พงษ์	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ผศ. ดร.นริสา	เก่งตรง บดีรัฐ	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ผศ. ดร.อรุณี	อิงคากุล	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
อ. ดร.สว่าง	เพชรวิเศษ	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ผศ. ดร.เอนก	ภูทอง	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
นายบุญช่วย	เอี่ยมโกศลภ	กรมควบคุมโรค

คณะบรรณาธิการ

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

Roles of MHC Molecules in Immune Responses and Accomplishment of Viral Vaccines

Tirasak Pasharawipas*

Faculty of Medical Technology, Rangsit University Pathum Thani Province, Thailand

Abstract

It is believed that viral vaccine is a powerful tool to prevent viral infection. Occasionally, there were reports of the low efficiency of viral vaccines some of which can be less than 50%. Major histocompatibility complex (MHC) is the polymorphic molecule that plays an important role in inducing cell-mediated immune response of helper T cells (Th) and cytotoxic T cells (Tc). There are two classes of MHC molecules, class I and II. Both classes have three major loci: HLA-A, -B and -C in class I and HLA-DP, -DQ and -DR in class II. To date, over thousand alleles for each MHC gene locus have been characterized. Based on genetic inheritance, individuals have variation of MHC alleles. To induce specific T-lymphocyte clones, T-cell epitopes require the association of the compatible MHC molecule to form an MHC-peptide complex to induce specific T cell clone through T cell receptor (TCR) molecule. Thus, lacking of appropriate MHC allele can be the cause of negative seroconversion in some individuals for some particular antigen. This article discusses the association of MHC molecules and immune response in prevention of viral transmission by the viral vaccine. A prospective plan for managing seroconversion in vaccinated individuals is also proposed as a package of the viral vaccine administration, particularly, the role of medical technologist.

Keywords: Viral vaccine, Major histocompatibility complex (MHC), Viral epidemic

*Corresponding author E-mail address: Tirasak4124@yahoo.com

บทบาทของโมเลกุล MHC กับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน และผลสัมฤทธิ์ของวัคซีนไวรัส

ธีระศักดิ์ พัทธวิภาส*

คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี

บทคัดย่อ

มักเป็นที่เข้าใจกันโดยทั่วไปว่าการได้รับวัคซีนไวรัสคือการสร้างภูมิคุ้มกันอย่างได้ผลสมบูรณ์สำหรับตัวเองต่อเชื้อไวรัสชนิดนั้น ๆ แต่จากรายงานการวิจัยเท่าที่มีการศึกษาพบว่าวัคซีนไวรัสที่มีอยู่ในระบบสาธารณสุขในปัจจุบันไม่ให้ประสิทธิภาพอย่างที่เข้าใจและยังพบว่าวัคซีนไวรัสบางชนิดให้ประสิทธิภาพต่ำกว่าร้อยละห้าสิบในกลุ่มประชากรที่ได้ศึกษา บทความนี้นำเสนอความสำคัญของโมเลกุล major histocompatibility complex (MHC) ที่มีผลต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการทำงานของ helper T cell (Th) และ cytotoxic T cell (Tc) ด้วยการเข้าจับกับเปปไทด์สายสั้น ๆ ที่เรียกว่า อีพิโทป ทำให้เกิดโมเลกุลเชิงซ้อน MHC-peptide complex ซึ่งสามารถกระตุ้น T lymphocyte ผ่านโมเลกุลตัวรับบนผิวเซลล์ที่เรียกว่า T cell receptor (TCR) อย่างจำเพาะ (MHC restriction) โมเลกุล MHC จำแนกได้เป็นสองแบบคือ class I และ class II โดย MHC class I มีผลต่อการทำงานของ Tc cell ส่วน MHC class II มีผลต่อ Th cell ในมนุษย์ ยีน MHC class I ประกอบด้วยสามโลคัสหลักคือ HLA-A, -B, และ -C ขณะที่ MHC class II ประกอบด้วยโลคัส HLA-DP, -DQ และ -DR และเนื่องจาก MHC เป็นโมเลกุลที่มีความหลากหลายสูง โดยมีรายงานว่ายีน HLA แต่ละโลคัสมีมากกว่าหนึ่งพันยีนอัลลีล ดังนั้นด้วยเหตุผลการถ่ายทอดทางพันธุกรรมจึงทำให้มนุษย์แต่ละคนมียีนอัลลีลของ HLA ที่แตกต่างกันอย่างหลากหลาย ทำให้โมเลกุล MHC แต่ละอัลลีลมีความสามารถจับกับอีพิโทปต่างกัน เป็นเหตุให้ความสามารถการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมในแต่ละคนมีความแตกต่างกัน และทำให้ผู้ที่ขาด MHC อัลลีลที่เหมาะสมไม่สามารถตอบสนองต่ออีพิโทปบางชนิดของแอนติเจนรวมทั้งของเชื้อไวรัส บทความนี้นำเสนอความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกันจากการได้รับวัคซีนไวรัสกับโมเลกุล MHC อัลลีลที่แตกต่างกันในแต่ละบุคคล และชี้ให้เห็นความจำเป็นที่ต้องมีการตรวจหานี้เพื่อเลือกวัคซีนโดยนักเทคนิคการแพทย์ เพื่อติดตามการสร้างภูมิคุ้มกันหลังจากที่ได้รับวัคซีนไวรัส โดยควรจัดเป็นกิจกรรมร่วมอยู่ในโปรแกรมการให้วัคซีนไวรัสแก่ผู้รับวัคซีนไวรัสทุก ๆ คน

คำสำคัญ: วัคซีนไวรัส โมเลกุลเอ็มเอชซี การระบาดของเชื้อไวรัส

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: Tirasak4124@yahoo.com

รับบทความ: 6 กุมภาพันธ์ 2563

แก้ไขบทความ: 6 มีนาคม 2563

รับตีพิมพ์บทความ: 12 พฤษภาคม 2563

บทนำ

การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสหลากหลายชนิดเป็นปัญหาสาธารณสุขของสังคมโลกรวมทั้งประเทศไทย โดยเชื่อกันว่าวัคซีนไวรัสเป็นสิ่งสำคัญในการช่วยป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสแต่ละชนิดอย่างได้ผลในทุกคนที่ได้รับวัคซีนไวรัสนั้น อย่างไรก็ตาม ที่ผ่านมายังมีข้อถกเถียงเกี่ยวกับประสิทธิผลของวัคซีนไวรัสหลายชนิดในการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันแก่ประชากรในแต่ละกลุ่มว่ามีประสิทธิภาพทั่วถึงอย่างแท้จริงหรือไม่ ขณะที่กลไกการตรวจสอบประเมินประสิทธิผลของวัคซีนไวรัสที่นำมาใช้ในประชากรแต่ละกลุ่มในแต่ละประเทศยังมีข้อจำกัด ข้อมูลงานวิจัยเพื่อตรวจสอบประสิทธิผลของวัคซีนไวรัสแต่ละชนิดยังอยู่ในวงจำกัด อย่างไรก็ตาม มีรายงานการศึกษาของกลุ่มผู้วิจัยที่ได้ตรวจสอบการสร้างภูมิคุ้มกัน (seroconversion) จากวัคซีนไวรัสหลายชนิดในประชากรที่หลากหลายแตกต่างกัน พบว่ามักให้ประสิทธิผลต่ำในการสร้างภูมิคุ้มกันแก่ผู้รับวัคซีน⁽¹⁻⁸⁾ แม้แต่วัคซีนไวรัสตับอักเสบบีที่กล่าวกันว่าเป็นวัคซีนไวรัสที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดก็ยังมีรายงานพบว่าประมาณร้อยละ 10-15 ของผู้ที่ได้รับวัคซีนตับอักเสบบีไม่มีการสร้างภูมิคุ้มกันหลังจากได้รับวัคซีนจนครบ⁽⁹⁻¹²⁾ ในประเทศจีนมีรายงานติดตามนักเรียนมัธยมปลายที่ได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันไวรัสตับอักเสบบีขณะที่ยังเป็นทารก แต่กลับพบว่าร้อยละ 28.7 (158/551) ของนักเรียนกลุ่มนี้ตรวจไม่พบว่ามีแอนติบอดี anti-HBs (หรือน้อยกว่า 1 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร (mIU/mL)) และหากคำนึงถึงระดับภูมิคุ้มกันที่สามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (seroprotection) ซึ่งควรมีระดับ anti-HBV มากกว่า 10 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ก็พบว่าจำนวนมากถึงร้อยละ 63 ของตัวอย่างนักเรียนกลุ่มดังกล่าวไม่มีระดับภูมิคุ้มกันสูงพอเพื่อป้องกันการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีได้⁽¹³⁾ การศึกษาที่คล้ายกันในประเทศไทย

โดย Posuwan และคณะ⁽¹⁴⁾ ก็พบว่าร้อยละ 93.1 ของนักศึกษาแพทย์จากจำนวน 271 คนที่ได้รับการฉีดวัคซีนในช่วงทารกก็มีระดับภูมิคุ้มกันไม่สูงพอ (น้อยกว่า 10 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร) ที่จะป้องกันการติดเชื้อได้และเมื่อให้วัคซีนป้องกันไวรัสตับอักเสบบีซ้ำ (booster) กับนักศึกษาแพทย์ที่ตรวจไม่พบแอนติบอดี (น้อยกว่า 1 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร) ก็พบว่ามีถึงร้อยละ 39 (14/36) ที่ไม่สามารถสร้างภูมิคุ้มกันให้มีระดับป้องกันการติดเชื้อได้ จากตัวอย่างการศึกษาที่กล่าวนี้จึงเกิดคำถามว่าเหตุใดประสิทธิภาพของวัคซีนไวรัสตับอักเสบบีและวัคซีนไวรัสอื่นอีกหลายชนิด จึงไม่สามารถกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันและ/หรือทำให้ผู้ได้รับวัคซีนมีระดับภูมิคุ้มกันที่มากพอเพื่อป้องกันการติดเชื้อไวรัสอย่างมีประสิทธิภาพอย่างแท้จริง บทความนี้อภิปรายเกี่ยวกับกลไกการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิผลของวัคซีนไวรัสในภาพรวมและเสนอให้บุคลากรเทคนิคการแพทย์ร่วมกันสร้างกฎเกณฑ์และเพิ่มมาตรการด้านวิชาชีพโดยต้องมีขั้นตอนตรวจสอบว่าผู้ได้รับวัคซีนไวรัสต้องได้รับการตรวจสอบติดตามผลการสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสชนิดนั้น โดยจัดรวมอยู่ในโปรแกรมการให้วัคซีน ซึ่งไม่ควรเป็นการให้วัคซีนไวรัสโดยไม่มีการตรวจติดตามอย่างเป็นอยู่ในปัจจุบัน

หน้าที่และความหลากหลายของโมเลกุล MHC

สารแปลกปลอมหรือแอนติเจนที่เข้าสู่ร่างกาย หากมีน้ำหนักโมเลกุลและโครงสร้างซับซ้อนมากพอจะมีสมบัติเป็นอิมมูโนเจน กระตุ้นร่างกายให้มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน โดยเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ทำหน้าที่นำเสนอแอนติเจน หรือ antigen presenting cell (APC) ในช่วงแรกคือแมคโครฟาจ และเดนไดรติกเซลล์ เกิดกระบวนการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาว T lymphocyte ให้มีการตอบสนองต่อ

อิมมูโนเจน⁽¹⁵⁾ APC มีหน้าที่นำเสนอแอนติเจน โดยการทำให้อีพิโทป (epitope) จับกับโมเลกุล major histocompatibility complex (MHC) กลายเป็นโมเลกุลเชิงซ้อนที่เรียกว่า MHC-peptide complex เพื่อจับและเหนี่ยวนำโมเลกุลตัวรับของเซลล์ T lymphocyte ที่เรียกว่า T cell receptor (TCR) ของแต่ละโคลนซึ่งมีความจำเพาะแตกต่างกัน⁽¹⁶⁾ MHC เป็นชุดของโมเลกุลที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์มีบทบาทแสดงความเข้ากันได้ระหว่างเซลล์ต่างชนิดกันในร่างกาย โดยแต่ละคนจะมีโมเลกุล MHC แตกต่างกัน โมเลกุล MHC ของมนุษย์เรียกว่า human leukocyte antigen (HLA) ซึ่งหมายถึงแอนติเจนของเม็ดเลือดขาวมนุษย์ เนื่องจากโมเลกุล MHC ถูกค้นพบแรกเริ่มจากเซลล์เม็ดเลือดขาว โมเลกุล MHC ของสัตว์ชนิดอื่นได้รับการเสนอชื่อแตกต่างกัน เช่น MHC ของสุกรเรียกว่า swine leukocyte antigen (SLA) ซึ่งหมายถึงแอนติเจนของเม็ดเลือดขาวสุกร ขณะที่ MHC ของสุนัขเรียกว่า dog leukocyte antigen (DLA) MHC แบ่งออกเป็น 2 แบบ เรียกว่า MHC class I และ class II ซึ่งยังแบ่งย่อยตามตำแหน่งที่เรียกว่าโลคัสของ HLA (HLA locus) บนโครโมโซมคู่ที่ 6 ทั้งนี้ MHC class I ของมนุษย์มีโลคัสหลักอยู่ 3 ตำแหน่งคือ HLA-A, HLA-B และ HLA-C ขณะที่ MHC class II มีโลคัสหลักอยู่สามตำแหน่งเช่นกัน คือ HLA-DP, HLA-DQ และ HLA-DR^(17, 18) HLA locus ของแต่ละคนมียีนอัลลีล ซึ่งมีความหลากหลายต่างชนิดกัน ทั้งนี้คณะกรรมการการตั้งชื่อระบบ HLA ขององค์การอนามัยโลกได้รายงานสรุปเมื่อปี พ.ศ. 2561 ว่าจำนวนยีนอัลลีลของ HLA-A, HLA-B และ HLA-C มีประมาณ 4.3, 5.2 และ 3.9×10^3 ยีนอัลลีล ตามลำดับ ขณะที่จำนวนยีนอัลลีลของ HLA-DP, HLA-DQ และ HLA-DR มีประมาณ 1.1, 1.2 และ 2.6×10^3 ยีนอัลลีลตามลำดับ⁽¹⁹⁾ เช่นกัน โดยแต่ละอัลลีลอาจพบมากน้อยใน

กลุ่มประชากรที่แตกต่างกัน

การถ่ายทอดทางพันธุกรรมของโมเลกุล MHC

โมเลกุล MHC class I สามารถแสดงออกและพบได้ในทุกเซลล์ร่างกายที่มีนิวเคลียส ขณะที่ MHC class II สามารถพบได้เฉพาะในเซลล์ที่ทำหน้าที่เป็น APC เช่น เด็นไดรติกเซลล์ แมคโครฟาจ และ B lymphocyte ส่วนเซลล์เม็ดเลือดแดงซึ่งเป็นเซลล์ที่ไม่มีนิวเคลียส จัดเป็นเซลล์ที่ไม่พบโมเลกุล MHC^(20, 21) ยีนอัลลีลสำหรับ HLA แต่ละโลคัสสืบทอดมาจากโครมาติดของพ่อและแม่สู่ลูก ทำให้มนุษย์แต่ละคนมียีนอัลลีลของ HLA แต่ละโลคัสไม่เกินสองชนิด ตัวอย่างเช่น หากโลคัส HLA-A ของลูกได้รับยีนอัลลีลที่มาจากเซลล์สืบพันธุ์ของพ่อและแม่ซึ่งเป็นแฮพลอยด์คนละชนิดคือมีความแตกต่างกันก็ทำให้ลูกมี HLA-A อยู่สองชนิดหรือสองยีนอัลลีลที่เรียกว่า heterozygous แต่ถ้ายีนอัลลีลจากเซลล์สืบพันธุ์ของพ่อและแม่เป็นชนิดเดียวกันก็ทำให้ลูกมียีนอัลลีลของ HLA-A เพียงชนิดเดียวหรือเรียกว่า homozygous ซึ่งการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของยีน HLA นี้เป็นการถ่ายทอดที่มีลักษณะ co-dominant หมายความว่ายีนอัลลีลแต่ละชนิดมีการแสดงออกเท่าเทียมกัน (ไม่มียีนอัลลีลใดเด่นกว่ากัน) ดังนั้นจำนวนยีนอัลลีลของ MHC class I ในแต่ละคนอาจมีได้ 3-6 ชนิด คือหากบุคคลใดมียีนอัลลีลของ MHC class I เป็น homozygous ทั้งสามโลคัสก็หมายความว่าบุคคลนั้นมียีนอัลลีลของ MHC class I เพียงสามชนิด แต่คนที่มี MHC class I เป็น heterozygous อยู่หนึ่งโลคัสและอีกสองโลคัสเป็น homozygous บุคคลนั้นก็มียีนอัลลีลของ MHC class I สี่อัลลีล ส่วนคนที่เป็น heterozygous ทั้งสามโลคัสก็มียีนอัลลีลของ MHC class I หกชนิด การถ่ายทอดดังกล่าวนี้มีลักษณะเดียวกันกับ HLA โลคัสอื่น ๆ ทั้ง HLA-B และ HLA-C รวมทั้งของ MHC class II

ด้วย ทั้งนี้เนื่องจากจำนวนยีนอัลลีล ของ HLA แต่ละโลคัสมีมากมายหลากหลายกว่าพันชนิดและรวมกันทั้งหมดก็มีมากกว่าหมื่นชนิด⁽¹⁹⁻²¹⁾ โอกาสที่จะพบผู้ที่มี HLA alleles เหมือนกันทั้งหมดจึงเป็นเรื่องยากมากและมักพบได้เฉพาะในคนที่เป็ยคู่แฝดไข่ใบเดียวกัน ทั้งนี้ HLA ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลสูงและเป็นโมเลกุลเชิงซ้อนจึงมีสมบัติเป็นแอนติเจน สามารถชักนำให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในแต่ละบุคคลได้ จึงเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้การปลูกถ่ายอวัยวะระหว่างผู้ให้และผู้รับเกิดความไม่เข้ากัน (incompatible organ transplantation)^(22, 23)

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันกับบทบาทของโมเลกุล MHC

แอนติเจนต้องการโมเลกุล MHC เพื่อประกอบเป็นโมเลกุลเชิงซ้อน MHC-peptide complex ซึ่งสามารถกระตุ้น T lymphocyte โคลนต่างชนิดกันอย่างจำเพาะ โดยแอนติเจนต้องผ่านกระบวนการที่เรียกว่า antigen processing เพื่อให้โมเลกุล MHC allele เข้าจับกับเปปไทด์สายสั้นหรือ T cell epitope กลายเป็น MHC-peptide complex ก่อนส่งไปยังผิวเซลล์ของ APC เพื่อกระตุ้น T cell แต่ละโคลน กระบวนการ antigen processing มีสองแบบคือ endogenous antigen processing pathway (antigen processing class I) เพื่อกระตุ้น cytotoxic T lymphocyte (Tc) และ exogenous antigen processing pathway (antigen processing class II) เพื่อกระตุ้น helper T lymphocyte (Th) ผ่านโมเลกุล TCR ของ T lymphocyte แต่ละโคลน^(24, 25) โดย MHC-peptide complex ที่แตกต่างกันจะจับกับ TCR เพื่อกระตุ้น T lymphocytes โคลนต่างกันอย่างจำเพาะ (MHC restriction)^(26, 27)

Endogenous antigen processing pathway เป็นกระบวนการนำเสนอชิ้นส่วนของเปปไทด์

จากภายในเซลล์รวมทั้งของเชื้อไวรัสด้วยการย่อยสลายในโปรติโอโซม เกิดเป็นเปปไทด์สายสั้นหรืออีพิโทปที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 8-15 เรสิดิวส์^(19, 23) ซึ่งเป็นขนาดที่พอเหมาะสำหรับจับภายในร่องจับ (groove) ของโมเลกุล MHC class I ได้เป็น MHC I-peptide complex เพื่อกระตุ้น Tc lymphocyte ด้วยกลไก class I MHC restriction⁽²⁸⁻³⁰⁾ ซึ่งเป็ยกลไกที่ทำให้ APC กระตุ้น naïve CD8⁺ T lymphocytes ให้กลายเป็น activated Tc cell ซึ่งจะพัฒนาเป็น effective Tc cell ที่สามารถเข้าโจมตีเซลล์เป้าหมาย (target cell) เช่น เซลล์ติดเชื้อไวรัส (viral infected cells)^(31, 32) เนื่องจากกระบวนการ endogenous antigen processing pathway เกิดขึ้นกับโมเลกุลที่อยู่ภายในเซลล์รวมทั้งเชื้อไวรัสด้วย ดังนั้นโปรตีนที่มีอยู่ตามปกติในเซลล์ก็ต้องผ่านกระบวนการนี้เช่นกัน อย่างไรก็ตาม antigen processing กับเปปไทด์ของเซลล์ตัวเอง จะไม่กระตุ้น Tc lymphocyte ของตัวเอง เนื่องจากเซลล์ Tc โคลนที่จดจำเปปไทด์ของตัวเอง (autologous Tc clones) ถูกกำจัดตั้งแต่ระยะแรกของการพัฒนาเซลล์ T lymphocyte ตามขั้นตอนการคัดเลือกแบบ negative selection ซึ่งกำจัด T cell clone ที่มี TCR ต่อโมเลกุลใดของเซลล์ตัวเองออกไปเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันต่อต้านเซลล์ตัวเอง (autoimmunity) ในภายหลัง จึงมีเพียงแอนติเจนหรือเปปไทด์แปลกปลอม เช่น เปปไทด์ของไวรัสที่สามารถกระตุ้นเซลล์ Tc lymphocyte ทำให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบ cellular mediated immunity ต่อเชื้อไวรัสนั้นได้^(18, 31, 32)

ในทางกลับกัน exogenous antigen processing เป็นกระบวนการเพื่อนำเสนอสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจนที่อยู่ภายนอกเซลล์เท่านั้น โดยมีกลไกที่ค่อนข้างซับซ้อนกว่า endogenous antigen processing ทั้งนี้เนื่องจากโมเลกุล MHC class II

ที่เพิ่งเริ่มถูกสังเคราะห์ขึ้นและอยู่ใน rough endoplasmic reticulum (RER) ถูกยับยั้งด้วยโมเลกุลที่เรียกว่า invariant chain (Ii) ที่บริเวณร่องจับของโมเลกุล MHC class II กลายเป็น MHC II-Ii complex เป็นเหตุให้บริเวณร่องจับของโมเลกุล MHC Class II ไม่สามารถจับกับโมเลกุลใดจากเซลล์ของตัวเอง อย่างที่เกิดขึ้นกับกรณี endogenous antigen processing pathway จากนั้น MHC II-Ii complex จะถูกส่งผ่านเข้า Golgi body และเมื่อแอนติเจนถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอสและกรดในเอ็นโดโซม ก็ทำให้โมเลกุล Ii ถูกย่อยสลายไปด้วย แต่ยังคงมีเปปไทด์สายสั้นของ Ii เกาะกับบริเวณร่องจับของ MHC class II เรียกว่า CLIP (class II associated invariant chain peptide) เพื่อยังคงป้องกันไม่ให้ร่องจับของ MHC II เข้าจับกับโมเลกุลจากเซลล์ตัวเอง อย่างไรก็ตามเพื่อให้ T cell epitope จากภายนอก (exogenous epitope) ที่เข้ากันได้กับร่องจับสามารถเข้าจับกับโมเลกุล MHC class II ได้ โมเลกุล HLA-DM ซึ่งมีโครงสร้างคล้าย MHC class II ก็เข้าจับกับ CLIP ให้หลุดออกจากโมเลกุล MHC class II ส่งผลให้ T cell epitope ที่เข้ากันได้กับร่องจับของโมเลกุล MHC II มีโอกาสย้ายเข้าไปแทนที่ CLIP ทำให้เกิด MHC II-peptide complex และนำไปสู่พื้นผิวของ APC เพื่อกระตุ้น Th lymphocyte โคลนที่จำเพาะต่อไป^(26, 33) ทั้งนี้เปปไทด์ที่จับกับโมเลกุล MHC class II จะมีขนาดใหญ่กว่าเปปไทด์ที่จับกับ MHC class I ใน endogenous antigen processing โดยมีกรดอะมิโนประมาณ 15-20 เรสิดิวส์

การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อไวรัส

เชื้อไวรัสเป็นอนุภาคที่สามารถเพิ่มจำนวนได้เมื่ออยู่ในเซลล์เจ้าบ้าน (host) ที่มีความจำเพาะ อย่างไรก็ตาม อนุภาคของไวรัสพบได้ทั้งในและนอก

เซลล์ โดยอนุภาคไวรัสที่ถูกสร้างขึ้นใหม่ (progeny) จะถูกปล่อยออกนอกเซลล์เพื่อบุกรุกเข้าสู่เซลล์อื่นได้ ดังนั้นการต่อสู้กับการติดเชื้อไวรัสโดยภูมิคุ้มกันของร่างกายต้องอาศัยทั้งระบบ cellular mediated (CMIR) และ humoral mediated (HMIR) immune responses ซึ่งเป็นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันด้วยบทบาทของ Tc cell และแอนติบอดีตามลำดับ

โปรตีนของเชื้อไวรัสเกิดกระบวนการ antigen processing ที่เซลล์หลักสองชนิดคือ APC และเซลล์เป้าหมาย⁽²⁴⁾ โดยหลังจากที่ naïve Tc cell ถูกกระตุ้นด้วย APC ให้กลายเป็น activated Tc แล้ว Th cell ก็ช่วยส่งเสริมให้ activated T cell กลายเป็น effective Tc cell เข้าโจมตีเซลล์เป้าหมายที่ติดเชื้อไวรัส (viral infected cell) ต่อไป^(34, 35) นอกจากนี้ Th cell ยังมีบทบาทกระตุ้นให้ activated B lymphocyte พัฒนาเป็น plasma cell เพื่อผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะกับ อีพิโทป ของเชื้อไวรัส⁽³⁶⁾ ทั้งนี้ B lymphocyte และ Th cell ต่างมีบทบาทในการสร้างประโยชน์ซึ่งกันและกัน (reciprocal interaction) โดย B lymphocyte ทำหน้าที่เป็น APC กระตุ้น Th cell ที่มีความสัมพันธ์กัน (cognate Th cell) ขณะเดียวกัน cognate Th cell ก็ทำหน้าที่กระตุ้นให้ B lymphocyte พัฒนาเป็น plasma cells แล้วกลายเป็น memory B lymphocyte ซึ่งถือว่ามีความสำคัญมากเนื่องจาก memory B lymphocyte สามารถตอบสนองต่อการบุกรุกของเชื้อไวรัสที่เข้าสู่ร่างกายได้อย่างทันที่ด้วยการสร้างแอนติบอดีขึ้นมาอย่างรวดเร็วเพื่อเข้าจับอนุภาคของเชื้อไวรัสที่เข้ามาโจมตีอีกครั้ง (secondary viral infection) ก่อนที่เชื้อไวรัสจะสามารถเข้าจับกับเซลล์เป้าหมาย (viral attachment) จึงเป็นการป้องกันไม่ให้เชื้อไวรัสเข้าไปเพิ่มจำนวนและก่อให้เกิดพยาธิสภาพแก่ร่างกายได้ กลไกทางภูมิคุ้มกันดังกล่าวถือเป็นกลยุทธ์พื้นฐานใน

การผลิตวัคซีนไวรัสเพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส⁽³⁷⁾ ดังนั้นการได้รับวัคซีนไวรัสจึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบ adaptive immunity ให้สร้าง memory lymphocytes ซึ่งมีชีวิตอยู่ได้นานและที่สำคัญคือมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการรุกรานของเชื้อไวรัสได้อย่างรวดเร็ว แทนที่จะใช้เวลาอย่างน้อยหนึ่งสัปดาห์ดังกรณีการติดเชื้อครั้งแรก (primary infection) ดังนั้นผลจากการได้รับวัคซีนไวรัสจึงต้องสามารถทำให้ร่างกายมีการสร้างภูมิคุ้มกันเพื่อเข้ากำจัดเชื้อไวรัสได้ทันทั่วทั้ง และไม่เกิดพยาธิสภาพจากการติดเชื้อไวรัสอีก โดยเฉพาะ antibody ที่เข้าจับเพื่อขัดขวางไม่ให้เชื้อไวรัสเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย

กลยุทธ์เพิ่มประสิทธิภาพของวัคซีนไวรัสและความสำคัญของโมเลกุล MHC ต่อระบบสาธารณสุข

ดังได้กล่าวแล้วว่าโมเลกุล MHC มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยการสร้างโมเลกุล MHC-peptide complex ของเชื้อไวรัสเพื่อกระตุ้น Tc และ Th cells ผ่านการทำงานของกลุ่มเซลล์ที่ทำหน้าที่เป็น APC แต่เนื่องจากโมเลกุล MHC class I และ II มีมากมายหลากหลายอัลลีล⁽¹⁹⁻²¹⁾ ขณะที่แต่ละคนมียีนอัลลีลของ MHC แต่ละคลาสเพียง 3-6 ยีนอัลลีล จึงทำให้แต่ละคนมีโมเลกุล HLA อัลลีลที่สามารถเข้าจับกับเปปไทด์หรืออีพิโทปต่างชนิดกันของเชื้อไวรัสเพื่อสร้างโมเลกุลเชิงซ้อน MHC-peptide complex ได้อย่างจำกัด เป็นเหตุให้ Th cell บางโคลนไม่ถูกเหนี่ยวนำเนื่องจากไม่มีโมเลกุล MHC-peptide complex ที่มีความเข้ากันได้ ที่จะเหนี่ยวนำ TCR ของ Th cell โคลนนั้นหรือมีแรงจับ (affinity force) น้อยเกินไปที่จะทำให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันมากพอ^(27, 37, 38) เหตุผลนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Benacerraf และ

McDevitt^(39, 40) ซึ่งรายงานว่าหนูสายพันธุ์ต่างกันมีการตอบสนองเพื่อผลิตแอนติบอดีต่อเปปไทด์สังเคราะห์สายสั้นแตกต่างกัน โดยหนูสายพันธุ์ C57 ตอบสนองต่อพอลิเปปไทด์สังเคราะห์ (T, G) -A-L ได้ดีขณะที่หนูสายพันธุ์ CBA ตอบสนองได้ต่ำ นอกจากนี้ยังมีรายงานด้วยว่าผู้ที่มียีนอัลลีลของ MHC class II ต่างกันก็ให้ผลการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อไวรัสแต่ละชนิดแตกต่างกัน⁽⁴¹⁻⁴⁴⁾ แสดงว่า HLA อัลลีลเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้แต่ละคนมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อสารแปลกปลอมซึ่งรวมถึงเชื้อไวรัสแตกต่างกัน ซึ่งน่าจะเป็นเหตุผลอธิบายได้ว่าเหตุใดคนจำนวนหนึ่งจึงไม่ตอบสนองทางภูมิคุ้มกันหลังจากได้รับวัคซีนป้องกันไวรัส⁽¹⁻⁸⁾ ซึ่งรวมทั้งไวรัสตับอักเสบบี⁽⁹⁻¹⁴⁾ ดังที่กล่าวไว้ก่อนหน้านี้ ทั้งนี้อาจสันนิษฐานได้ว่า ผู้ได้รับวัคซีนเหล่านั้นขาดยีนอัลลีลของ HLA ที่เหมาะสมเพื่อสร้าง MHC-peptide complex ที่เข้ากันได้กับ TCR ของ T cells^(45, 46) เพื่อสร้างภูมิคุ้มกัน (seroprotection)

จากเหตุผลที่กล่าวมา จะเห็นได้ว่า Th cell เป็นเซลล์ภูมิคุ้มกันที่มีความสำคัญช่วยสร้างความสำเร็จในการทำหน้าที่ของทั้ง Tc และ B lymphocyte หากไม่มี Th cell โคลนที่เหมาะสมที่เรียกว่า cognate Th cell ก็จะทำให้ B lymphocyte สร้างแอนติบอดีได้เพียงชนิด IgM ซึ่งมีความเสถียรต่ำ cognate Th cell สามารถกระตุ้น B lymphocyte โคลนที่จำเพาะให้พัฒนาเป็น plasma cells เพื่อสร้างแอนติบอดีคลาสอื่น (IgG, IgA, IgE) และ memory B lymphocyte โดยแอนติบอดีมีความสำคัญในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสมากกว่า Tc lymphocyte เนื่องจากแอนติบอดีสามารถเข้าจับและยับยั้งไม่ให้อนุภาคไวรัสเข้าเกาะกับโมเลกุลตัวรับไวรัส (viral receptor molecule) ของเซลล์เป้าหมาย ทำให้ไวรัสไม่สามารถเข้าสู่เซลล์เป้าหมายและเพิ่มจำนวนได้ ขณะที่ Tc cell จะเริ่มทำงานได้ก็ต่อเมื่อเซลล์

เป้าหมายถูกรุกรานจากเชื้อไวรัสแล้ว เนื่องจากกลไกการทำงานของ Tc cell ต้องได้รับการเหนี่ยวนำจาก MHC I-peptide complex ที่มาจากเซลล์เป้าหมายที่ติดเชื้อไวรัสก่อนจึงจะเหนี่ยวนำให้ Tc cell เข้าจัดการทำลายได้ ดังนั้นการเหนี่ยวนำให้ได้ memory B cell จึงเป็นเป้าหมายสำคัญของวัคซีนไวรัสที่ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายต้องสร้างขึ้นให้ได้ ดังนั้นวัคซีนไวรัสควรมีอิมูโนโพรตีนที่สามารถจับกับ MHC II alleles ของผู้ได้รับวัคซีนไวรัส เพื่อสร้าง MHC II-peptide complex ที่สามารถกระตุ้น cognate Th cell โคลนที่เหมาะสมได้ ปัจจุบันวัคซีนไวรัสที่มีการผลิตในรูปแบบ subunit vaccine แต่ด้วยเหตุผลทั้งหมดที่กล่าวมานี้ ชี้ให้เห็นว่าวัคซีนไวรัสแบบ subunit viral vaccine ชนิดใดชนิดหนึ่งอาจไม่สามารถใช้ได้กับประชากรในทุกชุมชนหรือประชากรทั่วโลก เนื่องจากวัคซีนไวรัสควรมีอิมูโนโพรตีนที่เหมาะสมกับชนิดของ MHC alleles ในแต่ละคนหรือกลุ่มประชากรเป็นสำคัญด้วย แม้ว่าการผลิต subunit viral vaccine จะทำได้สะดวกด้วยเทคโนโลยีปัจจุบัน โดยเฉพาะเทคนิคทางอณูพันธุกรรม แต่ก็ทำให้เกิดปัญหาและคำถามถึงประสิทธิผลของวัคซีนต่อทุกกลุ่มประชากร การทดสอบ subunit viral vaccine กับสัตว์ทดลองซึ่งมักใช้สายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งในการศึกษา ทำให้เกิดข้อจำกัดในด้านความหลากหลายของโมเลกุล MHC แม้ว่า subunit viral vaccine ชนิดนั้นทำให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลองหรือกับประชากรที่ทำการทดสอบในเบื้องต้นได้ แต่เมื่อนำวัคซีนดังกล่าวมาใช้จริงกับประชากรอีกกลุ่มหนึ่งกลับให้ประสิทธิผลต่ำหรือไม่ได้ผลอย่างที่ควรเป็น เนื่องจากความไม่เหมาะสมของอิมูโนโพรตีนของวัคซีนกับโมเลกุล MHC alleles ของผู้ได้รับวัคซีนไวรัสในประชากรนั้น ดังนั้น หากต้องการผลิตวัคซีนในรูปแบบ subunit viral vaccine ก็ควรเป็นการผลิตอย่างมุ่งเป้าสำหรับประชากรแต่ละกลุ่มอย่างจำเพาะ ไม่เช่นนั้น

ก็ควรเป็น subunit viral vaccine ที่มีการผสมรวมกันเพื่อครอบคลุมอิมูโนโพรตีนของไวรัสชนิดนั้นให้ได้มากที่สุดหรือเทียบเท่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) และกรณีที่ไวรัสชนิดนั้นมีหลากหลายสายพันธุ์เช่น ไวรัสไข้หวัดใหญ่ ก็ควรมีการผสมรวมกันของสายพันธุ์ต่างชนิดอย่างเหมาะสม เพื่อเพิ่มโอกาสการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและป้องกันการระบาดได้

เป็นเรื่องที่น่าสนใจหากบุคลากรเทคนิคการแพทย์จะเข้ามามีส่วนร่วมในการป้องกันการระบาดของเชื้อไวรัสด้วยวัคซีนไวรัสให้เกิดผลสัมฤทธิ์มากขึ้น ด้วยการตรวจหาฮีนหรือโมเลกุล HLA alleles ของแต่ละคนอย่างทั่วถึง เช่นเดียวกับการตรวจกรุ๊ปเลือดในระบบ ABO และ Rh โดยจำเป็นต้องพัฒนาเทคนิคที่สะดวกและมีค่าใช้จ่ายที่เหมาะสมในการตรวจ ทั้งนี้ จะเห็นได้ว่าโมเลกุล HLA มีบทบาทสำคัญอย่างมากด้านภูมิคุ้มกันของร่างกาย ซึ่งนอกจากจะเกี่ยวข้องกับการปลูก/เปลี่ยนถ่ายอวัยวะ^(22, 23, 47) ดังเป็นที่ทราบกันแล้ว ยังมีรายงานเกี่ยวกับโรคภูมิคุ้มกันตนเอง⁽⁴⁸⁻⁵⁰⁾ โรคภูมิคุ้มกันไวเกิน^(51, 52) และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัส⁽⁴¹⁻⁴⁴⁾ ผลการตรวจหา HLA alleles สามารถใช้เป็นฐานข้อมูลด้านระบบสาธารณสุขเพื่อเพิ่มคุณภาพชีวิตแก่ประชากรได้มากขึ้นในหลายมิติ โดยสามารถใช้พยากรณ์โรคเพื่อป้องกันหรือหลีกเลี่ยงปัจจัยร่วมที่อาจทำให้เกิดโรคทางภูมิคุ้มกัน ส่วนด้านระบาดวิทยาของเชื้อไวรัสก็จะทำให้เราสามารถเข้าใจและผลิตวัคซีนไวรัสที่เหมาะสมกับแต่ละกลุ่มประชากรอย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ปัญหาที่สำคัญก็คือ HLA alleles มีความหลากหลายสูงมาก ทำให้เป็นเรื่องยากที่จะให้บริการตรวจหาโดยใช้เทคโนโลยีเท่าที่มีในปัจจุบันได้อย่างถ้วนทั่วด้วยค่าใช้จ่ายที่ทุกคนสามารถเข้าถึงได้ แม้มีการใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) เพื่อตรวจโมเลกุลอัลลีลของ HLA class I และ HLA class II ก็ตาม แต่ความหลากหลายของ HLA

อัลลีลที่มีอยู่สูงเป็นอุปสรรคสำคัญในการให้บริการตรวจหา HLA อัลลีลได้อย่างทั่วถึง ดังนั้น หน่วยงานหรือนักวิจัยที่มีศักยภาพควรเล็งเห็นความสำคัญของโมเลกุล HLA เพื่อพัฒนาเทคนิคการตรวจ HLA alleles อย่างจริงจัง จนทำให้การตรวจมีความง่ายและมีค่าใช้จ่ายเหมาะสม สามารถให้บริการแก่ประชากรได้อย่างครอบคลุม ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อระบบสาธารณสุขอย่างมากต่อไปในอนาคต

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมา มีการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง หลายประเทศมีการแจ้งเตือนหรือกำหนดมาตรการให้ประชาชนรับวัคซีนไวรัสตามกระแสข่าวการระบาดโดยไม่มีมาตรการตรวจสอบเพื่อพิสูจน์ตามกระบวนการวิทยาศาสตร์ว่าวัคซีนไวรัสดังกล่าวสามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันได้จริงหรือไม่กับประชากรในประเทศของตน ดังนั้นกระทรวงสาธารณสุขในแต่ละประเทศรวมทั้งประเทศไทยควรมีมาตรการกำหนดให้การรับวัคซีนไวรัสมีกระบวนการที่เป็นรูปธรรมอย่างครบถ้วนที่ไม่ได้เป็นเพียงการให้วัคซีนไวรัสจนครบจำนวนครั้ง แต่ต้องมีการตรวจสอบว่าผู้ที่ได้รับวัคซีนไวรัสมีการสร้างภูมิคุ้มกันหรือไม่ โดยหากผู้ได้รับวัคซีนไวรัสไม่มีการสร้างภูมิคุ้มกันหรือสร้างได้ไม่มากพอที่จะป้องกันการติดเชื้อไวรัสตามวัตถุประสงค์ของวัคซีนไวรัสนั้นนั้น บริษัทผู้ผลิตหรือจำหน่ายวัคซีนไวรัสก็ควรต้องชดเชยค่าใช้จ่ายทั้งหมดให้แก่ผู้บริโภคหรือผู้รับวัคซีนเนื่องจากไม่ได้ผลิตวัคซีนที่เหมาะสมให้เกิดผลสัมฤทธิ์แก่บุคคลนั้น แม้ว่ากรณีนี้อาจทำให้มีค่าใช้จ่ายสูงขึ้น แต่ก็เป็นการรับรองว่าผู้รับวัคซีนจะได้รับการคุ้มครองและเข้าใจสถานภาพของตัวเอง เพราะหากเข้าใจเพียงว่าการได้รับวัคซีนไวรัสจนครบจำนวนครั้งก็สามารถทำให้ตัวเองมีภูมิคุ้มกันแล้ว ก็อาจทำให้ผู้ที่

ได้รับวัคซีนไวรัส (แต่ไม่สามารถสร้างภูมิคุ้มกันได้) มีพฤติกรรมเสี่ยงด้วยความเข้าใจผิดและอาจทำให้มีโอกาสติดเชื้อไวรัสได้มากยิ่งขึ้น ดังนั้น จึงขอเสนอว่า สถาปนาเทคนิคการแพทย์ควรต้องร่วมผลักดันและประสานงานกับกระทรวงสาธารณสุขเพื่อกำหนดแนวทางให้การตรวจติดตามการสร้างภูมิคุ้มกันกับผู้รับวัคซีนไวรัส โดยให้เป็นส่วนหนึ่งของโปรแกรมการได้รับวัคซีนไวรัสเพื่อเป็นการสร้างกระบวนการที่ช่วยผลักดันให้ผู้ผลิตวัคซีนได้ตระหนักถึงผลสัมฤทธิ์ของวัคซีนไวรัสของตนอย่างมีความรับผิดชอบเพื่อพัฒนาการผลิตวัคซีนไวรัสที่ทำให้เกิดประสิทธิผลต่อทุกคนอย่างแท้จริง

สรุป

ปัญหาประสิทธิผลของวัคซีนไวรัสที่มีความแตกต่างในผู้รับวัคซีนแต่ละคน เกี่ยวข้องกับกระบวนการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันอันเนื่องมาจากความหลากหลายของโมเลกุล MHC ของแต่ละคน ทำให้ความสามารถในการจับกับอพิโทปของแอนติเจนแตกต่างกันและเป็นสาเหตุที่ทำให้วัคซีนไวรัสมีประสิทธิภาพที่แตกต่างกันในแต่ละคนหรือแต่ละกลุ่มประชากร นักเทคนิคการแพทย์โดยสถาปนาเทคนิคการแพทย์ควรผลักดันให้โปรแกรมการให้วัคซีนไวรัสครอบคลุมถึงการตรวจหาผลสัมฤทธิ์จากการได้รับวัคซีนไวรัสด้วย ไม่ใช่เพียงการให้วัคซีนให้ครบเท่านั้น โดยไม่ทราบว่าตัวผู้รับวัคซีนมีการสร้างภูมิคุ้มกันเพื่อต้านทานการติดเชื้อไวรัสนั้นจริงหรือไม่ และหากผู้รับวัคซีนไม่มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ก็ควรมีมาตรการเยียวยาและหาทางสร้างเสริมภูมิคุ้มกันหรือศึกษาหาทางร่วมกันเพื่อแก้ปัญหาตามกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. John TJ, Jayabal P. Oral polio vaccination of children in the tropics: I. the poor seroconversion rates and the absence of viral interference. *Am J Epidemiol* 1972; 96: 263-9.
2. Paul Y. Oral polio vaccines and their role in polio eradication in India. *Expert Rev Vaccines* 2009; 8: 35-41.
3. Su WJ, Shao PL, Liu MT, *et al.* Low seroprotection against preseasonal influenza local strains in children might predict the upcoming epidemic influenza strains. *Clin Infect Dis* 2010; 51: 171-6.
4. Fairhead T, Hendren E, Tinckam K, *et al.* Poor seroprotection but allosensitization after adjuvanted pandemic influenza H1N1 vaccine in kidney transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2012; 14: 575-83.
5. Moon SJ, Lee SH, Byun YH, *et al.* Risk factors affecting seroconversion after influenza A/H1N1 vaccination in hemodialysis patients. *BMC Nephrol* 2012; 13: 165.
6. Chansiripornchai N. Field study of seroconversion of three different commercial vaccines of chicken infectious anemia virus in Thailand. *Thai J Vet Med* 2016; 46: 699-704
7. Song JY, Woo HJ, Cheong HJ, *et al.* Long-term immunogenicity and safety of inactivated Hantaan virus vaccine (Hantavax™) in healthy adults. *Vaccine* 2016; 34: 1289-95.
8. Evdokimov K, Sayasinh K, Nouanthong P, *et al.* Low and disparate seroprotection after pentavalent childhood vaccination in the Lao People's Democratic Republic: a cross-sectional study. *Clin Microbiol Infect* 2017; 23: 197-202.
9. Ribeiro TM, Azevedo RS. Seroconversion of hepatitis B vaccine in infants related to the mother's serostatus in a community of São José dos Campos, state of São Paulo, Brazil. *Clinics* 2006; 61: 387-94.
10. Tsebe KV, Burnett RJ, Hlungwani NP, *et al.* The first five years of universal hepatitis B vaccination in South Africa: evidence for elimination of HBsAg carriage in under 5-year-olds. *Vaccine* 2001; 19: 3919-26.
11. Luo Z, Li L, Ruan B. Impact of the implementation of a vaccination strategy on hepatitis B virus infections in China over a 20-year period. *Int J Infect Dis* 2012; 16: e82-e88.
12. Guho A, Ahad A, Salam A, *et al.* Seroconversion after recombinant hepatitis B vaccination. *J Med* 2010; 11: 143-50.
13. Lu CY, Ni YH, Chiang BL, *et al.* Humoral and cellular immune responses to a hepatitis B vaccine booster 15-18 years after neonatal immunization. *J Infect Dis* 2008; 197: 1419-26.
14. Posuwan N, Vorayingyong A, Jaroonvanichkul V, *et al.* Implementation of hepatitis B vaccine in high-risk young adults with waning immunity. *PLoS One* 2018; 13: e0202637.

15. Hume DA. Macrophages as APC and the dendritic cell myth. *J Immunol* 2008; 181: 5829-35.
16. Wetzel SA, Parker DC. MHC transfer from APC to T cells following antigen recognition. *Crit Rev Immunol* 2006; 26: 1-21.
17. Halenius A, Gerke C, Hengel H. Classical and non-classical MHC I molecule manipulation by human cytomegalovirus: so many targets—but how many arrows in the quiver? *Cell Mol Immunol* 2015; 12:139-53.
18. Kelly A, Trowsdale J. Genetics of antigen processing and presentation. *Immunogenetics* 2019; 71: 161-70.
19. Marsh SGE, & WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System. Nomenclature for factors of the HLA system, update September 2018. *Hum Immunol* 2018; 79: 902-14.
20. Agrawal S, Kishore MC. MHC class I gene expression and regulation. *J Hematother Stem Cell Res* 2000; 9: 795-812.
21. Drozina G, Kohoutek J, Jabrane-Ferrat N, Peterlin BM. Expression of MHC II genes. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005; 290: 147-70.
22. Kransdorf EP, Pando MJ, Gragert L, Kaplan B. HLA Population genetics in solid organ transplantation. *Transplantation* 2017; 101: 1971-6.
23. Cusick MF, Jindra PT. Human leukocyte antigen epitope matching in solid organ transplantation. *Clin Lab Med* 2018; 38: 595-605.
24. Lázaro S, Gamarra D, Del Val M. Proteolytic enzymes involved in MHC class I antigen processing: A guerrilla army that partners with the proteasome. *Mol Immunol* 2015; 68: 72-6.
25. Roche PA, Furuta K. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol*. 2015; 15: 203-16.
26. Schmitt L, Boniface JJ, Davis MM, Mcconnell HM. Conformational isomers of a class II MHC-peptide complex in solution. *J Mol Biol* 1999; 286: 207-18.
27. Zarutskie JA, Sato AK, Rushe MM, *et al.* A conformational change in the human major histocompatibility complex protein HLA-DR1 induced by peptide binding. *Biochemistry* 1999; 38: 5878-87.
28. Pamer E, Cresswell P. Mechanisms of MHC class I—restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 323-58.
29. Bouvier M, Wiley DC. Structural characterization of a soluble and partially folded class I major histocompatibility heavy chain/beta 2m heterodimer. *Nat Struct Biol* 1998; 5: 377-84.
30. Zarling AL, Luckey CJ, Marto JA, *et al.* Tapasin is a facilitator, not an editor, of class I MHC peptide binding. *J Immunol* 2003; 171: 5287-95.

31. Shastri N, Schwab S, Serwold T. Producing nature's gene-chips: the generation of peptides for display by MHC class I molecules. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 463-93.
32. Groothuis TAM, Neefjes J. The ins and outs of intracellular peptides and antigen presentation by class I MHC molecules. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005; 300: 127-48.
33. Schmitt L, Boniface JJ, Davis MM, McConnell HM. Kinetic isomers of a class II MHC-peptide complex. *Biochemistry* 1998; 37: 17371-80.
34. Momburg F, Hengel H. Corking the bottleneck: the transporter associated with antigen processing as a target for immune subversion by viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; 269: 57-74.
35. D'Alicandro V, Romania P, Melaiu O, Fruci D. Role of genetic variations on MHC class I antigen-processing genes in human cancer and viral-mediated diseases. *Mol Immunol* 2018; S0161-5890 (18) 30103-2.
36. Berzofsky JA. T-B reciprocity. An Ia-restricted epitope-specific circuit regulating T cell-B cell interaction and antibody specificity. *Surv Immunol Res* 1983; 2: 223-9.
37. Murin CD, Wilson IA, Ward AB. Antibody responses to viral infections: a structural perspective across three different enveloped viruses. *Nat Microbiol* 2019; 4: 734-47.
38. Shirai M, Arichi T, Chen M, *et al.* T Cell Recognition of hypervariable region-1 from hepatitis C virus envelope protein with multiple class II MHC molecules in mice and humans: preferential help for induction of antibodies to the hypervariable region. *J Immunol* 1999; 162: 568-76.
39. Benacerraf B, McDevitt HO. Histocompatibility-linked immune response genes. *Science* 1972; 75: 273-9.
40. McDevitt H. The discovery of linkage between the MHC and genetic control of the immune response. *Immunol Rev* 2002; 185: 78-85.
41. Konnai S, Takeshima SN, Tajima S, *et al.* The influence of ovine MHC class II DRB1 alleles on immune response in bovine leukemia virus infection. *Microbiol Immunol* 2003; 47: 223-32.
42. Sarri CA, Markantoni M, Stamatis C, *et al.* Genetic contribution of MHC class II genes in susceptibility to West Nile virus infection. *PLoS One*. 2016; 11: e0165952. doi: 10.1371/journal.pone.0165952.
43. Tregoning JS, Yamaguchi Y, Wang B, *et al.* Genetic susceptibility to the delayed sequelae of neonatal respiratory syncytial virus infection is MHC dependent. *J Immunol* 2010; 185: 5384-9.
44. Luckey D, Weaver EA, Osborne DG, *et al.* Immunity to Influenza is dependent on MHC II polymorphism: study with 2 HLA transgenic strains. *Sci Rep* 2019; 9: 19061.

45. Hansen TH, Lybarger L, Yu L, Mitaksov V, Fremont DH. Recognition of open conformers of classical MHC by chaperones and monoclonal antibodies. *Immunol Rev* 2005; 207: 100-11.
46. Wieczorek M, Sticht J, Stolzenberg S, *et al.* MHC class II complexes sample intermediate states along the peptide exchange pathway. *Nat Commun* 2016; 7: 13224.
47. Ayala García MA, González Yebra B, López Flores AL, Guaní Guerra E. The major histocompatibility complex in transplantation. *J Transplant* 2012; 842141.
48. Mai W, Liu X, Wang J. *et al.* Protective effects of CX3CR1 on autoimmune inflammation in a chronic EAE model for MS through modulation of antigen-presenting cell-related molecular MHC-II and its regulators. *Neurol Sci* 2019; 40: 779-91.
49. Kyriakidis NC, Kockum I, Julkunen H, *et al.* European families reveal MHC class I and II associations with autoimmune-mediated congenital heart block. *Ann Rheum Dis* 2018; 77: 1381-2.
50. Matzaraki V, Kumar V, Wijmenga C. *et al.* The MHC locus and genetic susceptibility to autoimmune and infectious diseases. *Genome Biol* 2017; 18: 76.
51. Wu H, Whritenour J, Sanford JC, Houle C, Adkins KK. Identification of MHC haplotypes associated with drug-induced hypersensitivity reactions in *Cynomolgus* monkeys. *Toxicol Pathol* 2017; 45: 127-33.
52. Sachiko O, Tetsuya H, Kenji K. Requirement of MHC class I on radioresistant cells for granzyme B expression from CD8⁺ T cells in murine contact hypersensitivity. *J Dermatol Sci* 2018; 90: 98-101.

การพัฒนาวิธี Multiplex PCR จากโคลนีเพื่อแยกเชื้อ *Streptococcus suis* serotype 2 ออกจาก serotype 1/2

นิสาร์ตัน พูลอนันต์¹ และ เริงวิทย์ บุญโยม^{2*}

¹กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์และพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์ จังหวัดนครสวรรค์

²ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

บทคัดย่อ

Streptococcus suis (*S. suis*) เป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคจากสัตว์สู่คนที่กลับมาระบาดใหม่ โดยแบคทีเรียชนิดนี้ก่อให้เกิดพยาธิสภาพหลายระบบของร่างกาย เช่น เยื่อหุ้มสมองอักเสบ ภาวะโลหิตเป็นพิษ เยื่อหูอักเสบ โรคปอดบวม กระทั่งการเสียชีวิต ปัจจุบันวิธีการแยกสายพันธุ์โดยใช้ความแตกต่างระดับโมเลกุลไม่สามารถแยกความแตกต่างของ *S. suis* serotype 2 จาก serotype 1/2 เนื่องจากยีน *cps* ของ serotypes ทั้งสองมีลำดับเบสที่คล้ายกันมาก ดังนั้นงานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธี multiplex PCR จากโคลนีของเชื้อโดยตรง ซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้ได้รับการออกแบบให้ครอบคลุมส่วนที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับสารพันธุกรรมในตำแหน่งระหว่างยีน *cpsS* และ *cpsT* ร่วมกับไพรเมอร์ที่ได้รับการตีพิมพ์แล้วเพื่อใช้แยก *S. suis* serotype 2 ออกจาก serotype 1/2 ผลการวิจัยชี้ให้เห็นว่าวิธี multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นสามารถแยกความแตกต่างระหว่าง serotypes ของเชื้อมาตรฐานทั้งสองได้ และมีความจำเพาะต่อ *S. suis* โดยไม่พบผลผลิตของ PCR เมื่อทดสอบกับแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบชนิดอื่น ๆ พบเฉพาะผลผลิตของ PCR ที่เกิดจากชุดไพรเมอร์ควบคุมเท่านั้น นอกจากนี้วิธี multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจ *S. suis* ได้จำนวนอย่างน้อย 100 CFU จึงอาจสรุปได้ว่าวิธี multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นสามารถแยก serotype 2 ออกจาก serotype 1/2 ได้ นอกจากนี้เทคนิคที่ได้พัฒนาขึ้นมีความไว ความจำเพาะ เป็นวิธีที่ง่าย และประหยัด อย่างไรก็ตามก่อนนำวิธีดังกล่าวไปใช้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิกหรือในการศึกษาทางระบาดวิทยา ควรทดสอบเพิ่มเติมกับเชื้อ *S. suis* serotype อื่น ๆ หรือแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่ใกล้เคียงเพิ่มเติม

คำสำคัญ: *Streptococcus suis*, Molecular serotyping, Colony multiplex PCR, Serotype 2

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

รับบทความ: 6 กุมภาพันธ์ 2563

แก้ไขบทความ: 29 เมษายน 2563

รับตีพิมพ์บทความ: 9 กรกฎาคม 2563

Development of Colony Multiplex PCR for Rapid Identification of *Streptococcus suis* serotype 2 and 1/2

Nisarath Poonanan¹ and Rerngwit Boonyom^{2*}

¹Medical Technology and Clinical Pathology Division, Sawanpracharak Hospital,
Nakhon Sawan Province, Thailand

²Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University,
Phitsanulok Province, Thailand

Abstract

Streptococcus suis (*S. suis*) is an emerging zoonotic. This bacterium causes many pathological conditions such as, meningitis, septicemia, endocarditis, septic arthritis and death. To date, molecular serotyping method has not distinguished *S. suis* serotype 2 from serotype 1/2 because *cps* genes of these serotypes share highly similar sequences. In this study, multiplex PCR assay was developed to distinguish *S. suis* serotype 2 from 1/2. New set of primers were designed for amplification of variable regions in nucleotide spacer between *cpsS* gene and *cpsT* gene combining with published primer set. The result indicated that the colony multiplex PCR assay is able to differentiate these two serotypes in reference strains. For specificity test, several gram positive and negative bacteria were tested and amplicons were detected only when using universal primer set. The PCR showed limit of detection for *S. suis* at 100 CFU/reaction. It was concluded that this assay is sensitive, specific, simple and cost-effective. However, before this method could be performed for clinical microbiology laboratory or for epidemiological studies the multiplex PCR assay should be further evaluated with more *S. suis* serotypes and related bacterial species.

Keywords: *Streptococcus suis*, Molecular serotyping, Colony multiplex PCR, Serotype 2

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

Received: 6 February 2020

Revised: 29 April 2020

Accepted: 9 July 2020

Introduction

Streptococcus suis (*S. suis*) is a gram-positive coccus bacterium existing as singles, in pairs or in short chains. They can grow in the atmospheric condition with 5-7% carbon dioxide. Previously, these bacteria were classified into 35 serotypes, 1-34 and 1/2 by distinct capsular polysaccharide.⁽¹⁾ However, serotypes 20, 22, 26, 33 and 34 have recently been shown to belong to new bacterial species. Therefore, *S. suis* species currently comprises a total 29 serotypes.^(2,3) *S. suis* could generally be found in pigs and transmits to human being, causing zoonosis. The most commonly severe illness in human is *S. suis* serotype 2.⁽⁴⁾ The first case of human infected by *S. suis* was reported in Denmark in 1968.⁽⁵⁾ In 2018, the epidemiological surveillance report of Department of Disease Control, Thailand Ministry of Public Health revealed 317 cases of *S. suis* infection. Most reports were from northern region of Thailand.⁽⁶⁾ The majority of these cases caused by consumption of raw pork such as spicy raw pork salad, raw blood, etc. The most common illness found in human caused by *S. suis* is meningitis. Secondly, serious septicemia might lead to toxic shock syndrome. Other illnesses include sudden hearing loss (SHL) that leads to infection with pus, peritonitis infection, etc.⁽⁷⁾

Diagnosis of patients, infected with *S. suis* can be done in the laboratories by bacterial culture from the patient's blood sample, cerebrospinal fluid or joint fluid. Diagnosis can also be accomplished by

biochemical test, but this would often give inaccurate results. Moreover, diagnosis of *S. suis* and identification of serotype can also be done by coagglutination test using serotype-specific antiserum. However, this method is costly and cannot be conducted in an ordinary laboratory.⁽⁸⁻¹¹⁾ There are reports of cross reaction between serotypes⁽¹²⁾. Moreover, some isolates were untypeable by a coagglutination test using serotype-specific antisera caused by mutations or deletions of *cps* gene.^(13, 14) As a result, reports were ambiguous interpretation. At present, molecular biology techniques, is a more specific, sensitive and faster method for identification of *S. suis*. Furthermore, multiplex PCR technique has been developed for the investigation of various serotypes of *S. suis* at the same time. An example was conducted by Lui, *et al.*,⁽¹⁵⁾ who reported using of multiplex PCR to investigate *S. suis* and had identified 33 strains of serotypes, except serotype 32 and 34. Okura, *et al.*,⁽¹⁶⁾ applied multiplex PCR method to identify all 35 serotypes of *S. suis*. Additionally, Kerdsin *et al.*⁽¹⁷⁾ used multiplex PCR to separate and identify 29 serotypes of *S. suis* by using *cps* gene that was specific for each serotype. However, the previous studies had not been able to separate *S. suis* serotype 2 from serotype 1/2. Therefore, this study aimed to develop colony multiplex PCR assay to diagnose *S. suis* serotype 2 that commonly causes serious illness in human and was able to quickly distinguish between *S. suis* serotype 2 and serotype 1/2.

Materials and Methods

Bacterial strains

S. suis serotype 1, 2 and 1/2 reference strains used in this study were purchased from the culture collection of the Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health of Thailand. Moreover, reference strains of other bacteria are listed in Table 1.

Oligonucleotide primers design

Three sets of primer (Biobasic, Canada) were listed in Table 2. The first set of primer was according to the previous study.⁽¹³⁾ These primers were specific for *S. suis* serotype 2 and serotype 1/2. The second set of primer was designed to distinguish *S. suis* serotype 2 from serotype 1/2. This set

of primer generates different sizes of PCR product from *S. suis* serotype 2 and serotype 1/2. These oligonucleotide primers were designed by alignments of nucleotides spacer between *cpsS* and *cpsT* genes from *S. suis* serotype 2 strain P1/7 (accession number BR001000) and *S. suis* serotype 1/2 strain 2651 (accession number AB737816). This primer set amplifies IS630 transposases encoding sequences in nucleotides spacer sequences. The third pair of primers were 16s rRNA universal primers. This set of primer was used as PCR condition control.

Genomic DNA Extraction

Genomic DNA from all bacterial strains were extracted and purified by using

Table 1 Bacterial strains used in this study

Species	Strain	Source
<i>Streptococcus suis</i> serotype 1	DMST 26745	a
<i>Streptococcus suis</i> serotype 1/2	DMST 26744	a
<i>Streptococcus suis</i> serotype 2	DMST 18783	a
<i>Streptococcus pyogenes</i>	DMST 17020	a
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	DMST 7945	a
<i>Streptococcus viridans</i>		clinical isolate
<i>Staphylococcus aureus</i>	DMST 8013	a
<i>Escherichia coli</i>	MG 1655	b
<i>Salmonella</i> Typhimurium	SL 1344	c

a: Culture collection of the Department of Medical Sciences, The Ministry of Public Health of Thailand.

b: *E. coli* Genetic Stock Center, Yale, U.S.A.

c: *Salmonella* Genetic Stock Centre, Alberta, Canada.

Table 2 List of primer sets used in this study

Primer set	Primer name	Sequence (5'-3')	PCR product size (bp)	Source
1 st		F: GATTTGTCGGGAGGGTTACTTG R: TAAATAATATGCCACTGTAGCGTCTC	455	Lun, <i>et al.</i> , 2007. ⁽¹⁾
2 nd	SuF	F: CCGCCTAATAACAAGGTATCTATCC		
	SuR	R: GGGCTGTGACATAATGAATCCTCC	988	This study
3 rd	16F	F: GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGG		
	16R	R: CTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTC	697	This study

TIANamp Genomic DNA kit (TianGenTM, China) according to the manufacturer's instructions. Briefly, bacterial cells were lysed with lysozyme and proteinase K. Genomic DNA in suspension was precipitated by 95% ethanol and purified with silica membrane column. Bacterial genomic DNA was eluted with molecular biology grade water and stored at -20°C until used.

Multiplex PCR and colony multiplex PCR conditions

For multiplex PCR, 50 ng of bacterial genomic DNA was used as template. For colony multiplex PCR, DNA template was obtained directly from a bacterial colony. A single small bacterial colony approximately 1 mm in diameter was picked to PCR tube as DNA template. The total PCR reaction mixture (20 µL) consisted of 3 sets of primers (0.5 µM of each primer), 10 µL of 2X My TaqTM HS Red Mix (Bioline, USA) and DNA template.

The final volume was adjusted to 20 µL with distilled water. The amplification parameters of PCR were 95°C for 5 min, followed by 30 cycles of 95°C for 30 sec, 56°C for 30 sec and 72°C for 1 min. Then, final extension was at 72°C for 5 min. The amplification products were separated by 1.5% agarose gel electrophoresis and visualized under UV transilluminator.

Specificity and sensitivity of colony multiplex PCR assay

For specificity test, six bacterial strains including *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*), *S. pneumonia*, *S. viridans*, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Salmonella* Typhimurium (*S. Typhimurium*) were used as DNA templates for multiplex PCR amplification. In addition, genomic DNA or colony of *S. suis* serotype 2 were used as positive control. The sensitivity of colony multiplex PCR was performed by

detection of 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 and 1 CFU of *S. suis* serotype 2 strain. The PCR conditions were performed as previously described. Then, PCR amplification products were analyzed by agarose gel electrophoresis and checked for predicted size product.

Results

Specific primers distinguish between serotype 2 and 1/2 of *S. suis*

The similarity level of nucleotide sequences of nucleotides spacer between *cpsS* and *cpsT* genes (approximately 6,700 bp) from *S. suis* serotype 2 strain P1/7 (accession number BR001000) and *S. suis* serotype 1/2 strain 2651 (accession number AB737816) is shown in Fig. 1. The alignment results show that these sequences were highly identical (91.7%). However, nucleotides at position 1,275 to 2,180 of *S. suis* serotype 2 differed from nucleotides location 1,283 to 2,171 of *S. suis* serotype 1/2. These variable regions were selected as a tool to distinguish between serotype 2 and 1/2 of *S. suis*. Firstly, the experiments were designed using polymerase

chain reaction combining with restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) for separating *S. suis* serotype 2 and 1/2. Then, primers upstream and downstream of these variable regions were manually designed, given name suF and suR primers, respectively (Fig. 2). It was expected that this pair of primers would generate PCR products (approximately 1 kb) from *S. suis* serotype 2 and 1/2. PCR products from both serotypes were then digested with MseI restriction enzyme. Expected DNA fragments from digestion of MseI restriction enzyme with PCR products from *S. suis* serotype 2 were predicted to generate 7 DNA fragments (17, 34, 38, 51, 162, 168 and 518 bp). In contrast, *S. suis* serotype 1/2 PCR products gave 6 fragments; 17, 34, 43, 162, 196 and 526 bp (Fig. 2). Surprisingly, approximately 1 kb PCR product was amplified only from DNA template from *S. suis* serotype 2 reference strains, DMST 18783, while DNA template from *S. suis* serotype 1/2 reference strain, DMST 26744, generated PCR products in under expected size (approximately 90 bp)

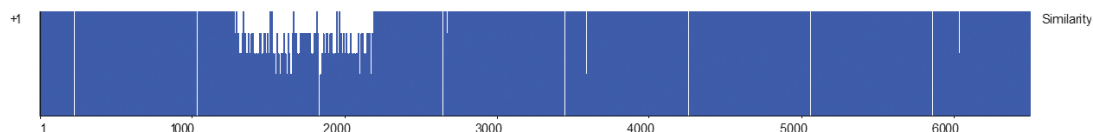


Fig. 1 The similarity level of nucleotides spacer between *cpsS* and *cpsT* genes from *S. suis* serotype 2 strain P1/7 (accession number BR001000) and *S. suis* serotype 1/2 strain 2651 (accession number AB737816). The X-axis indicates the length of sequences, and the y-axis indicates the level of similarity at each position in the alignment.

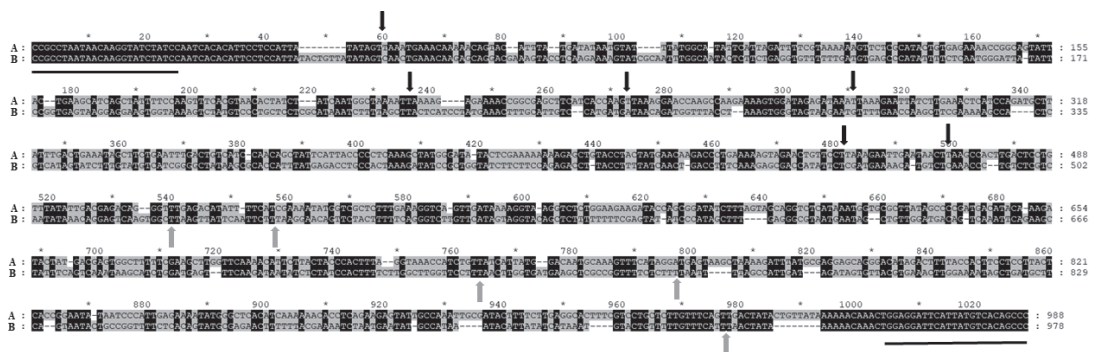


Fig. 2 The difference of variable regions of nucleotides spacer between *cpsS* and *cpsT* genes from *S. suis* serotype 2 strain P1/7 (accession number BR001000) and *S. suis* serotype 1/2 strain 2651 (accession number AB737816). A and B indicate nucleotide sequences from *S. suis* serotype 2 and 1/2, respectively. Black shaded letters indicate identical nucleotides. Gray shaded letters indicate different nucleotides. Gaps between sequences are indicated as dash symbol. Black arrows indicate cleavage sites for MseI restriction enzyme on nucleotide sequences from *S. suis* serotype 2. Gray arrows indicate cleavage sites for MseI restriction enzyme on nucleotide sequences from *S. suis* serotype 1/2. Nucleotide sequences designed as primers are underlined

(Fig. 3A). PCR products from *S. suis* serotype 2 and 1/2 were purified, sequenced and determined similarity using BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) program. DNA sequencing result of PCR product from *S. suis* serotype 2 showed 99.4% identity with DNA sequences from *S. suis* serotype 2 strain P1/7 (Fig. 3B). Additionally, DNA sequencing result from PCR product of *S. suis* serotype 1/2 showed 100% identity with DNA sequences from chromosome 1 of *S. suis* serotype 1 strain NTCTC10237 (Fig. 3C). After that, genomic DNA from *S. suis* serotype 1 reference strain, DMST 26745, was extracted and used as template for PCR amplification with suF and suR primers. The PCR product showed the same molecular weight as the PCR product

from *S. suis* serotype 1 (approximately 90 bp) (Fig. 4A), and the nucleotide sequences of the PCR product from *S. suis* serotype 1 showed 100% identity with DNA sequence from *S. suis* serotype 1/2 PCR product (Fig. 4B). From these results, it was concluded that the nucleotide sequences amplified from *S. suis* serotype 1/2 and 1 were identical. In addition, this set of primer was able to distinguish between *S. suis* serotype 2 and 1/2.

Identification of *S. suis* serotype 1, 1/2 and 2 by multiplex PCR and colony multiplex PCR assay

Before using multiplex PCR for serotype identification, all three pairs of primers were individually performed for

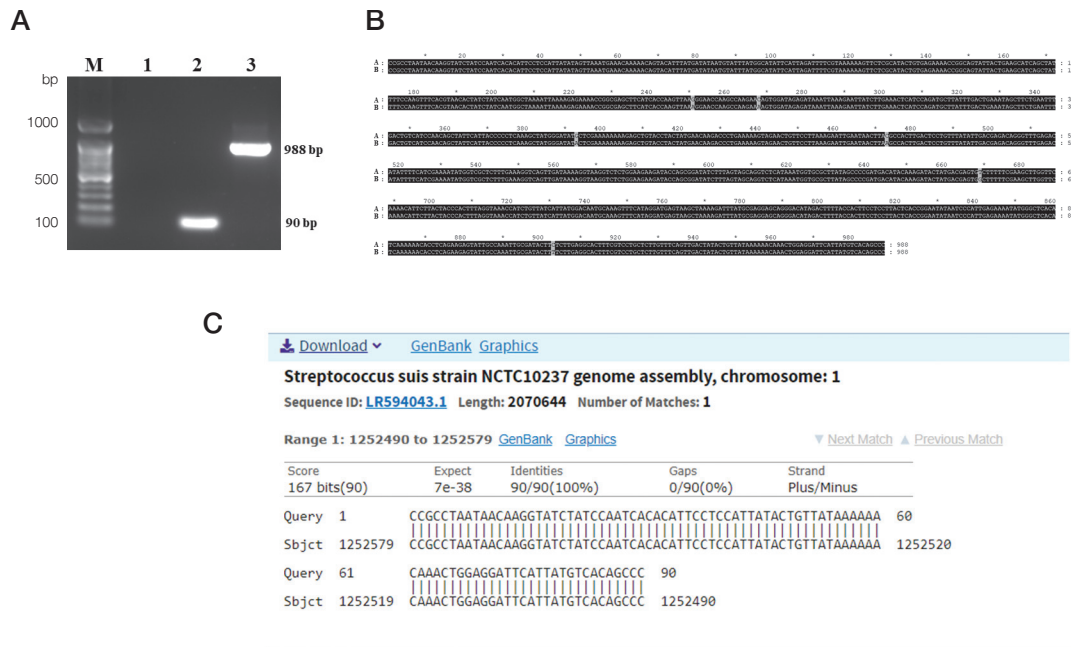


Fig. 3 (A) EtBr stained agarose gel of PCR product amplified from *S. suis* serotype 1/2 and 2. Lane M: 100 bp DNA marker, lane 1: negative control, lane 2: *S. suis* serotype 1/2 PCR product, lane 3: *S. suis* serotype 2 PCR product. (B) . Nucleotide sequences alignment results of PCR product amplified from *S. suis* serotype 2 and DNA sequences from *S. suis* serotype 2 strain P1/7. A and B indicate nucleotide sequences from PCR product of *S. suis* serotype 2 and DNA sequences from *S. suis* serotype 2 strain P1/7, respectively. Black shaded letters indicate identical nucleotides. Gray shaded letters indicate different nucleotides. (C) DNA sequencing result from PCR product from *S. suis* serotype 1/2 compared using Nucleotide BLAST to DNA sequences from *S. suis* serotype 1 strain NTCTC10237. Query sequence file: PCR product from *S. suis* serotype 1/2 sequencing, Subject file: DNA sequences from *S. suis* serotype 1 strain NTCTC10237. 100% matches across 90 base pairs

monoplex PCR assay. Genomic DNA of *S.suis* serotype 1, 1/2 or 2 were used as DNA template to verify ability of each set of primer. The results showed that monoplex PCR with each set of primer produced expected amplification products (Fig. 5A) . Both *S.suis* serotype 1/2 and 2 gave a 455 bp DNA fragment from the first set of primer. For second set of

primer, *S. suis* serotype 2 generated a 988 bp PCR product, while *S.suis* serotype 1 and 1/2 produced 90 bp DNA fragments. For the third pair of primers (universal primers), all serotypes of *S.suis* generated 697 bp PCR products.

For multiplex PCR, amplification of all the three serotypes of *S. suis* were successfully observed in expected bands.

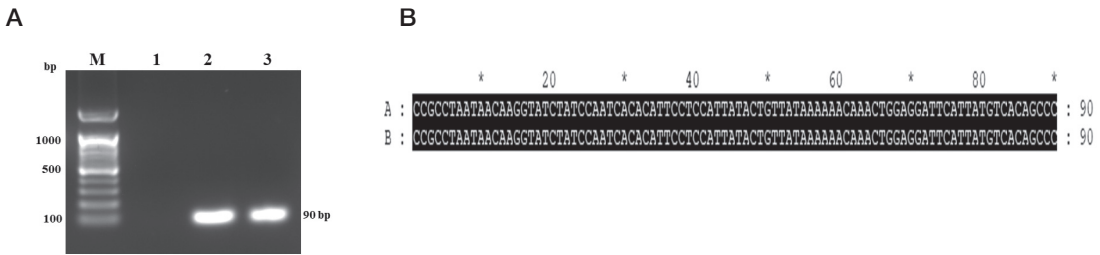


Fig. 4 (A) EtBr stained agarose gel of PCR product amplified from *S. suis* serotype 1/2 and 1. Lane M: 100 bp DNA marker, lane 1: negative control, lane 2: *S. suis* serotype 1/2 PCR product, lane 3: *S. suis* serotype 1 PCR product. (B) Nucleotide sequences alignment results of PCR product amplified from *S. suis* serotype 1/2 and 1. A and B indicate nucleotide sequences from *S. suis* serotype 1/2 and 1, respectively. Black shaded letters indicate identical nucleotides.

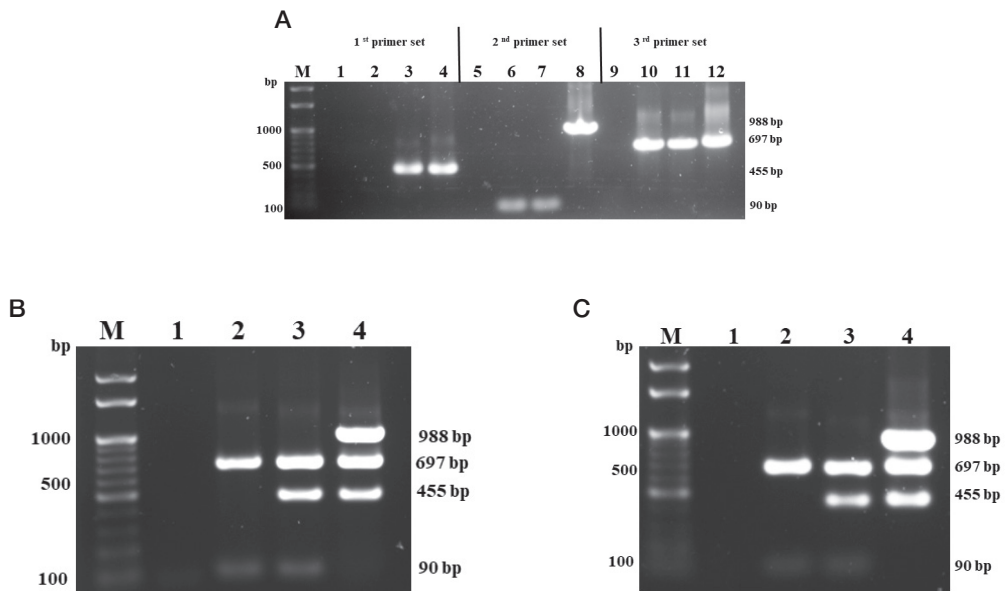


Fig. 5 (A) EtBr stained agarose gel of monoplex PCR product from *S. suis* serotype 1, 1/2 and 2. Lane M: 100 bp DNA maker, lane 1 to 4 PCR amplification with 1st primer set, lane 5 to 8 PCR amplification with 2nd primer set and lane 9 to 12 PCR amplification with 3rd primer set. Lane 1, 5 and 9: negative control, lane 2, 6 and 10: *S.suis* serotype 1 PCR product, lane 3, 7 and 11: *S. suis* serotype 1/2 PCR product, lane 4, 8 and 12: *S. suis* serotype 2 PCR product. EtBr stained agarose gel of multiplex PCR product using genomic DNA (B) or bacterial colony (C) as template. Lane M: 100 bp DNA marker, lane 1: negative control, lane 2: *S. suis* serotype 1 PCR product, lane 3: *S. suis* serotype 1/2 PCR product, lane 4: *S. suis* serotype 2 PCR product

Amplified fragments of 90 and 697 bp for *S. suis* serotype 1, 90, 455 and 697 bp from *S. suis* serotype 1/2 and 455, 697 and 988 bp from *S. suis* serotype 2 were obtained by agarose gel electrophoresis (Fig. 5B). For simple and fast genomic DNA was replaced by colony of bacteria for template in PCR amplification. The colony multiplex PCR results were concordant to multiplex PCR using genomic DNA as template (Fig. 5C). This showed that the colony multiplex PCR assay was able to identify and differentiate *S. suis* serotype 2 and 1/2.

Specificity and sensitivity of colony multiplex PCR assay

For specificity, *S. pyrogenes*, *S. pneumoniae*, *S. viridans*, *S. aureus*, *E. coli* and *S. Typhimurium* were used to evaluate specificity of the colony multiplex PCR. The result represented that only *S. suis* serotype 2 generated all three bands of PCR products (455, 697 and 988 bp). In contrast, other bacteria produced specifically amplicons at 697 bp from universal primers (Fig. 6A). It was concluded that the colony multiplex PCR was specific for *S. suis* serotype 2.

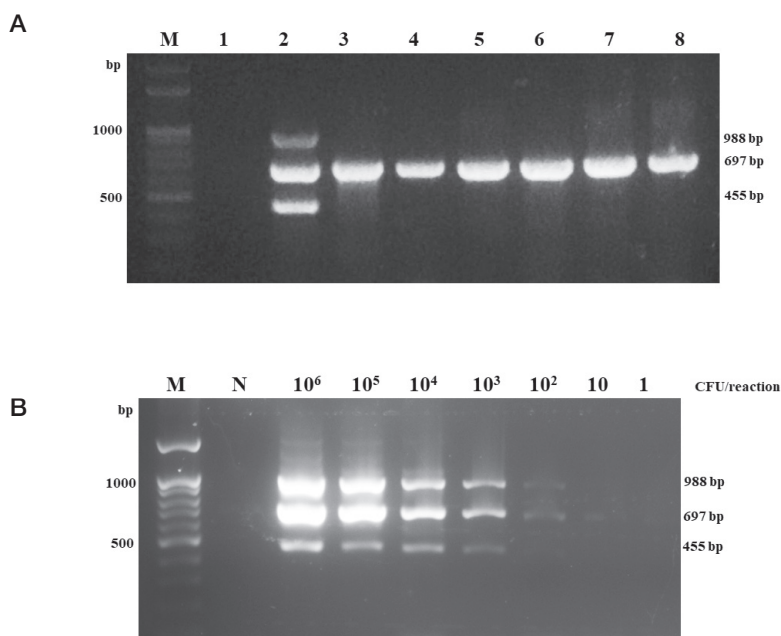


Fig. 6 (A) The specificity of the colony multiplex PCR assay. Lane M: 100 bp DNA marker, lane 1: negative control, lane 2: *S. suis* serotype 2 PCR product, lane 3: *S. pyrogenes* PCR product, lane 4: *S. pneumoniae* PCR product, lane 5: *S. viridans* PCR product, lane 6: *S. aureus* PCR product, lane 7: *E. coli* PCR product, lane 8: *S. Typhimurium* PCR product. (B) The detection limit of the colony multiplex PCR assay in different bacterial concentrations. Lane M: 100 bp DNA marker, lane N: negative control

For sensitivity, detection limit of test was performed by dilution of *S. suis* serotype 2 from 10^6 to 1 CFU. Then, bacterial cells from each dilution was used as template for colony multiplex PCR. The result showed that sensitivity of the colony multiplex PCR was 10^2 CFU/reaction (Fig. 6B).

Discussion

Serotypes identification of *S. suis* are usually done by antiserum coagglutination test. There are cross-reaction using typing sera between serotypes 1/2 and 1, and serotypes 1/2 and 2.⁽¹⁸⁾ Some study reported that there were unencapsulated strains causing exhibited agglutination with antiserotype serum.^(13, 14) For this reason, multiplex PCR techniques have been developed for differentiation of *S. suis* serotypes. Previously, Kerdsin, *et al.*⁽¹⁾ aligned all *cps* loci of *S. suis* 15 serotypes (serotype 1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 14, 19, 23, 25 and 1/2) and compared with each other to obtain the specific sequence to be used as templates for designing of primer. They presented that the *cps* loci of *S. suis* serotype 2 and 1/2 share high genetic similarity. After that, Liu, *et al.*⁽¹⁵⁾ sequenced genomes of *S. suis* 33 serotypes using whole genome sequencing. The sequencing results indicated that no serotype-specific genes were found to distinguish between *S. suis* serotype 2 and 1/2. In the present study, it was illustrated that nucleotides on nucleotides spacer between *cpsS* and *cpsT* genes of *S. suis* serotype 2 differed from

nucleotide sequences of *S. suis* serotype 1/2 approximately 900 bp. The DNA sequences of this region belonged to IS630 transposases encoding sequences. The results were concordant with the previous study which concluded that the critical difference between the serotype 2 and 1/2 loci is a 906 bp fragment containing IS transposases.⁽²⁰⁾ In addition, it was found that this nucleotide region from *S. suis* serotype 1/2 shared identical characteristics with DNA sequence of *S. suis* serotype 1. For this reason, this location was used to design the pair of specific primers for separation between *S. suis* serotype 2 and 1/2. The results showed that the multiplex PCR assay was successful for identification and differentiation of *S. suis* serotype 2 and 1/2.

Recently, *in silico* serotype determination from whole genome sequencing (WGS) was able to differentiate these serotypes.⁽²¹⁾ A novel high resolution melting (HRM) assay was developed for distinguishing single-nucleotide polymorphism within *cpsK* gene between *S. suis* serotype 2 and 1/2 as well as 1 and 14.⁽²²⁾ Moreover, a PCR-RFLP detection method amplifying a fragment of *cpsK* gene digested with BstNI restriction endonuclease was developed to distinguish between serotype 2 and 1/2 and between serotype 1 and 14.⁽²³⁾ Additionally, Lacouture *et al.* developed a mismatch amplification mutation assay (MAMA)-PCR of *cpsK* gene to differentiate serotype 2 from 1/2 and serotype 1 from 14.⁽²⁴⁾ However, routine diagnostic

laboratories required reliable inexpensive and feasible high-throughput approach to correctly identify *S. suis* serotypes. Therefore, the multiplex PCR is useful for routine laboratories to identify *S. suis* by PCR-based method without inexpensive instruments or using antiserum.

Although results showed that *S. suis* primers for the PCR method did not amplify any PCR product from other species of Gram-positive and Gram-negative bacteria, only 3 *S. suis* serotype reference strains, 1, 2 and 1/2, were used to verify the PCR method. This study is the first step for method development showing the possibility of the multiplex PCR assay to distinguish between serotype 2 and 1/2. However, before establishment of the method, it should be further validate with all 29 serotypes of *S. suis* and *S. suis* closely related specie such as *S. gallolyticus* and *S. parasuis*. Moreover, a greater number of *S. suis* serotype 2 and 1/2 strains should be evaluated further with this multiplex PCR assay.

In this study, bacterial colony used as template in PCR amplification had several advantages such as simplicity and time saving. The technique did not require multi-step DNA extraction procedures. Additionally, this study showed that the detection limit of the colony multiplex PCR for identification of *S. suis* was 10^2 CFU while Liu, *et al.*⁽¹⁵⁾ presented that the detection limit of their multiplex PCR assay using DNA template to identify 33 serotype of

S. suis was in the range of 10^4 CFU to 10^5 CFU. For identification of *S. suis* serotype 2, the detection limit was shown to be 10^4 CFU. Moreover, Kerdsin, *et al.*⁽¹⁷⁾ presented that the limit of detection in their new multiplex PCR assay using DNA template for serotyping of 29 *S. suis* serotypes was 10^3 to 10^5 CFU and the sensitivity of *S. suis* serotype 2 was 10^3 CFU. This clearly indicated that using bacterial colony for PCR template in the colony PCR assay had higher limit of detection for bacterial detection.

Conclusions

The newly developed multiplex PCR assay using bacterial colony as PCR template is a rapid, simple, cost-effective and reliable alternative to conventional methods for distinguishing *S. suis* serotype 2 and 1/2. Nevertheless, the colony multiplex PCR assay should be further evaluated with more *S. suis* serotypes and related bacterial species.

Acknowledgements

This work was supported by The National Research Council of Thailand (NRCT).

References

1. Lun ZR, Wang QP, Chen XG, Li AX, Zhu XQ. *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen. Lancet Infect Dis 2007; 7: 201-9.

2. Hill JE, Gottschalk M, Brousseau R, Harel J, Hemmingsen SM, Goh SH. Biochemical analysis, cpn60 and 16S rDNA sequence data indicate that *Streptococcus suis* serotypes 32 and 34, isolated from pigs, are *Streptococcus orisratti*. Vet Microbiol 2005; 107: 63-9.
3. Tien LHT, Nishibori T, Nishitani Y, Nomoto R, Osawa R. Reappraisal of the taxonomy of *Streptococcus suis* serotypes 20, 22, 26, and 33 based on DNA-DNA homology and sodA and recN phylogenies. Vet Microbiol 2013; 162: 842-9.
4. Dang Y, Lachance C, Wang Y, *et al.* Transcriptional approach to study porcine tracheal epithelial cells individually or dually infected with swine influenza virus and *Streptococcus suis*. BMC Vet Res 2014; 10: 86.
5. Perch B, Kristjansen P, Skadhauge K. Group R *streptococci* pathogenic for man. Two cases of meningitis and one fatal case of sepsis. Acta Pathol Microbiol Scand 1968; 74: 69-76.
6. Department of Disease Control. Annual Epidemiological Surveillance Report 2018. Bangkok: Canna Graphic Co., Ltd, Department of Disease Control; 2018 ISBN.: 978-616-11-4161-5.
7. Goyette-Desjardins G, Auger JP, Xu J, Segura M, Gottschalk M. *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent-an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing. Emerg Microbes Infect 2014; 3: e45.
8. Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, Beaudoin M, Henrichsen J. Characterization of six new capsular types (23 through 28) of *Streptococcus suis*. J Clin Microbiol 1991; 29: 2590-4.
9. Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, Mittal KR, Henrichsen J. Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis*. J Clin Microbiol 1989; 27: 2633-6.
10. Higgins R, Gottschalk M, Boudreau M, Lebrun A, Henrichsen J. Description of six new capsular types (29-34) of *Streptococcus suis*. J Vet Diagn Invest 1995; 7: 405-6.
11. Perch B, Pedersen KB, Henrichsen J. Serology of capsulated streptococci pathogenic for pigs: six new serotypes of *Streptococcus suis*. J Clin Microbiol 1983; 17: 993-6.
12. Gottschalk M, Higgins R, Boudreau M. Use of polyvalent coagglutination reagents for serotyping of *Streptococcus suis*. J Clin Microbiol 1993; 31: 2192-4.

13. Kerdsin A, Takeuchi D, Gottschalk M, Hamada S, Akeda Y, Oishi K. A human case of *Streptococcus suis* infection caused by an unencapsulated strain. JMM Case Rep 2014; 1: 1-4.
14. Lakkitjaroen N, Takamatsu D, Okura M, Sato M, Osaki M, Sekizaki T. Loss of capsule among *Streptococcus suis* isolates from porcine endocarditis and its biological significance. J Med Microbiol 2011; 60: 1669-76.
15. Liu Z, Zheng H, Gottschalk M, *et al.* Development of multiplex PCR assays for the identification of the 33 serotypes of *Streptococcus suis*. PLoS One 2013; 8: e72070.
16. Okura M, Lachance C, Osaki M, *et al.* Development of a two-step multiplex PCR assay for typing of capsular polysaccharide synthesis gene clusters of *Streptococcus suis*. J Clin Microbiol 2014; 52: 1714-9.
17. Kerdsin A, Akeda Y, Hatrongjit R, *et al.* *Streptococcus suis* serotyping by a new multiplex PCR. J Med Microbiol 2014; 63: 824-30.
18. Higgins R, Gottschalk M. An update on *Streptococcus suis* identification. J Vet Diagn Invest 1990; 2: 249-52.
19. Kerdsin A, Dejsirilert S, Akeda Y, *et al.* Fifteen *Streptococcus suis* serotypes identified by multiplex PCR. J Med Microbiol 2012; 61: 1669-72.
20. Wang K, Fan W, Cai L, Huang B, Lu C. Genetic analysis of the capsular polysaccharide synthesis locus in 15 *Streptococcus suis* serotypes. FEMS Microbiol Lett 2011; 324: 117-24.
21. Athey TB, Teatero S, Lacouture S, Takamatsu D, Gottschalk M, Fittipaldi N. Determining *Streptococcus suis* serotype from short-read whole-genome sequencing data. BMC Microbiol 2016; 16: 162.
22. Scherrer S, Rademacher F, Spoerry Serrano N, *et al.* Rapid high resolution melting assay to differentiate *Streptococcus suis* serotypes 2, 1/2, 1, and 14. Microbiologyopen 2020; 9: e995.
23. Matiasovic J, Zouharova M, Nedbalcova K, *et al.* Resolution of *Streptococcus suis* Serotypes 1/2 versus 2 and 1 versus 14 by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Method. J Clin Microbiol 2020; 58: e00480-20.
24. Lacouture S, Okura M, Takamatsu D, Corsaut L, Gottschalk M. Development of a mismatch amplification mutation assay to correctly serotype isolates of *Streptococcus suis* serotypes 1, 2, 1/2, and 14. J Vet Diagn Invest 2020; 32: 490-4.

ฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของโปรตีนสารพิษ ไบนารีจากแบคทีเรีย *Lysinibacillus sphaericus*

กนกพร ศรีสุจริตพานิช^{1*} วรพรรณ โรจนตริพันธ์¹ จิราพร จรอนันต์¹ ชลธิดา ตั้งทรงเจริญ¹
และ ปันดดา บุญเสริม²

¹คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี

²สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล จังหวัดนครปฐม

บทคัดย่อ

โปรตีนสารพิษไบนารีที่ผลิตโดยแบคทีเรีย *Lysinibacillus sphaericus* (Ls) มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงที่เป็นแมลงพาหะที่สำคัญ โครงสร้างของโปรตีนชนิดนี้มีลักษณะคล้ายกับโปรตีนสร้างรูรั่วในกลุ่มแอโรไลซิน ซึ่งมีการค้นพบว่าโปรตีนในกลุ่มนี้แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งหลายชนิด แต่จนถึงปัจจุบันแทบจะไม่มีข้อมูลใดเลยเกี่ยวกับความเป็นพิษของโปรตีนสารพิษไบนารีต่อเซลล์ชนิดอื่น ๆ นอกจากลูกน้ำยุง การศึกษาครั้งนี้ได้ทดสอบผลของโปรตีนสารพิษไบนารีที่มีต่อเซลล์ชนิดต่าง ๆ โดยเริ่มจากการผลิตเป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีนชนิด BinA และ BinB ในแบคทีเรีย *Escherichia coli* ส่วนผสมของ BinA และ BinB มีความเป็นพิษสูงต่อลูกน้ำยุงรำคาญชนิด *Culex quinquefasciatus* แต่ทั้ง BinA และ BinB ไม่เหนี่ยวนำให้เกิดการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงมนุษย์ นอกจากนี้ยังพบว่าสารพิษไบนารีแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด melanoma SK-MEL-28 (ATCC HTB-72) และ papilloma carcinoma KB (ATCC CCL-17) แต่ไม่มีผลต่อเซลล์มนุษย์ปกติชนิดไฟโบรบลาสต์ (Hs68 cell) ผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่าสารพิษจากแบคทีเรียอาจเป็นตัวเลือกหนึ่งที่มีศักยภาพสำหรับการพัฒนาเป็นสารต่อต้านเซลล์มะเร็ง ซึ่งในอนาคตจะทดสอบความเป็นพิษของสารพิษไบนารีกับเซลล์มะเร็งชนิดอื่น ๆ ต่อไป

คำสำคัญ: โปรตีนสารพิษชนิดไบนารี แบคทีเรีย *Lysinibacillus sphaericus* ฤทธิ์ต้านมะเร็ง โปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: kanokporn@go.buu.ac.th

รับบทความ: 3 เมษายน 2563

แก้ไขบทความ: 29 เมษายน 2563

รับตีพิมพ์บทความ: 13 พฤษภาคม 2563

Biological and Anti-cancer Activity of Binary Toxin from *Lysinibacillus sphaericus*

Kanokporn Srisucharitpanit^{1*}, Worapan Rojanatiranan¹, Chirapond Chonananant¹,
Chontida Tangsongcharoen¹ and Panadda Boonserm²

¹Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University, Chonburi Province, Thailand

²Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Nakhon Pathom Province, Thailand

Abstract

Binary toxin produced by *Lysinibacillus sphaericus* (Ls) is highly active against mosquito larvae of important insect vector. The binary toxin shows a homology structure to pore forming-aerolysin family, a toxicity of which has been discovered against several cancer cell lines. To date, a cytotoxic data of Bin toxin is unavailable for mammalian cells including cancer cells. Herein, the binary toxin was tested for its biological activity on several cell types. Two components of the binary toxin, BinA and BinB were produced separately in *Escherichia coli* host cell. The biological tests of BinA and BinB mixture revealed high toxicity to *Culex quinquefasciatus* larvae, while no activity was detected for a human-hemolysis. Interestingly, the binary toxin showed cytotoxicity towards cancer cells, melanoma SK-MEL-28 cell (ATCC HTB-72) and papilloma carcinoma KB cell (ATCC CCL-17), but it was inactive against the normal human cell, fibroblast Hs68 cell. These findings promise a possibility of bacterial toxin being a candidate for anti-cancer substance. In the future, the anticancer activity of the binary toxin will be investigated in several other cancer cells.

Keywords: Binary toxin, *Lysinibacillus sphaericus*, Anti-cancer, Larvicidal toxin

*Corresponding author E-mail address: kanokporn@go.buu.ac.th

Introduction

Presently, it is possible to say that more people around the world would have died from infectious diseases transmitted by mosquitoes such as malaria, dengue hemorrhagic fever, Japanese encephalitis and lymphatic filariasis. Mosquitoes of genus *Anopheles*, *Aedes* and *Culex* serve as primary vectors for transmission of these diseases. Among the three mosquitoes genera, *Culex* is the most genetically various due to its expanded geographical distribution⁽¹⁾. *Lysinibacillus sphaericus* (*Ls*) is a Gram-positive spore-forming bacterium which can produce larvicidal crystal proteins. A binary toxin or Bin toxin is one of the active proteins among those toxins. According to its name, two homologous proteins designated as BinA and BinB are required together to exert a larvicidal activity. Bin toxin is highly pathogenic to *Culex* and *Anopheles* mosquito larvae, important primary vectors for disease transmissions. Biological insecticides, including the binary toxin have been chosen to control these mosquito populations and disease transmission because of their high specificity, environmental safe and no adverse effects on human⁽²⁾.

Previous studies demonstrated that BinB showed specific binding to glycoprotein receptors, a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchored α -glucosidase on larval epithelial cells^(3,4). Upon the receptor binding of BinB, the complex of binary toxin is internalized into the target cells, eventually causing larval death. In turn, BinA has been proposed to be a toxic

component. The cytopathological changes of Bin-treated *Culex* larvae were observed in the cytoplasmic organelles, disruption of nucleus, mitochondrial swelling and endoplasmic reticulum breakdown. Bin toxin was shown to induce mitochondria-mediated apoptosis in *Culex* larvae, leading to larval death⁽⁵⁾. Likewise, a similar mechanism was previously reported for the intoxication process of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) δ -endotoxin in *Culex pipiens* larval cells⁽⁶⁾.

The molecules of the binary toxin reveal their high homology structure. Moreover, the conformational structure of the binary toxin belongs to aerolysin β -type pore forming toxins (PFTs)^(7,8). PFTs mediate actions through cell surface receptors leading to cell death. Recent studies provided the evidences that *Bt*-PFT parasporin could induce cytotoxicity and apoptosis in human cancer cells^(9,10). Consequently, the binary toxin has been proposed to share the action with this protein family. Currently, no data has been available for the cytotoxicity of binary toxin on a variety of cells. Therefore, information about its cytotoxicity on other target cells (such as human cancer cells and bacterial cells) will be useful for medical applications.

The present study revealed that binary toxin can kill human cancer cells; melanoma SK-MEL-28 and papilloma carcinoma KB. On the contrary, the absence of cytotoxicity against normal human fibroblast Hs68 and non-hemolytic activity of the binary toxin would be essential for the development of a potential

candidate for cancer therapy in the future.

Materials and methods

Binary toxin expression and purification

The binary toxin was expressed as recombinant BinA and BinB proteins separately. *E. coli* BL21(DE3) pLysS cells harboring pRSETC-BinA or pET28b-BinB were grown in Luria–Bertani (LB) medium containing 100 µg/mL ampicillin and 34 µg/mL chloramphenicol for BinA and 50 µg/mL kanamycin and 34 µg/mL chloramphenicol for BinB. The culture cells were induced with 0.2 mM isopropyl β-D thio-galactopyranoside (IPTG) and continued growing at 18°C for 5 hrs. Both proteins were purified using histidine affinity chromatography. The supernatant fraction was loaded into a HiTrap™ Chelating HP 5-mL column prepacked with a precharged Ni²⁺ (GE Healthcare Life Sciences). The bound (His)₆-tagged BinA and BinB were eluted with wash buffer containing 100–250 mM imidazole. Then, imidazole was removed by desalting column (GE Healthcare Life Sciences). The proteins were analyzed by 12% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide (SDS) gel. The concentration of protein was determined by spectrophotometry at 280 nm absorbance.

Mosquito-larvicidal activity assay

Larvicidal activity assay of the binary toxin was performed against the second-instar *C. quinquefasciatus* larvae obtained from Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. Purified BinA and BinB were

mixed at 1:1 M ratio, followed by two-fold serially diluted with distilled water in different concentrations. Then, 1 mL of each protein dilution was added to each well of a 24-well tissue culture plate containing 10 larvae/well in 1 mL water. The BinB protein was used as a negative control. Mortality was recorded after incubation at room temperature for 48 hrs. Median lethal concentration (LC₅₀) was calculated from three independent experiments using Probit analysis⁽¹¹⁾.

Cell Lines and culture conditions

Human cancer cells, melanoma SK-MEL-28 (ATCC HTB-72) and papilloma carcinoma KB (ATCC CCL-17) as well as normal human fibroblast Hs68 (ATCC CRL-1635) were purchased from American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). All cell types were grown in an incubator at 37°C with 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium with a high glucose concentration (DMEM–HG; Gibco, Grand Island, NY, United States) containing 100 µg/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (Gibco) and 10% fetal bovine serum (HyClone, Cramlington, UK). Medium was changed every 3 days, when they reached 80% confluence.

Cell viability assay

Viable cell was assessed using MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5 diphenyl tetrazolium bromide) assay (Sigma). In brief, cells were washed 3 times with PBS and detached with 0.25% trypsin-EDTA. Viable cell density

was counted by trypan blue exclusion and diluted with DMEM—HG to make concentration of 5×10^4 cells/mL. The cells were plated 24 hrs prior to testing in 96-well plates at a density of 5,000 cells/well in 100 μ L of the medium. Each protein toxin was dissolved in medium to produce 8 concentrations of 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31, 15 and 7 μ g/mL, respectively. After 24 hrs the cells were treated with the bacterial toxin by adding 100 μ L/well of each concentration in 3 replicates, then cells were further incubated for 24 hrs before determining the cell viability by MTT assay. Human fibroblast, KB and melanoma cell lines were washed three times in PBS and then incubated with 50 μ L of MTT solution (5 mg/mL MTT in PBS). After 45 min, the unreacted solution was aspirated, and the insoluble intracellular formazan product was solubilized and released from cells by adding 100 μ L of iso-propanol and incubated for 10 min. The absorbance at 570 nm was then measured using a plate reader spectrophotometer (VersaMax). Blank growth medium and protein buffer were used as negative controls.

Hemolytic activity assay

Hemolytic activity assay was performed using human red blood cells (RBCs). RBCs were washed several times in PBS by centrifugation for 3 min at 3,000 g until the supernatant was clear. Then, RBC were diluted to 3-5% cells and mixed with purified BinA and BinB protein at the concentration of 1 mg/mL. The reactions were

incubated at 37°C for 30 min. The reaction was stopped by centrifugation and the supernatant was removed. Hemoglobin were measured using spectrophotometry at 541 nm. The 10% Triton X-100 was used as a positive control and PBS was used as a negative control (blank). The relative absorbance compared to that of the suspension treated with 10% Triton X-100 was calculated as the percentage of hemolysis.

Results

Binary toxin expression and purification

The recombinant BinA and BinB proteins (pRSET C-BinA and pET28b-BinB, respectively) were expressed in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Both histidine tagged BinA and BinB proteins were produced as soluble proteins under IPTG (0.2 mM) induction after incubation at 18°C for 5 hrs. The proteins were purified by histidine affinity chromatography. Non-specifically bound proteins were washed twice with wash buffer containing 25 mM imidazole and 50 mM imidazole, respectively. The bound (His)₆-tagged BinA and BinB were eluted with elution buffer containing 100 mM and 250 mM imidazole, respectively. The imidazole was removed by desalting column. The (His)₆-tagged BinA and (His)₆-tagged BinB proteins appeared as major bands of 42 and 51 kDa, respectively. The purified proteins are shown in Fig. 1. The high purity of the binary toxin was achieved with an approximate 95% purity indicating the efficient protein purification.

Mosquito larvicidal activity of binary toxin

The mosquito larvicidal activity of the binary toxin was tested against the 2nd-instar *Culex quinquefasciatus* larvae. The mortality was recorded after feeding toxins for 48 hrs. The median lethal concentration or LC₅₀ was calculated by using the probit analysis. The BinB

protein was used as a negative control. High toxicity was achieved when BinA and BinB were combined at 1:1 molar ratio (Table 1). Neither BinA nor BinB alone was significantly toxic to mosquito larvae although high protein concentration up to 1 ng/mL was applied.

Table 1 Mosquito-larvicidal activity of the purified BinA and BinB against *Culex quinquefasciatus* larvae.

The mortality was recorded after feeding the toxin for 48 hours

Sample	LC ₅₀ *
BinA	>1000 ng/mL
BinB	>1000 ng/mL
BinA + BinB	17 ng/mL

* The LC₅₀ (median lethal concentration) was calculated from three independent experiments by using Probit analysis at 95% confidence.

Anti-cancer activity of binary toxin

The cytotoxicity of the binary toxin was also tested on other target cells including human cancer cells and normal human cells. Upon binary toxin treatment, BinA and BinB proteins were evaluated for anti-cancer activity. The effects of binary toxin on several types of cancer cells including human papilloma KB cells and melanoma SK-MEL-28 cells showed the apparent induction of cell swelling and bursting of target cells (Fig. 2A). Whereas normal human fibroblast cells treated with the binary toxin showed intact cells as spindle-shaped. The killing efficacy of Bin toxin against these human cancer cells and normal human fibroblast cells was also studied

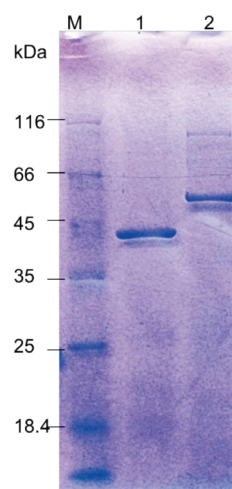


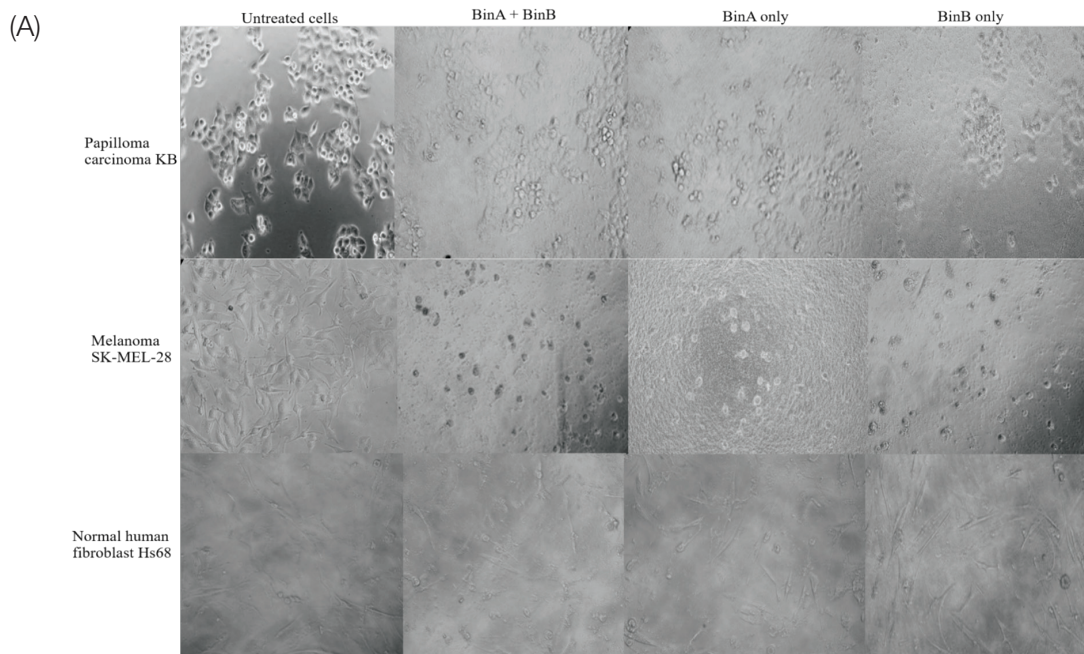
Fig. 1 12% SDS PAGE analysis of purified binary toxin proteins

Lane 1 Purified BinA protein (42 kDa)

Lane 2 Purified BinB protein (51 kDa)

using MTT assay. The binary toxin was found to have consistent cytotoxic activity against both human cancer cells at a dose of 1 mg/mL (Fig. 2B). There were the dramatically significant decreases in cell viability compared to untreated cells. Binary toxin (BinA+BinB) exhibited higher cytotoxicity to human melanoma than to human papilloma cancer cells whereas BinB

protein exhibited higher cytotoxicity towards human papilloma than to human melanoma while BinA protein showed comparable toxicity towards both human papilloma and melanoma cancer cells (Fig. 2B). However the binary toxin, BinA alone and BinB alone showed no cytotoxic activity towards normal human fibroblast cells that remain similar to untreated cells.



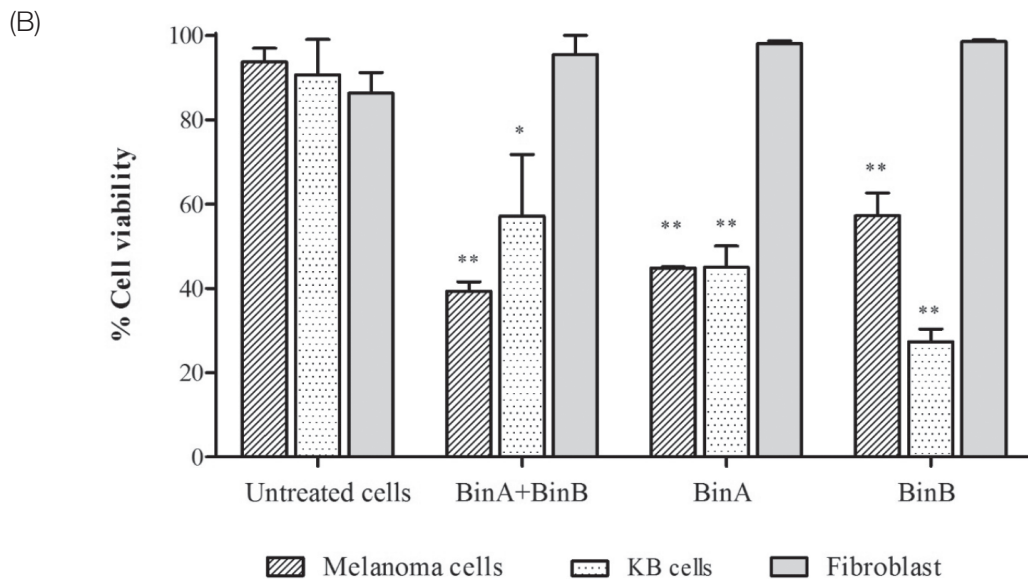


Fig. 2 Cytocidal activity of binary toxin on human papilloma KB cells, melanoma SK-MEL-28 cancer cells and normal human fibroblast Hs96. Untreated cells were used as negative control. A total of 5×10^4 cells/mL was pre-incubated at 37 °C for 24 h and then treated with BinA+BinB, BinA or BinB (final concentration, 1 mg/mL) for 24 h at 37 °C. (A) Morphological alterations of cells induced by binary toxin (BinA+BinB), BinA or BinB. (B) % Cell viability of Bin against cultured cancer cell lines and normal cells was determined using the MTT assay. Means $\pm$ SEM are shown. Each error bar represents the standard error of the mean (SEM) from triplicate experiments by One-Way ANOVA. Statistically significant differences between untreated control and toxin treatment group are indicated by asterisks (* p value < 0.05 and ** p value < 0.001).

Hemolytic activity of binary toxin

Hemolytic activity assay was performed by using human red blood cells (RBCs). The three samples of binary toxin, BinA, BinB and BinA+BinB mixture were incubated with RBCs at 37°C for 30 minutes. The hemolytic activity was assessed by measuring hemoglobin released in the supernatant. In comparison, BinA and BinB

alone did not show the hemolytic activity when compared to TritonX-100. The increasing of hemolysis was observed for the mixture of BinA+BinB toxin, but it is insignificant comparing to TritonX-100 (Table 2). The result suggested that Bin toxin did not have the ability to lyse human red blood cells.

Table 2 Hemolytic activity of 1 mg/mL Bin toxin. Human red blood cells (RBCs) were incubated at 37°C for 30 minutes. Values are mean $\pm$ SEM of three independent experiments

Sample	% Hemolysis
BinA	1 $\pm$ 0.64
BinB	1 $\pm$ 0.30
BinA + BinB	2 $\pm$ 0.19
10% TritonX 100	100 $\pm$ 0.01
PBS	0 $\pm$ 0.01

Discussion and Conclusion

Despite mosquito larvicidal actions of *L. sphaericus* binary toxin inside the *Culex* midgut cells as the primary target have been widely reported, there are no evidences of the effects of binary toxin on other non-target cells including cancer cells and red blood cells. In this study, the biological activity, cytotoxicity on cancer cells and hemolytic capacity of binary toxin have been determined. Naturally, binary toxin is produced as a crystal toxin inside *L. sphaericus* during sporulation phase. Here, binary toxin was produced as soluble recombinant proteins by *E. coli* BL21(DE3) pLysS. The larvicidal activity on target cells of these soluble recombinant binary toxin is shown by high toxicity to *C. quinquefasciatus* larvae with LC₅₀ about 17 ng/mL that is in the range of a previous report⁽¹²⁾. Thus, the binary toxin have been used as one of the biological insecticides. The reason for using biological insecticides instead of chemical insecticides is not only to avoid the negative effects of chemical insecticides but also

that biological insecticides have no adverse effects on human⁽²⁾. In addition to the toxicity to target insects, the cytotoxic action of binary toxin on cancer cells and hemolytic activity on red blood cells were simultaneously investigated. Interestingly, upon binary toxin treatment in human papilloma and melanoma cancer cells, both binary toxin subunits, BinA alone and BinB alone induced alterations in cell morphology, with either cell swelling or bursting, and subsequent cell lysis. Moreover, the binary toxin can kill human cancer cells; melanoma SK-MEL-28 and papilloma carcinoma KB as a result of the marked reduction of cell viability via the measurement of MTT assay. An advantage of the binary toxin is that no cytotoxic effects appeared on the normal human cells. Previous study has provided evidence that the binary toxin causes the decrease in mitochondrial energy production and metabolism as shown by down-regulated NADH dehydrogenases and protein transporters⁽¹³⁾. The binary toxin also induces apoptosis through intrinsic pathway in

Culex larval cells, leading to larval death⁽⁵⁾. Notably, the cytotoxic effects of *Aeromonas hydrophila* aerolysin type β -pore forming toxins which is similar to BinB structure can induce apoptosis by perturbing host membrane permeability and allowing the leakage of cellular components via pore formation^(7, 14, 15). In addition, the concentration of binary toxin (1 mg/mL) for anti-cancer activity is higher than that of larvicidal activity ($LC_{50} = 17$ ng/mL). Thus, it is likely that binary toxin could exert its activity via pore forming action on cancer cells, probably causing the disruption of membrane integrity and increasing permeability. Together with the role of apoptosis in the inhibitory effects in cancer cells, it is possible that the pore forming action of binary toxin could kill human papilloma and melanoma cancer cells through the pathway of apoptosis. In addition, the hemolytic activity test was carried out concerning its cytotoxicity. The result revealed that binary toxin could not lyse the human red blood cell. This would promise the safety of binary toxin as a cancer-treatment drug. It has been reported that bacterial toxin can selectively recognize lipid on susceptible cell membrane⁽¹⁶⁾. The direct interaction with membrane lipids is also possible to take place for binary toxin⁽¹⁷⁾. Accordingly, the susceptibility of cancer cells might be supported by different composition of membrane lipids on the cell surface. Transmembrane of cancer cells facilitate the lipid membrane flipping from inside to outside. However, the specific protein receptor of cancer cells cannot be

excluded from the activity of binary toxin. The findings promise a possibility of bacterial toxin as a candidate for anti-cancer substances that focuses on damaging cancer cell membranes instead of binding to specific receptor. Alternatively, the proposed pore forming action of binary toxin could facilitate the entry of other chemotherapeutic drugs into cancer cells.

In summary, this report is the first to identify a binary toxin from *L. sphaericus* exhibiting cytotoxic activities against human cancer cells. However, the anticancer activity and specificity of the binary toxin still necessitates further investigation for more cancer cells. For the future work, lipid membrane interaction of binary toxin will be performed for model lipid bilayer specific to cancer cells and normal cells. In addition, the mechanism of action also needs to be clarified.

Acknowledgement

The authors would like to thank Monruadee Srisaisap (Mahidol University) for technical assistance. This work was supported by the Thailand Research Fund (TRF, MRG5980076) and the faculty of Allied Health Sciences, Burapha University.

References

1. Arensburger P, Megy K, Waterhouse RM, *et al.* Sequencing of *Culex quinquefasciatus* establishes a platform for mosquito comparative genomics. Science 2010; 330: 86-8.

2. Lacey LA. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. J Am Mosq Control Assoc 2007; 23(2 Suppl): 133-63.
3. Silva-Filha MH, Nielsen-LeRoux C, Charles JF. Identification of the receptor for *Bacillus sphaericus* crystal toxin in the brush border membrane of the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). Insect Biochem Mol Biol. 1999; 29: 711-21.
4. Darboux I, Nielsen-LeRoux C, Charles JF, Pauron D. The receptor of *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) midgut: molecular cloning and expression. Insect Biochem Mol Biol 2001; 31: 981-90.
5. Tangsongcharoen C, Chomanee N, Promdonkoy B, Boonserm P. *Lysinibacillus sphaericus* binary toxin induces apoptosis in susceptible *Culex quinquefasciatus* larvae. J Invertebr Pathol 2015; 128: 57-63.
6. Ying TH, Chen CW, Hsiao YP, Hung SJ, Chung JG, Yang JH. Citric acid induces cell-cycle arrest and apoptosis of human immortalized keratinocyte cell line (HaCaT) via caspase- and mitochondrial-dependent signaling pathways. Anticancer Res 2013; 33: 4411-20.
7. Srisucharitpanit K, Yao M, Promdonkoy B, Chimnaronk S, Tanaka I, Boonserm P. Crystal structure of BinB: a receptor binding component of the binary toxin from *Lysinibacillus sphaericus*. Proteins 2014; 82: 2703-12.
8. Colletier JP, Sawaya MR, Gingery M, et al. De novo phasing with X-ray laser reveals mosquito larvicide BinAB structure. Nature 2016; 539: 43-7.
9. Chan KK, Wong RS, Mohamed SM, Ibrahim TA, Abdullah M, Nadarajah VD. *Bacillus thuringiensis* parasporal proteins induce cell-cycle arrest and caspase-dependant apoptotic cell death in leukemic cells. J Environ Pathol Toxicol Oncol 2012; 31: 75-86.
10. Beena V, Ramnath V, Sreekumar KP, Karthiayini K, Philomina PT, Girija D. Crystal protein of a novel *Bacillus thuringiensis* strain inducing cell cycle arrest and apoptotic cell death in human leukemic cells. Sci Rep 2019; 9: 9661.
11. Finney DJ, Probit analysis 3rd ed. Cambridge University Press, 1971.
12. Srisucharitpanit K, Inchana P, Rungrud A, Promdonkoy B, Boonserm P. Expression and purification of the active soluble form of *Bacillus sphaericus* binary toxin for structural analysis. Protein Expr Purif 2012; 82: 368-72.
13. Tangsongcharoen C, Jupatanakul N, Promdonkoy B, Dimopoulos G, Boonserm P. Molecular analysis of *Culex quinquefasciatus* larvae responses to *Lysinibacillus sphaericus* Bin toxin. PLoS One 2017; 12: e0175473.
14. Weinrauch Y, Zychlinsky A. The induction of apoptosis by bacterial pathogens. Annu Rev Microbiol 1999; 53: 155-87.

15. Parker MW, Buckley JT, Postma JP, *et al.* Structure of the *Aeromonas* toxin proaerolysin in its water-soluble and membrane-channel states. *Nature* 1994; 367: 292-5.
16. Thomas WE, Ellar DJ. *Bacillus thuringiensis var israelensis* crystal delta-endotoxin: effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *J Cell Sci* 1983; 60:181-97.
17. Kunthic T, Promdonkoy B, Srihirin T, Boonserm P. Essential role of tryptophan residues in toxicity of binary toxin from *Bacillus sphaericus*. *BMB Rep* 2011; 44: 674-9.

ระดับเมแทบอลิต์ของไนตริกออกไซด์ในซีรัมของคนที่มีความผิดปกติของระดับไขมันในเลือด

อภิญญา มีเชื้อ¹ กรวิภา ธนะเพิ่มพูน² ณัฐริษา คงคล้าย² สมศักดิ์ ฟองสุภา²
และ สุดาวดี คงคำ^{2*}

¹บัณฑิตศึกษาสาขาเทคนิคการแพทย์ ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี

²ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี

บทคัดย่อ

ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO) เป็นโมเลกุลส่งสัญญาณที่มีบทบาทสำคัญในการรักษาสมดุลของหลอดเลือด การสร้างไนตริกออกไซด์ลดลงในภาวะการสูญเสียการทำงานของเซลล์เอนโดเธลิเยล ซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญในการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็งและโรคหัวใจและหลอดเลือด ความผิดปกติของระดับไขมันในเลือดเป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญของภาวะหลอดเลือดแดงแข็งและโรคหัวใจและหลอดเลือด ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการวิเคราะห์ระดับเมแทบอลิต์ของไนตริกออกไซด์ในซีรัมของผู้ที่มีความผิดปกติของระดับไขมันในเลือดด้วยวิธีทางเคมีอย่างง่ายและราคาไม่สูง (Griess method) เพื่อประเมินการสูญเสียการทำงานของเซลล์เอนโดเธลิเยล กลุ่มตัวอย่างคืออาสาสมัคร 200 คนที่มีอายุ 35-60 ปี ไม่สูบบุหรี่ และไม่มีโรคประจำตัว รวมถึงโรคเบาหวาน และโรคความดันโลหิตสูง โดยแบ่งอาสาสมัครเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีความผิดปกติของระดับไขมันในเลือด (total cholesterol > 200 mg/dL, triglyceride > 150 mg/dL และ LDL cholesterol > 130 mg/dL) และกลุ่มที่มีระดับไขมันในเลือดปกติ ข้อมูลทั่วไปที่บันทึก ได้แก่ อายุ เพศ และดัชนีมวลกาย (body mass index, BMI) ผลการวิเคราะห์พบว่าระดับเมแทบอลิต์ของไนตริกออกไซด์ในซีรัมของผู้ที่มีความผิดปกติของระดับไขมันในเลือด ($43.99 \pm 9.34 \mu\text{M}$) มีค่าต่ำกว่าในซีรัมของผู้ที่มีระดับไขมันในเลือดปกติ ($46.03 \pm 15.19 \mu\text{M}$) เล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ ระดับเมแทบอลิต์ของไนตริกออกไซด์ในซีรัม ยังไม่สัมพันธ์กับอายุ เพศ และดัชนีมวลกาย โดยสรุป ระดับเมแทบอลิต์ของไนตริกออกไซด์ในซีรัมไม่เปลี่ยนแปลงในผู้ที่มีความผิดปกติของระดับไขมันในเลือด เมื่อเทียบกับผู้ที่มีระดับไขมันในเลือดปกติ ดังนั้นระดับไนตริกออกไซด์ในซีรัมอาจไม่เหมาะสำหรับการประเมินภาวะการสูญเสียการทำงานของเซลล์เอนโดเธลิเยล

คำสำคัญ: ความผิดปกติของระดับไขมันในเลือด การสูญเสียหน้าที่ของเซลล์เอนโดเธลิเยล ไนตริกออกไซด์

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: ss2sdwd@yahoo.com

รับบทความ: 15 พฤษภาคม 2563

แก้ไขบทความ: 5 มิถุนายน 2563

รับตีพิมพ์บทความ: 4 สิงหาคม 2563

Serum Levels of Nitric Oxide Metabolites in Dyslipidemia Individuals

Apinya Mechuer¹, Kornwipa Tanapermpool², Natpicha Kongklay²,
Somsak Fongsupa² and Sudawadee Kongkhum^{2*}

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

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

Abstract

Nitric oxide (NO) is a signaling molecule with an important role in vascular homeostasis. Decreased production of NO is observed in individuals with endothelial dysfunction, which is an important step in the pathogenesis of atherosclerosis and cardiovascular disease (CVD). Dyslipidemia is considered as a risk factor of atherosclerosis and CVD. Therefore, the objective of this study was to determine NO metabolite levels in serum of dyslipidemia subjects by a simple chemical reaction, Griess method, in order to evaluate endothelial dysfunction. Two hundred subjects, 35-60 years old non-smokers with no history of diabetes and hypertension, were recruited and divided into two groups; dyslipidemia (total cholesterol > 200 mg/dL, triglyceride > 150 mg/dL and LDL cholesterol > 130 mg/dL) and normolipemia. General data, age, sex and body mass index (BMI), were collected. Serum NO metabolite levels were slightly lower in dyslipidemia subjects ($43.99 \pm 9.34 \mu\text{M}$) than in the normolipemia ($46.03 \pm 15.19 \mu\text{M}$). However, they were not significantly different. In addition, serum levels of NO were not correlated with age, sex and BMI. In conclusion, NO metabolite levels did not change in dyslipidemia subjects, compared to normolipemia; therefore, it may not be appropriate for evaluating endothelial dysfunction.

Keywords: Dyslipidemia, Endothelial dysfunction, Nitric oxide

*Corresponding author E-mail address: ss2sdwd@yahoo.com

Introduction

Nitric oxide (NO) is a signaling molecule in the vasculature, mainly produced from vascular endothelial cells.^(1, 2) NO plays an important role in vascular homeostasis.⁽³⁾ Its functions include vasodilation and platelet inhibition. Because of its short half-life (6-30 seconds), there is no storage of NO and its levels depend on levels of synthesis, catalyzed by nitric oxide synthase (NOS). There are 3 NOS isoforms; 1) NOS-1 (neuronal NOS, nNOS), expressed in nervous tissue and function in neurotransmission, 2) NOS-2 (inducible NOS, iNOS), expressed in immune and endothelial cells and activated by compounds, including cytokines and lipopolysaccharides (LPS) to mediate inflammation and 3) NOS-3 (endothelial NOS, eNOS), expressed in endothelial cells to maintain vascular integrity.⁽⁴⁾

Cardiovascular disease (CVD) is a major cause of death among non-communicable disease in Thailand. Dyslipidemia is a primary risk factor of CVD and associated with atherosclerosis and other risk factors of CVD, including insulin resistance and hypertension.^(5, 6) Moreover, prevalence of dyslipidemia has been increasing in Thailand.⁽⁷⁾ Pathogenesis of atherosclerosis and CVD involves endothelial dysfunction, which is an early marker of atherosclerosis.^(6, 8, 9) Decreased NO levels have been shown as a marker of endothelial dysfunction, and its chemical analysis can be done by a simple Griess

method.⁽¹⁰⁻¹²⁾ Since it is less expensive than immunological assay used for other markers, analysis of NO is a good candidate marker to reveal endothelial dysfunction. The present study aimed to determine NO metabolites (NO_x) in dyslipidemia individuals in order to evaluate endothelial dysfunction.

Materials and methods

Sample collection

This research project was approved by the Ethical Review Sub-Committee Board for Human Research Involving Sciences, Thammasat University, No. 3 (project no. 131/2561). Two hundred subjects, who came for annual health check-up at the Public Health Service Center 27, Health Department, Bangkok, Thailand, were recruited into the study. They were 35-60 years old, non-smoker with no history of hypertension, diabetes or any other serious illness at the time of recruitment. The subjects were classified into two groups: dyslipidemia ($n = 100$) and normolipemia ($n = 100$). Dyslipidemia was determined by blood lipid results (total cholesterol >200 mg/dL, triglyceride >150 mg/dL and LDL cholesterol >130 mg/dL).

Biochemical analysis

Blood collection was done after 12 hours of fasting and serum was prepared. Blood lipid profile (total cholesterol, triglyceride and HDL-cholesterol, (HDL-C) was analysed by using FUJIFILM FDC NX500 dry chemistry

automate (FUJIFILM Europe GmbH Medical Systems Division, Germany). LDL-cholesterol (LDL-C) was calculated using the Friedewald equation. After lipid analysis, serum samples were kept at -70°C until the analysis of nitric oxide.

Analysis of nitric oxide

Nitric oxide was analyzed as its metabolites (nitrate and nitrite, NO_x) by using Griess assay.^(10, 11) The principle is based on the reaction of nitrite and sulfanilamide, forming diazonium salt, which is then reacted with N-(1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride. As a result, an azo compound is formed and monitored by spectrophotometric measurement at 540 nm. First, serum was deproteinated by using acetonitrile. After the centrifugation at 10,000xg for 15 minutes, the deproteinated supernatant was then used for the analysis. Griess reagents consisted of 50 μL sulfanilamide (1%), 50 μL N-(1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (0.2%) and 100 μL vanadium chloride (III) (0.5%). Nitrate standard (0-100 μM) or supernatants (100 μL) were mixed with Griess reagents and incubated at 60°C for 15 minutes. Then the absorbance at 540 nm were measured. The NO_x levels were calculated against linear standard curve. Precision and accuracy of the method were determined (CV = 3.95% and recovery = 101.87%).

Statistical analysis

Descriptive statistics is used for demographic variables (sex, age and BMI) and biochemical laboratory results (lipid profile and NO_x). The laboratory results were shown as mean $\pm$ SD. The difference of general characteristics between two groups was tested by using the Chi-square test. Student's *t*-test was used for comparison of means between two groups and correlations were tested by using Pearson's correlation. The *p*-value less than 0.05 was considered as statistically significance. The SPSS software version 12 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used for all statistical analysis.

Results

Subjects were classified into two groups, dyslipidemia and normolipemia. Dyslipidemia subjects had total cholesterol > 200 mg/dL, triglyceride >150 mg/dL and LDL-C >130 mg/dL, while normolipemia had total cholesterol <200 mg/dL, triglyceride <150 mg/dL and LDL-C < 130 mg/dL. General data of the subjects are shown in Table 1. The average ages of dyslipidemia and normolipemia subjects were 51.33 ± 6.70 and 50.94 ± 6.70 years, respectively. The female to male ratio were 55:45 and 66:34 in dyslipidemia and normolipemia, respectively. There were no statistically significant differences in age, sex and BMI between dyslipidemia and

Table 1 Age, sex and BMI of dyslipidemia and normolipemia subjects

Variable (unit)	Normolipemia	Dyslipidemia
	n = 100	n = 100
Age (year)	51.33 ± 6.70	50.94 ± 6.70
Female to male ratio	66.0:34.0	55.0:45.0
BMI (kg/m ²)	22.22 ± 2.08	21.74 ± 2.23
NO (μM)	46.03 ± 15.19	43.99 ± 9.34

Data are presented as mean ± SD.

normolipemia groups. All the subjects had normotensive blood pressure and normal fasting blood glucose. Blood lipid profiles are shown in Fig. 1. Dyslipidemia had significantly higher levels of total cholesterol,

triglyceride and LDL-C (241.62 ± 28.09 , 209.24 ± 58.33 and 168.68 ± 31.96 mg/dL, respectively) than those in normolipemia (174.57 ± 16.26 , 81.64 ± 27.05 and 105.47 ± 16.65 mg/dL, respectively). In contrast, HDL

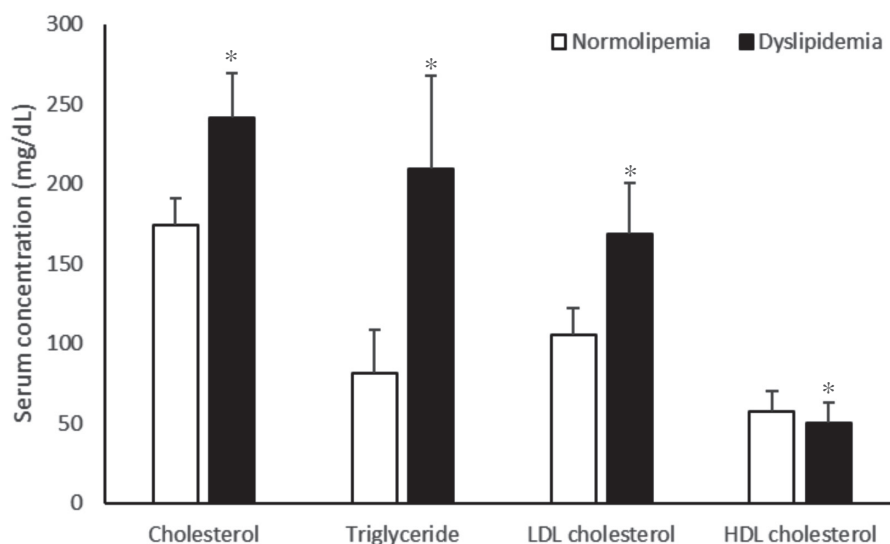


Fig. 1 Blood lipid profile of dyslipidemia and normolipemia subjects. Total cholesterol, triglyceride, LDL (LDL-C) and HDL (HDL-C) cholesterol were determined in serum of dyslipidemia (black bar, n = 100) and normolipemia (white bar, n = 100). Data are shown as mean ± SD. *; $p < 0.05$ when compared with normolipemia

cholesterol was lower in dyslipidemia (50.38 ± 12.88) than that in normolipemia (57.67 ± 12.19 mg/dL). Correlations among blood lipid profiles were tested and shown by correlation coefficient; r (Table 2). It was found that positive correlations among total cholesterol, triglyceride and LDL-C were significant at moderate to strong levels. However, a negative correlation of HDL-C to total cholesterol, triglyceride and LDL-C was observed at lower levels.

Serum levels of NO were shown as NO_x levels. Dyslipidemia subjects had slightly lower NO_x levels (43.99 ± 9.34 μM) than those from normolipemia subjects (46.03 ± 15.19 μM). Nevertheless, they were not significantly different. Then, normolipemia and dyslipidemia

groups were subdivided by age, sex and BMI for further analysis. When categorized by age, there were no differences in NO_x levels in different age groups (Fig. 2A). Female and male subjects with either normolipemia or dyslipidemia had similar levels of NO_x (Fig. 2B). In addition, dyslipidemia subjects who were underweight (<18.5 kg/m^2), normal weight (18.5 - 22.9 kg/m^2), overweight (23.0 - 24.9 kg/m^2) and obese (25.0 - 29.9 kg/m^2), had similar levels of NO_x , compared with normolipemia subjects (Fig. 2C). When correlation tests were performed between NO_x and blood lipid profile, it was found that NO_x levels were not significantly correlated to age, sex, BMI, total cholesterol, triglyceride, LDL-C and HDL-C (Table 2).

Table 2 Correlations between nitric oxide and blood lipid profile (total cholesterol, triglyceride, LDL-C and HDL-C)

	Correlation coefficient (p value)				
	Nitric oxide	Total C	Triglyceride	LDL-C	HDL-C
Nitric oxide	1				
Total C	0.027 (0.703)	1			
Triglyceride	0.013 (0.859)	0.693 (0.000)**	1		
LDL-C	0.048 (0.503)	0.915 (0.000) **	0.601 (0.000)**	1	
HDL-C	0.013 (0.859)	-0.163 (0.021)*	-0.392 (0.000)**	-0.301 (0.000)**	1

**, significant levels were at $p < 0.01$; *, significant levels at $p < 0.05$; Correlations were tested by using Pearson's correlation.

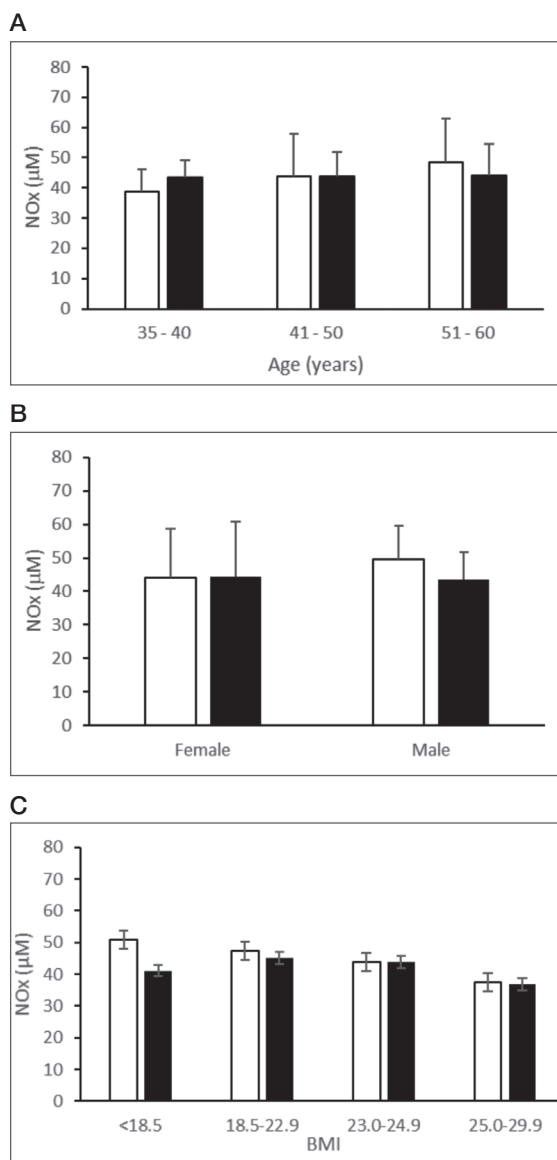


Fig. 2 Serum levels of nitric oxide (NO_x) in normolipemia and dyslipidemia, categorized by age (A), sex (B) and BMI (C). Age subgroups were 35-40, 41-50 and 51-60 years old ($n = 10, 32$ and 58 for normolipemia; $n = 10, 33$ and 57 for dyslipidemia group, respectively). Female and male ratio were 66:34 and 55:45 in normolipemia and dyslipidemia groups, respectively. BMI subgroups were $<18.5, 18.5-22.9, 23.0-24.9$ and $25.0-29.9 \text{ kg/m}^2$ ($n = 8, 57, 31$ and 5 for normolipemia; $n = 10, 59, 30$ and 1 for dyslipidemia group, respectively). NO_x levels in dyslipidemia are shown in black bar and normolipemia in white bar. Data are shown as mean $\pm$ SD. The number of age subgroups

Discussion

In the present study, dyslipidemia and normolipemia subjects were studied. It was observed that total cholesterol, triglyceride, LDL-C and HDL-C were significantly correlated. As previously shown, there are correlations among blood lipid profile.⁽¹³⁾ Total cholesterol, triglyceride and LDL-C were related at moderate to high level, while HDL-C was associated with total cholesterol, triglyceride and LDL-C at lower level. Moreover, the levels of triglyceride in the dyslipidemia group were over two folds that of the normolipemia group. Triglyceride has been shown as an independent risk factor of CVD since triglyceride-rich lipoprotein can penetrate the endothelium and be phagocytosed by macrophage, contributing to plaque development.^(14, 15) Therefore, according to the published guidelines, management of hypertriglyceridemia is recommended, including lifestyle intervention and triglyceride level-lowering medication.⁽¹⁶⁾

Moreover, NO_x levels in dyslipidemia subjects were slightly lower than those in normolipemia subjects (43.99 ± 9.34 VS 46.03 ± 15.19 μM). However, no significant differences were observed. Previous reports showed decreased NO levels in diabetes, hypertension, obesity and metabolic syndrome.⁽¹⁷⁻¹⁹⁾ The levels were correlated with endothelial dysfunction, oxidative stress and inflammation.⁽²⁰⁾ Even though NO is primarily produced from endothelial cells, microbial products and proinflammatory cytokines also

induce production of NO from immune cells.⁽²¹⁾ In this study, subjects were recruited from patients who came for annual health check-up and were presumably healthy. However, it is possible that NO is induced in immune cells; and therefore hinders reduction of NO synthesis by endothelial cells. Indeed, previous studies have shown inconsistency in some conditions.^(22, 23) It has been explained that this can be compensatory process to the loss of NO by dysfunctional endothelial cells. In addition, another study showed that rheumatoid arthritis, whose pathogenesis involves inflammation and endothelial dysfunction, has elevated levels of NO metabolite and there is an association between NO metabolite, inflammation and endothelial dysfunction.⁽²⁴⁾ This may explain why the reduction of NO metabolites was not seen in the present study.

Moreover, it has been shown that serum NO metabolites increase by age and men have higher NO levels than women.^(25, 26) In addition, serum NO metabolites are elevated when BMI increases.⁽²⁷⁾ However, serum levels of NO metabolites were not different among age, sex and BMI subgroups in the present study. This agrees with a previous study showing that age, sex and BMI have no correlation with dyslipidemia.⁽²⁸⁾ It is possible that there are other factors affecting plasma NO levels and causing the conflicting results.

This study showed that NO_x levels did not have correlations with studied variables,

inconsistent with our hypothesis. The explanation of the results could be the effects of confounding factors. It was shown that diet and exercise affect plasma levels of NO metabolites.⁽²⁹⁾ Consequently, these two factors may affect plasma NO metabolites and the interferences mask the correlations between NO_x levels and endothelial dysfunction observed in dyslipidemia. In addition, the sample size in our study may be too small to represent the population.

In conclusion, our results reveal that serum NO_x levels had no association with age, sex, BMI, total cholesterol, triglyceride, LDL-C and HDL-C. Therefore, assessment of NO may not reflect endothelial dysfunction in dyslipidemia. Further study should be done in larger sample size with exploration of confounding factors and other markers of endothelial dysfunction.

Acknowledgements

This study was financially supported by Thammasat University Research Fund. Special thanks to the Public Health Service Center 27, Health Department, Bangkok, Thailand for sample collection process.

References

1. Murad F. Nitric oxide signaling: would you believe that a simple free radical could be a second messenger, autacoid, paracrine substance, neurotransmitter, and hormone? *Recent Prog Horm Res* 1998; 53: 43-59; discussion 59-60.
2. Bredt DS. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radic Res* 1999; 31: 577-96.
3. Tousoulis D, Kampoli AM, Tentolouris C, Papageorgiou N, Stefanadis C. The role of nitric oxide on endothelial function. *Curr Vasc Pharmacol* 2012; 10: 4-18.
4. Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, *et al.* Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 1994; 23: 1121-31.
5. Nelson RH. Hyperlipidemia as a risk factor for cardiovascular disease. *Prim Care* 2013; 40: 195-211.
6. Hurtubise J, McLellan K, Durr K, Onasanya O, Nwabuko D, Ndisang JF. The Different Facets of Dyslipidemia and Hypertension in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2016; 18: 82.
7. Aekplakorn W, Taneepanichskul S, Kessomboon P, *et al.* Prevalence of Dyslipidemia and Management in the Thai Population, National Health Examination Survey IV, 2009. *J Lipids* 2014; 2014: 249584.

8. Sitia S, Tomasoni L, Atzeni F, *et al.* From endothelial dysfunction to atherosclerosis. *Autoimmun Rev* 2010; 9: 830-4.
9. Gupta AK, Ravussin E, Johannsen DL, Stull AJ, Cefalu WT, Johnson WD. Endothelial Dysfunction: An Early Cardiovascular Risk Marker in Asymptomatic Obese Individuals with Prediabetes. *Br J Med Med Res* 2012; 2: 413-23.
10. Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 2001; 5: 62-71.
11. Ghasemi A, Zahediasl S. Preanalytical and analytical considerations for measuring nitric oxide metabolites in serum or plasma using the Griess method. *Clin Lab* 2012; 58: 615-24.
12. Bonafede RJ, Calvo JP, Fausti JMV, Puebla S, Gambarte AJ, Manucha W. Nitric oxide: A new possible biomarker in heart failure? Relationship with pulmonary hypertension secondary to left heart failure. *Clin Investig Arterioscler* 2017; 29: 120-6.
13. Popruk S, Tungtrongchitr R, Pongpaew P, *et al.* Relationship between soluble leptin receptor, leptin, lipid profiles and anthropometric parameters in overweight and obese Thai subjects. *J Med Assoc Thai* 2005; 88: 220-7.
14. Tada H, Nohara A, Kawashiri MA. Serum Triglycerides and Atherosclerotic Cardiovascular Disease: Insights from Clinical and Genetic Studies. *Nutrients* 2018; 10: 1789.
15. Reiner Z. Hypertriglyceridaemia and risk of coronary artery disease. *Nat Rev Cardiol* 2017; 14: 401-11.
16. Brinton EA. Management of Hypertriglyceridemia for Prevention of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2016; 45: 185-204.
17. Kanabrocki EL, George M, Hermida RC, *et al.* Day-night variations in blood levels of nitric oxide, T-TFPI, and E-selectin. *Clin Appl Thromb Hemost* 2001; 7: 339-45.
18. Higashino H, Miya H, Mukai H, Miya Y. Serum nitric oxide metabolite (NO(x)) levels in hypertensive patients at rest: a comparison of age, gender, blood pressure and complications using normotensive controls. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34: 725-31.
19. Fujita K, Wada K, Nozaki Y, *et al.* Serum nitric oxide metabolite as a biomarker of visceral fat accumulation: clinical significance of measurement for nitrate/nitrite. *Med Sci Monit* 2011; 17: CR123-31.

20. Mudau M, Genis A, Lochner A, Strijdom H. Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis. *Cardiovasc J Afr.* 2012; 23: 222-31.
21. Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005; 4:471-9.
22. Rus A, Molina F, Gasso M, Camacho MV, Peinado MA, del Moral ML. Nitric Oxide, Inflammation, Lipid Profile, and Cortisol in Normal- and Overweight Women With Fibromyalgia. *Biol Res Nurs* 2016; 18: 138-46.
23. Codoner-Franch P, Tavaréz-Alonso S, Murria-Estal R, Megias-Vericat J, Tortajada-Girbes M, Alonso-Iglesias E. Nitric oxide production is increased in severely obese children and related to markers of oxidative stress and inflammation. *Atherosclerosis* 2011; 215: 475-80.
24. Garg N, Syngle A, Krishan P. Nitric Oxide: Link between Inflammation and Endothelial Dysfunction in Rheumatoid Arthritis. *Int J Angiol* 2017; 26: 165-9.
25. Ghasemi A, Zahedi Asl S, Mehrabi Y, Saadat N, Azizi F. Serum nitric oxide metabolite levels in a general healthy population: relation to sex and age. *Life Sci* 2008; 83: 326-31.
26. Jilma B, Kastner J, Mensik C, *et al.* Sex differences in concentrations of exhaled nitric oxide and plasma nitrate. *Life Sci* 1996; 58: 469-76.
27. Olszanecka-Glinianowicz M, Zahorska-Markiewicz B, Janowska J, Zurakowski A. Serum concentrations of nitric oxide, tumor necrosis factor (TNF)-alpha and TNF soluble receptors in women with overweight and obesity. *Metabolism* 2004; 53: 1268-73.
28. Mahalle N, Garg MK, Naik SS, Kulkarni MV. Study of pattern of dyslipidemia and its correlation with cardiovascular risk factors in patients with proven coronary artery disease. *Indian J Endocrinol Metab* 2014; 18: 48-55.
29. Nebl J, Drabert K, Haufe S, *et al.* Exercise-Induced Oxidative Stress, Nitric Oxide and Plasma Amino Acid Profile in Recreational Runners with Vegetarian and Non-Vegetarian Dietary Patterns. *Nutrients* 2019; 11: 1875.

The Effect of Phytohaemagglutinin on Measurement and Evaluation of Lymphocytes using MTT Assay

Kittima Tungprasertpol, Suparat Wichitwiengrat, Sasiprapa Thongbopit
and Tatsanee Phermthai*

*Stem Cell Research and Development Unit, Department of Obstetrics & Gynecology, Faculty of Medicine
Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand*

Abstract

MTT assay is a technique used to detect immunological property of cells. However, the limitation of this technique is the aggregation of cells in experiment wells. The PBMC aggregation, which is found after stimulation with PHA, affected absorbance measurement. To reduce PBMC aggregation, the present study investigated the optimal concentration and incubation time of PHA to induce PBMC proliferation under chelating agent (EDTA) supplemented medium. Peripheral blood samples were provided for PBMC isolation using Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation. The PBMC was induced proliferation under various concentrations of PHA with a supplementation of EDTA. The reactions were measured by MTT assay. The results showed that PHA at a concentration of 1 µg/mL presented a low amount of PBMC aggregations resulting in significantly high absorbance value, whereas, a concentration of 5 µg/mL PHA showed high aggregation amount of PBMC and a low absorbance value as compared to that at 1 µg/mL PHA. EDTA was found to be an effective supplement for reduction of aggregation in PBMC cultures and it was concluded that optimal concentration of PHA and supplementation of EDTA can reduce PBMC aggregation in reaction for MTT assay.

Keywords: Phytohaemagglutinin, Peripheral blood mononuclear cell, EDTA

*Corresponding author E-mail address: bsuteevun_1@yahoo.com, stemcells_siriraj@yahoo.com

Received: 26 December 2019

Revised: 14 February 2020

Accepted: 29 May 2020

ความเข้มข้นของไฟโตอีแมกกลูตินินในปฏิกิริยามีผลต่อการวัดและวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ลิมโฟไซต์ด้วยเทคนิค MTT assay

กฤติมา ตั้งประเสริฐผล สุภรัตน์ วิจิตรเวียงรัตน์ ศศิประภา ทองบพิตร และ ทศนีย์ เพิ่มไทย*

หน่วยวิจัยและพัฒนาเซลล์ต้นกำเนิดเพื่อการรักษาทางการแพทย์ ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร

บทคัดย่อ

MTT assay เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลายสำหรับตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติภูมิคุ้มกันของเซลล์ อย่างไรก็ตามเทคนิคดังกล่าวยังมีข้อจำกัดจากการจับตัวเป็นก้อนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว (PBMC) หลังใส่สารกระตุ้นไฟโตอีแมกกลูตินิน (PHA) โดยพบว่ามีผลทำให้การอ่านค่าการดูดกลืนแสงผิดพลาด ส่งผลให้ผลวิเคราะห์การทดลองคลาดเคลื่อน การวิจัยนี้ได้ศึกษา (1) ผลกระทบของขนาดกลุ่มก้อนเซลล์ PBMC หลังการกระตุ้นด้วย PHA ต่อผลการวัดค่าการดูดกลืนแสง ในเทคนิค MTT และ (2) ศึกษาหาความเข้มข้นและระยะเวลาของ PHA ที่เหมาะสมในปฏิกิริยากระตุ้นเซลล์ PBMC ร่วมกับการใช้สารคีเลตเพื่อลดการจับตัวเป็นก้อนของเซลล์ PBMC โดยได้จัดเก็บเลือดและเตรียมเซลล์ PBMC เพื่อทำปฏิกิริยากับ PHA ที่ความเข้มข้นต่างกัน 2 ระดับ คือ 1 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g/mL}$) และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ส่วนการทดลองที่สองได้ทดสอบบ่มเพาะเซลล์ PBMC ร่วมกับ PHA ที่ความเข้มข้น 1 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในช่วงเวลาต่างกัน โดยมีการใช้สารคีเลตร่วมในบางช่วงเวลา และนำไปเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสง ผลการศึกษาพบว่า PHA 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นที่ทำให้เกิดกลุ่มก้อน PBMC ขนาดใหญ่มีปริมาณมากกว่า และให้ค่าการดูดกลืนแสงที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \text{ value} < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ PHA 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อีกทั้งพบว่าการใช้ PHA 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลานาน 5 ชั่วโมง ร่วมกับการเติมสารคีเลต (EDTA) ส่งผลให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่สูงและลดการจับตัวเป็นก้อนของเซลล์ PBMC สรุปได้ว่าการเติม EDTA ร่วมกับ PHA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการกระตุ้นเซลล์ PBMC สามารถลดการจับตัวเป็นก้อนของเซลล์ PBMC และให้ค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสมต่อการทดสอบด้วยเทคนิค MTT assay

คำสำคัญ: ไฟโตอีแมกกลูตินิน เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว อีดีทีเอ

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: bsuteevun_1@yahoo.com, stemcells_siriraj@yahoo.com

รับบทความ: 26 ธันวาคม 2562

แก้ไขบทความ: 14 กุมภาพันธ์ 2563

รับตีพิมพ์บทความ: 29 พฤษภาคม 2563

บทนำ

MTT assay เป็นเทคนิคการวิเคราะห์ผลด้วยการแสดงค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งเป็นเทคนิคที่แพร่หลายเนื่องจากมีกระบวนการทดสอบไม่ยุ่งยาก และใช้เครื่องมือในการวิเคราะห์ไม่ซับซ้อน นอกจากนี้ยังเป็นเทคนิคที่สามารถนำไปปรับปรุงเพื่อใช้ประกอบในการวิเคราะห์ผลการวิจัยที่หลากหลาย เช่น การนำมาใช้ตรวจสอบการเพิ่มจำนวนเซลล์ ตรวจสอบจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิต (viability cell count)^(1, 2) ศึกษาความเป็นพิษของยา (drug cytotoxicity)^(3, 5) และวัดปริมาณการสังเคราะห์ lymphokines^(6, 7) การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MTT ยังมีการนำมาปรับใช้ในการศึกษาที่มีความซับซ้อนมากขึ้นได้อีกหลายชนิด ดังตัวอย่างงานวิจัยของ Venugopal และคณะ⁽⁸⁾ ที่คัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดสายสะดือ และตรวจสอบสมบัติ immunosuppressive ด้วยเทคนิค MTT assay โดยการกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว (PBMC) ด้วยไฟโตฮีแมกกลูตินิน (PHA) แล้วจึงนำเซลล์ต้นกำเนิดที่ต้องการจะใช้ปลูกถ่ายใส่ร่วมในปฏิกิริยาเพื่อดูปริมาณการเพิ่มจำนวนเซลล์ PBMC และวัดผลด้วยเทคนิค MTT ซึ่งทำให้ผู้วิจัยสามารถคาดเดาค่าคุณสมบัติการถูกต่อต้านของภูมิคุ้มกันต่อเซลล์ต้นกำเนิดชนิดนั้นๆ และการปฏิเสธเซลล์โดยระบบภูมิคุ้มกันของผู้รับการปลูกถ่าย แต่ปัญหาหนึ่งที่มักพบในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MTT คือ การเกิดการจับตัวเป็นกลุ่มก้อนของเซลล์ PBMC ที่มีสาเหตุจากการทำปฏิกิริยากับ PHA เนื่องจาก PHA เป็นไกลโคโปรตีนจากพืชที่มี leucoagglutinating (L)-subunit เป็นส่วนหนึ่งในโครงสร้าง และส่วนประกอบนี้มีคุณสมบัติเหนียวทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวเกิดการเกาะกลุ่มกันได้⁽⁹⁻¹¹⁾ ซึ่งอาจมีผลต่อความถูกต้องของการวิเคราะห์ผล โดยเฉพาะต่อค่าการดูดกลืนแสงในขั้นตอนการอ่านผล ดังนั้นเพื่อให้ทราบแน่ชัดว่าปริมาณและขนาด

กลุ่มก้อนของเซลล์ PBMC ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยากับสาร PHA จะส่งผลต่อความถูกต้องของผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MTT หรือไม่ คณะผู้วิจัยจึงได้วางแผนการทดลองวิเคราะห์ยืนยันความแน่ชัด และได้ค้นหาวิธีลดภาวะการจับตัวเป็นกลุ่มก้อนของเซลล์ PBMC ในปฏิกิริยา โดยศึกษาการเกิดปฏิกิริยาจับตัวเป็นกลุ่มก้อนของเซลล์ PBMC ภายใต้ความเข้มข้นของ PHA ที่แตกต่างกัน ตามระยะเวลาบ่มเซลล์ PBMC ที่แตกต่างกัน รวมถึงการใช้สารคีเลต (chelating agent) ในระหว่างการเตรียมเซลล์ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MTT ให้ได้ผลที่ถูกต้องและแม่นยำ

วัสดุและวิธีการ

1. ตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดคนปกติจากอาสาสมัคร ปริมาตร 10-12 มิลลิลิตร ในหลอดเก็บเลือดที่มีสารต้านการแข็งตัวของเลือดชนิด heparin (10-30 UPS Units/mL blood; Greiner Bio-One, Kremsmünster) โดยอาสาสมัครผู้เข้าร่วมโครงการได้ทราบรายละเอียดของโครงการก่อนลงลายลักษณ์อักษร เพื่อแสดงความยินยอมก่อนเข้าร่วมโครงการ ซึ่งโครงการนี้อยู่ภายใต้การดูแลควบคุมของคณะกรรมการจริยธรรมในคนของคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

2. การแยกเซลล์ PBMC

เติม phosphate buffered saline (PBS) ในตัวอย่างเลือดในอัตราส่วน 1:1 ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ความเร็ว 1,800 รอบต่อนาที นาน 30 นาที แยกส่วน buffy coat ซึ่งเป็นส่วนของเม็ดเลือดขาวและเติม PBS ปริมาตร 4 เท่าของปริมาตรเม็ดเลือดขาวที่เก็บได้ (อัตราส่วน 4:1) ผสมให้เข้ากันและค่อยๆ ปล่อยลงบนน้ำยา Ficoll-

Hypaque ในอัตราส่วน 10:3 จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที (no break) เพื่อแยกเซลล์ PBMC ปั่นล้างด้วย PBS ที่ความเร็ว 1,600 รอบต่อนาที 10 นาที ก่อนละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของ Minimum Essential Medium Alpha, (MEM- α) ร่วมกับ 10% fetal bovine serum (FBS) และ 1% antibiotic (penicillin G sodium และ streptomycin sulfate)

3. การเปรียบเทียบการจับตัวเป็นกลุ่มก้อนของเซลล์ PBMC ที่ทำปฏิกิริยาร่วมกับ PHA

แบ่งเซลล์ PBMC ออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มแรกเป็นกลุ่มควบคุม ($n = 11$) ที่มีเซลล์ PBMC เพียงอย่างเดียว กลุ่มที่สองเป็นกลุ่มเซลล์ PBMC ที่ได้รับการกระตุ้นปฏิกิริยาด้วย PHA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ($n = 11$) และกลุ่มที่สามเป็นกลุ่มเซลล์ PBMC ที่ได้รับการกระตุ้นปฏิกิริยาด้วย PHA ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ($n = 11$) โดยแต่ละกลุ่มลงเลี้ยงเซลล์จำนวน 1.0×10^5 เซลล์ร่วมกับน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์นาน 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติม 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในแต่ละตัวอย่าง จากนั้นนำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์นาน 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติม

isopropanol ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดนาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader ที่ความยาวคลื่น 570/630 นาโนเมตร

4. การตรวจสอบอัตราการรอดชีวิต (%viability) ของเซลล์ PBMC ที่ทำปฏิกิริยาร่วมกับ PHA

ปั่นแยกเซลล์ PBMC จากตัวอย่างเลือดอาสาสมัคร 5 คน แบ่งเซลล์ PBMC หลอดละ 2.5×10^5 เซลล์ จำนวน 11 หลอด โดยแยกเซลล์ที่แบ่งใส่หลอดออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มแรกมีเฉพาะเซลล์ PBMC จำนวน 1 หลอด (กลุ่มควบคุม) กลุ่มที่สองคือเซลล์ PBMC ที่มี PHA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร จำนวน 5 หลอด และกลุ่มที่สามคือเซลล์ PBMC ที่มี PHA ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร จำนวน 5 หลอด นำเซลล์ PBMC ในกลุ่มที่สองและสามมาบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อครบเวลาในแต่ละชั่วโมงนำเซลล์ PBMC ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA มาปั่น 1,600 รอบต่อนาที 10 นาที เพื่อแยกน้ำยาที่มี PHA ออก และละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ จากนั้นนับจำนวนเซลล์เป็นเซลล์ตายด้วยเทคนิคการย้อมเซลล์ด้วย trypan blue และคำนวณอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ PBMC ตามสูตร ดังนี้

$$\text{ร้อยละเซลล์รอดชีวิต} = \frac{\text{จำนวนเซลล์เป็น} \times 100}{\text{จำนวนเซลล์เป็น} + \text{จำนวนเซลล์ตาย}}$$

5. การทดสอบการเพิ่มจำนวนของเซลล์ PBMC ที่ทำปฏิกิริยาร่วมกับ PHA ในช่วงเวลาต่างกัน

แบ่งเซลล์ PBMC ออกเป็น 3 กลุ่ม ในแต่ละกลุ่มมีเซลล์ PBMC 1.0×10^5 เซลล์ กลุ่มที่หนึ่งเป็นกลุ่มควบคุม ประกอบด้วยเซลล์ PBMC

เดียวไม่ทำปฏิกิริยากับสาร PHA ($n = 10$) กลุ่มที่สองเป็นกลุ่มเซลล์ PBMC ที่กระตุ้นด้วย PHA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ($n = 10$) และกลุ่มที่สามเป็นกลุ่มเซลล์ PBMC ที่กระตุ้นด้วย PHA ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ($n = 10$) โดย

เซลล์ในกลุ่มที่สองและสามทำปฏิกิริยาร่วมกับ PHA เป็นเวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมงตามลำดับ เซลล์ PBMC ในแต่ละกลุ่มทดสอบแบ่งออกเป็น 2 การทดลอง การทดลองที่ 1 เซลล์ PBMC ที่ทำปฏิกิริยาร่วมกับ PHA ในแต่ละชั่วโมง นำไปวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT ส่วนการทดลองที่ 2 กลุ่มเซลล์ PBMC ที่ทำปฏิกิริยาร่วมกับ PHA ในเวลาต่างกัน เมื่อครบเวลาแล้วเปลี่ยนน้ำยาเป็นน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ และเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อภายใต้ 5% CO₂ และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT

6. การทดสอบการใช้สารทีเลต ร่วมกับเซลล์ PBMC ที่ทำปฏิกิริยากับ PHA

แบ่งเซลล์ PBMC ออกเป็น 4 กลุ่มทดสอบ ในแต่ละกลุ่มมีเซลล์ PBMC 2.5×10^5 เซลล์ กลุ่มที่ 1 คือกลุ่มเซลล์ PBMC ทำปฏิกิริยาร่วมกับ PHA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($n = 12$) กลุ่มที่ 2 ใช้ PBS ร่วมกับ ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ เพื่อปั่นล้างเซลล์ PBMC ก่อนทำปฏิกิริยากับ PHA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($n = 12$) กลุ่มที่ 3 ใช้ PBS ร่วมกับ EDTA ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปั่นล้างเซลล์ PBMC ภายหลังการทำปฏิกิริยากับ PHA 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($n = 12$) และกลุ่มที่ 4 ใช้ EDTA ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ร่วมอยู่ในปฏิกิริยาระหว่างเซลล์ PBMC และ PHA 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($n = 12$) โดยกลุ่มควบคุม ($n = 12$) คือกลุ่มเซลล์ที่ไม่มีการทำปฏิกิริยาระหว่างเซลล์ PBMC และ PHA โดยเซลล์ PBMC ในแต่ละกลุ่มถูกเพาะเลี้ยงภายใต้ 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำเซลล์แต่ละกลุ่มมาปั่น 1,600 รอบต่อนาที 10 นาที เพื่อแยกน้ำยาที่มี PHA ออก จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำยา

เพาะเลี้ยงเซลล์ และเพาะเลี้ยงภายใต้ 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ต่อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT

7. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงจากเทคนิค MTT แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยใช้ paired t-test ในการวิเคราะห์ความแตกต่างของแต่ละกลุ่มโดยโปรแกรม GraphPad Prism 5 (GraphPad, San Diego, CA) ในการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิจัย

ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ PBMC เมื่อถูกกระตุ้นด้วย PHA ที่ความเข้มข้นต่างกัน

ผลการทดสอบเซลล์ PBMC กับ PHA ที่ความเข้มข้น 1 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสังเกตการจับตัวเป็นก้อนของเซลล์ PBMC ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง สามารถสังเกตเห็นกลุ่มก้อนเซลล์ PBMC ในลักษณะที่แตกต่างกัน และเมื่อเพาะเลี้ยงต่อเนื่องถึง 48 และ 72 ชั่วโมง กลุ่มก้อนของเซลล์ PBMC ที่เพาะเลี้ยงใน PHA ทั้งสองความเข้มข้นมีปริมาณเพิ่มขึ้น แต่กลุ่มก้อนของเซลล์ PBMC ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีขนาดกลุ่มก้อนที่ใหญ่กว่า (Fig. 1) และเมื่อนำเซลล์ PBMC ทั้งสองความเข้มข้นมาตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง พบว่าเซลล์ PBMC ที่กระตุ้นด้วย PHA เข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p value < 0.05) เมื่อเทียบกับเซลล์ PBMC ที่กระตุ้นด้วย PHA เข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Fig. 2) โดยมีค่าการดูดกลืนแสง เท่ากับ 0.2630 ± 0.0661 และ 0.2969 ± 0.049 ตามลำดับ เซลล์ PBMC ที่ทำปฏิกิริยาร่วมกับ PHA ความเข้มข้น 5

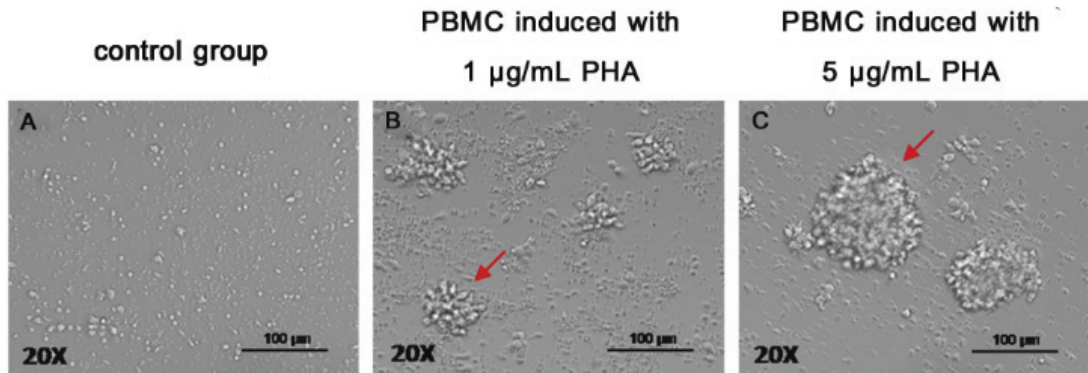


Fig. 1 Appearance of PBMC under control medium (A) and PBMC after induced with 1 $\mu\text{g/mL}$ PHA (B) and 5 $\mu\text{g/mL}$ PHA (C) for 72 hours. The aggregated PBMC demonstrated by red arrow under inverted microscopy (20X).

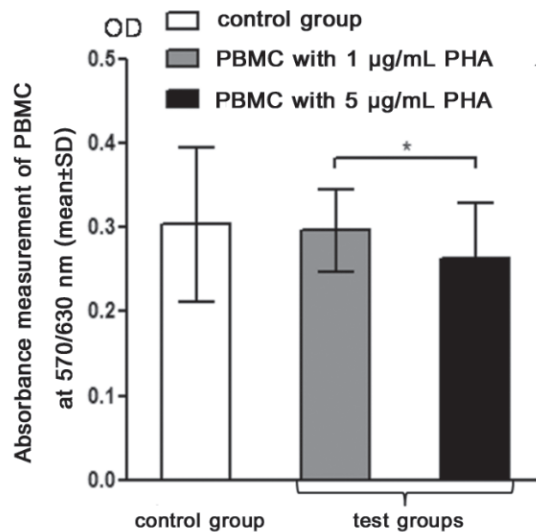


Fig. 2 The average of absorbance value of PBMC stimulated with 1 $\mu\text{g/mL}$ PHA and 5 $\mu\text{g/mL}$ PHA for 72 hours as compared between the control group and the internal test groups. Data were shown as mean $\pm$ SD of OD570/630 nm. (* p value < 0.05)

ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ส่งผลให้เกิดความผิดปกติในการวัดค่าการดูดกลืนแสงเนื่องจากการจับตัวเป็นกลุ่มก้อนของเซลล์ PBMC

อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ PBMC หลังถูกกระตุ้นด้วย PHA ที่ความเข้มข้นต่างกัน

อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ PBMC ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA ที่ความเข้มข้น 1 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร นาน 5 ชั่วโมง มีความใกล้เคียงกัน

โดยพบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ เท่ากับร้อยละ 98.36 ± 0.84 และร้อยละ 94.35 ± 4.18 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งพบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ ร้อยละ 98.27 ± 0.83 พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (p value > 0.05) แสดงว่า PHA ที่ความเข้มข้น 1 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลต่ออัตราการตายของเซลล์ PBMC

ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ PBMC ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA ความเข้มข้น 1 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลาต่างกัน

เซลล์ PBMC ทำปฏิกิริยากับ PHA ที่ความเข้มข้น 1 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมงตามลำดับ ประเมินอัตราการเกิดกลุ่มก้อนเซลล์ต่อ low power field ได้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 เท่า รวมถึงตรวจสอบการเพิ่มจำนวนเซลล์ PBMC ด้วยเทคนิค MTT พบมีการจับตัวกันเป็นกลุ่มก้อนของเซลล์ PBMC ภายหลังทำปฏิกิริยากับ PHA ทั้งสองความเข้มข้น โดยเซลล์ PBMC ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA ความเข้มข้น

5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีอัตราของขนาดกลุ่มก้อนเซลล์ PBMC ที่ประเมินเป็นร้อยละต่อ low power field มากกว่าเซลล์ PBMC ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Fig. 3) ส่วนผลการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ PBMC พบว่ากลุ่มเซลล์ PBMC ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 3, 4 และ 5 ชั่วโมงให้ผลค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียงกัน คือ 0.3005 ± 0.0350 , 0.2991 ± 0.0341 และ 0.2979 ± 0.0351 ตามลำดับ ซึ่งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (0.2822 ± 0.0390) (p value < 0.05) โดยกลุ่มเซลล์ PBMC ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 3, 4 และ 5 ชั่วโมง แสดงความแตกต่างจากกลุ่มเซลล์ PBMC ที่ทำปฏิกิริยาร่วมกับ PHA นาน 1 ชั่วโมง (0.2814 ± 0.0283) อย่างมีนัยสำคัญ (p value < 0.05) (Fig. 4A) ส่วนกลุ่มเซลล์ PBMC ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ผลค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียงกันในทุกช่วงเวลา คือ 0.279 ± 0.0339 ,

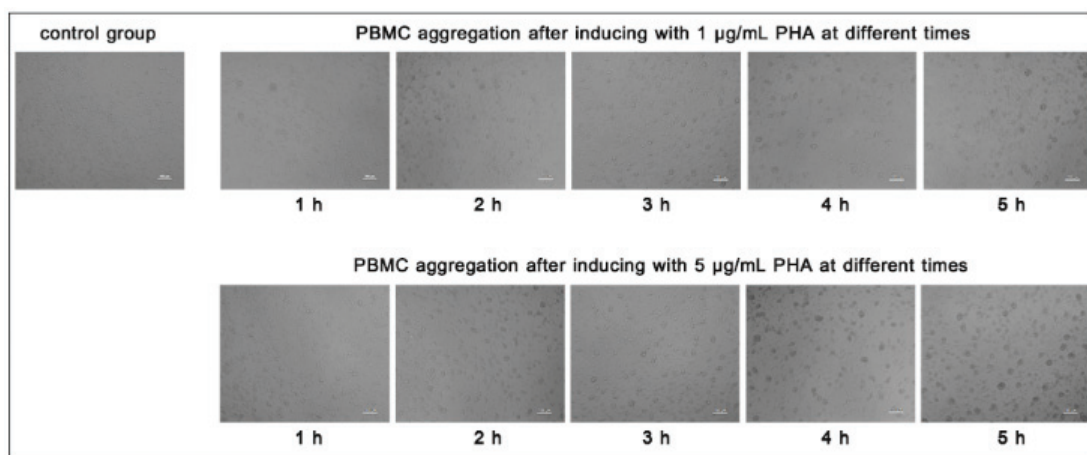


Fig. 3 Appearance of PBMC stimulated with 1 µg/mL PHA and 5 µg/mL PHA for 1, 2, 3, 4 and 5 hours. The aggregated PBMC was observed under inverted microscopy at 10x

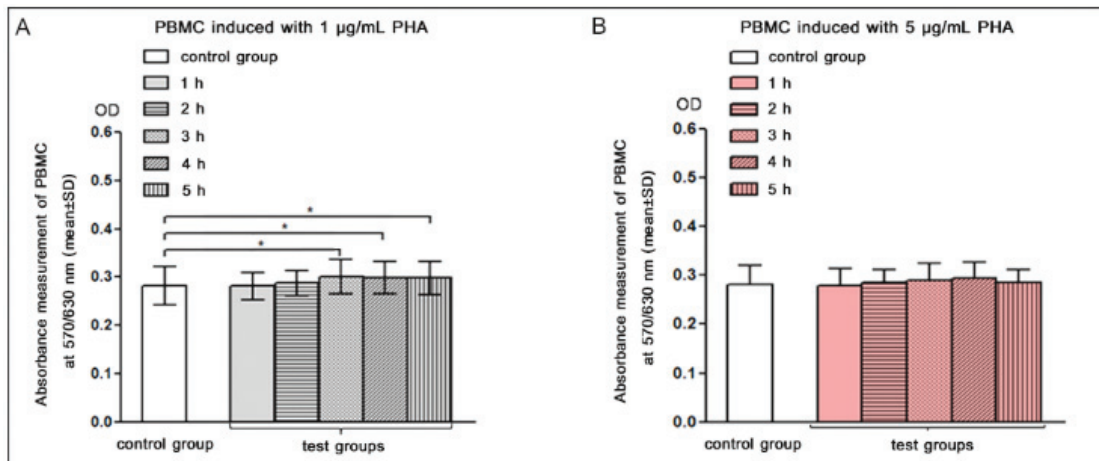


Fig. 4 The average of absorbance value of PBMC stimulated with (A) 1 µg/mL PHA and (B) 5 µg/mL PHA for 1, 2, 3, 4 and 5 hours as compared between the control group and the internal test groups. Data were shown as mean ± SD of OD 570/630 nm (**p* value < 0.05)

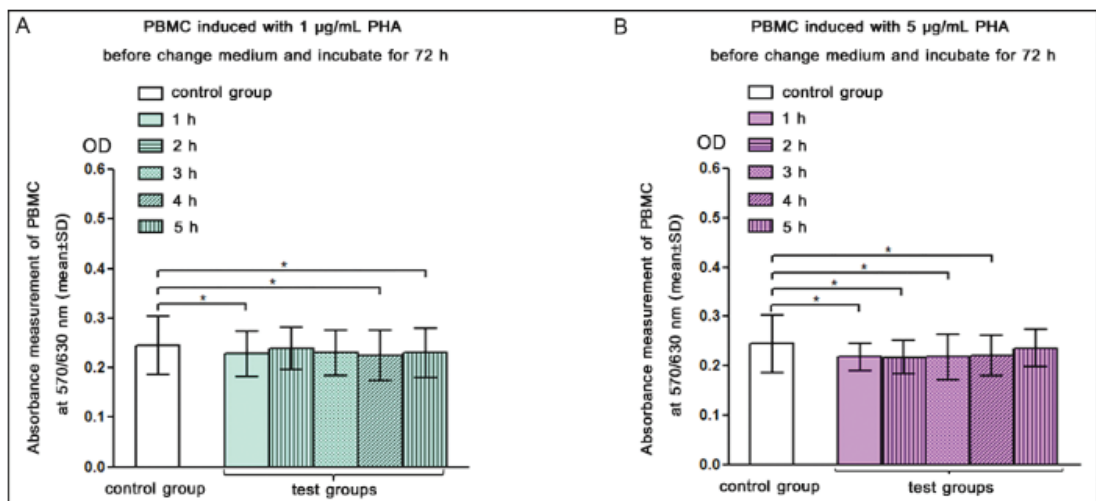


Fig. 5 The average of absorbance value of PBMC stimulated with (A) 1 µg/mL PHA and (B) 5 µg/mL PHA for 1, 2, 3, 4 and 5 hours. PHA-stimulated PBMC samples, incubated at different times, were changed medium and cultured for 72 hours. Data were shown as mean ± SD of OD 570/630 nm and compared between the control group and the internal test groups. (**p* value < 0.05)

0.2861 ± 0.0256, 0.2896 ± 0.0349, 0.2941 ± 0.0331 และ 0.2858 ± 0.0248 ที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมงตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

(*p* value > 0.05) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (0.2822 ± 0.0390) (Fig. 4B) นอกจากนี้กลุ่มเซลล์ PBMC ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อ

มิลลิลิตรที่เวลา 3, 4 และ 5 ชั่วโมงให้ผลค่าการดูดกลืนแสงมากกว่ากลุ่มเซลล์ PBMC ที่ทำปฏิกิริยาร่วมกับ PHA ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรนาน 1 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญ (p value < 0.05) หลังการทำปฏิกิริยาร่วมกับ PHA ในสองความเข้มข้นที่เวลาต่างกัน แล้วเปลี่ยนน้ำยาและเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไปอีก 72 ชั่วโมง พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มเซลล์ PBMC ที่ทำปฏิกิริยาร่วมกับ PHA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ในแต่ละชั่วโมง ให้ผลใกล้เคียงกันคือ 0.2283 ± 0.0454 , 0.2393 ± 0.0427 , 0.2299 ± 0.045 , 0.2248 ± 0.0506 และ 0.2305 ± 0.0495 ตามลำดับ ซึ่งที่เวลา 1, 4 และ 5 ชั่วโมงแสดงความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (p value < 0.05) (0.2445 ± 0.0585) (Fig 5A) ส่วนกลุ่มเซลล์ PBMC ที่ทำปฏิกิริยาร่วมกับ PHA ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดเท่ากับ 0.2359 ± 0.038 ซึ่งแตกต่างจากที่ 1 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญ (p value < 0.05)

นอกจากนี้เซลล์ PBMC ที่ทำปฏิกิริยาร่วมกับ PHA ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรเป็นเวลา 1-3 ชั่วโมงให้ค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียงกัน คือ 0.218 ± 0.0278 , 0.2171 ± 0.0335 และ 0.2179 ± 0.0466 ตามลำดับ ซึ่งกลุ่มเซลล์ PBMC ที่ทำปฏิกิริยาร่วมกับ PHA ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมงแสดงความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (p value < 0.05) (0.2445 ± 0.0585) โดยที่เวลา 4 ชั่วโมง ให้ผลค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.2207 ± 0.038 (Fig. 5B) เมื่อเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ PBMC ที่ทำปฏิกิริยาร่วมกับ PHA ความเข้มข้น 1 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ที่ชั่วโมงเดียวกัน พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงที่ตรวจวัดได้ใกล้เคียงกัน และไม่แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

แสดงว่าเวลาและความเข้มข้นที่ต่างกันไม่มีผลต่อการตายของเซลล์ PBMC

ผลการใช้ EDTA ร่วมในปฏิกิริยาระหว่างเซลล์ PBMC และ PHA ในช่วงต่าง ๆ

เพื่อตรวจสอบการใช้สารคีเลต ต่อการรอดชีวิต การเกิดกลุ่มก้อน และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ PBMC การทดลองนี้จึงแบ่งกลุ่มทดสอบออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 คือเซลล์ PBMC ทำปฏิกิริยาร่วมกับ PHA กลุ่มที่ 2 ใช้ EDTA เพื่อล้างเซลล์ PBMC ก่อนทำปฏิกิริยากับ PHA กลุ่มที่ 3 ใช้ EDTA หลังการทำปฏิกิริยาระหว่างเซลล์ PBMC กับ PHA กลุ่มที่ 4 ใช้ EDTA ร่วมในปฏิกิริยาระหว่างเซลล์ PBMC และ PHA โดยกลุ่มควบคุม คือ กลุ่มเซลล์ที่ไม่มีการทำปฏิกิริยาระหว่างเซลล์ PBMC กับ PHA

เนื่องจากผลการทดลองก่อนหน้านี้พบว่า PHA ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ส่งผลให้เกิดความผิดพลาดในการวัดค่าการดูดกลืนแสงน้อยกว่า PHA ที่ระดับความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร การทดลองนี้จึงเลือกใช้ PHA ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร จากการทดลองตรวจอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ PBMC ด้วยการย้อม trypan blue dye exclusion พบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ PBMC เท่ากับร้อยละ 92.7 ± 3.26 , 95.8 ± 7.75 , 94.51 ± 5.15 และ 93.98 ± 11.76 ตามลำดับ โดยอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ PBMC ในกลุ่มที่ 1 และ 3 แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p value < 0.01) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ร้อยละ 98.09 ± 3.03) (Fig. 6) ดังนั้นจะเห็นว่า การใช้ EDTA ในทั้ง 3 ช่วงเวลาให้ผลต่ออัตราการรอดชีวิตไม่แตกต่างกัน

อย่างไรก็ตามผลการทดสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 เท่าเพื่อดูลักษณะการเกิดกลุ่มก้อนของเซลล์ PBMC ในกลุ่มเซลล์ 3 กลุ่มที่ใช้

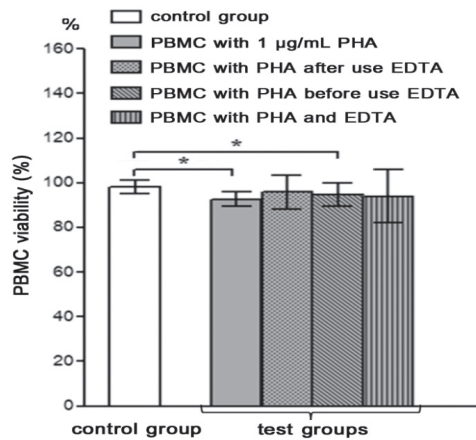


Fig. 6 Effect of EDTA on PHA-PBMC reaction. PBMC was cultured with 1 µg/mL PHA and a supplementation of 2 mM EDTA at different times. The cell viability was analyzed by trypan blue assay. Data were shown the percentage of cell viability and compared between the control group and the internal test groups. (Mean $\pm$ SD and * p value < 0.05)

EDTA ในช่วงเวลาต่างกัน พบการเกิดกลุ่มก้อนของ เซลล์ PBMC ทั้งสามกลุ่ม และในการศึกษาการเติม EDTA ในช่วงต่างๆ ของการทําปฏิกิริยาระหว่างเซลล์ PBMC กับ PHA ต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ พบว่า เซลล์ PBMC ในกลุ่มที่ 1 ให้ค่าการดูดกลืนแสงเป็น

0.2354 ± 0.0453 ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มที่ 3 และกลุ่มที่ 4 อย่างมีนัยสำคัญ (p value < 0.01) และเซลล์ PBMC ในกลุ่มที่ 2 ให้ค่าการดูดกลืนแสง เท่ากับ 0.2496 ± 0.0664 ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มที่ 3 และ 4 อย่างมีนัยสำคัญ (p value < 0.01) และให้ค่าใกล้เคียง

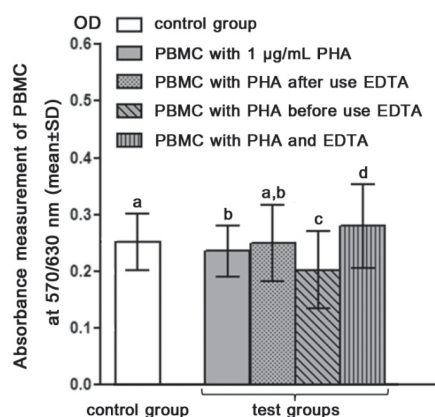


Fig. 7 The average of absorbance value of PBMC cultured with 1 µg/mL PHA and a supplementation of 2mM EDTA at different times. The OD measurement was analyzed by MTT assay. Data were shown as mean $\pm$ SD of OD 570/630 nm and compared between the control group and the internal test groups. The different letters (a, b, c and d) indicate a significant different. (p value < 0.05)

กับกลุ่มควบคุม ส่วนเซลล์ PBMC ในกลุ่มที่ 4 ให้ค่าการดูดกลืนแสงเป็น 0.2795 ± 0.0737 ซึ่งแตกต่างจากเซลล์ PBMC ในกลุ่มที่ 3 และกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (p value < 0.01) ในขณะที่เซลล์ PBMC ในกลุ่มที่ 3 ให้ผลการเพิ่มจำนวนเซลล์ต่ำที่สุดใน 4 กลุ่มโดยมีค่าเท่ากับ 0.2022 ± 0.0685 ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (p value < 0.01) (Fig. 7) จากการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าการใช้ EDTA ร่วมในปฏิกิริยาระหว่างเซลล์ PBMC กับ PHA ให้ผลดีต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ PBMC

วิจารณ์และสรุป

จากผลทดสอบการทำปฏิกิริยาระหว่างเซลล์ PBMC ที่ความเข้มข้นต่างกันโดยใช้ความเข้มข้นของ PHA ที่ 1 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร พบการจับตัวเป็นกลุ่มก้อนของเซลล์ ซึ่งส่งผลต่อค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ โดยการจับตัวเป็นกลุ่มก้อนของเซลล์ PBMC เกิดจาก L-subunit ที่เป็นส่วนหนึ่งในโครงสร้างของ PHA ทำหน้าที่กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาว รวมถึงเหนี่ยวนำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวเกิดการเกาะกลุ่มกัน⁽⁹⁻¹¹⁾ ปัญหาการจับตัวเป็นกลุ่มก้อนของเซลล์ PBMC ทำให้ผลการทดสอบด้านภูมิคุ้มกัน (Immunomodulation) ที่ตรวจวัดด้วยเทคนิค MTT เกิดการผิดพลาดได้ ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงได้ทำการทดสอบเบื้องต้นเกี่ยวกับกลุ่มก้อนของเซลล์ PBMC ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA ความเข้มข้นต่างกัน โดยเลือกความเข้มข้นของ PHA ที่ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ซึ่งเป็นช่วงความเข้มข้นที่นิยมใช้ในงานวิจัยทั่วไปที่เกี่ยวข้องกับการทดสอบเซลล์ PBMC กับ PHA เปรียบเทียบกับ PHA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และวิเคราะห์ผลค่าการดูดกลืนแสงในเทคนิค MTT โดยพบว่า PHA ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร มีขนาดของกลุ่มก้อนของเซลล์ PBMC เล็กกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่ม

ก้อนของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และเมื่อนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค MTT พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มเซลล์ในความเข้มข้นต่ำให้ค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ในความเข้มข้นมาตรฐาน (5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร) แสดงให้เห็นว่ากลุ่มก้อนของเซลล์ PBMC ส่งผลต่อค่าการดูดกลืนแสง

จากการทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ PBMC ด้วยเทคนิคการย้อมเซลล์ด้วย trypan blue ผลพบว่าเซลล์ PBMC ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA ทั้งสองความเข้มข้น มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ PBMC ไม่แตกต่างทางสถิติ (p value > 0.05) ซึ่งทำให้ทราบว่า PHA ที่ความเข้มข้น 1 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ไม่มีผลต่อการตายของเซลล์ PBMC และเมื่อเปรียบเทียบการทำปฏิกิริยาระหว่างเซลล์เดี่ยว PBMC และ PHA ในความเข้มข้น 1 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ที่ระยะเวลาต่างกัน พบว่ามีการจับตัวกันเป็นกลุ่มก้อนของเซลล์ PBMC หลังทำปฏิกิริยากับ PHA ทั้งสองความเข้มข้น แต่ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มีค่าใกล้เคียงกัน แสดงว่าความเข้มข้นของ PHA และระยะเวลาที่ทำปฏิกิริยาร่วมกับเซลล์ PBMC ไม่ส่งผลต่อการตายของเซลล์ PBMC โดยเซลล์ PBMC ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ให้อัตราของขนาดกลุ่มก้อนเซลล์ PBMC ที่ประเมินเป็นร้อยละต่อ low power field เพิ่มขึ้นเมื่อใช้เวลาในการทำปฏิกิริยานานขึ้น ในขณะที่ผลค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ลดลง ในทางกลับกันเซลล์ PBMC ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ให้อัตราของขนาดกลุ่มก้อนเซลล์ PBMC ที่ประเมินเป็นร้อยละต่อ low power field เพิ่มขึ้นเมื่อใช้เวลาในการทำปฏิกิริยานานขึ้น และค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้กลับสูงขึ้น ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า PHA ที่ความเข้มข้นน้อยนั้นอาจเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมกับ

การกระตุ้นให้เซลล์ PBMC เพิ่มจำนวน แม้จะทำให้เกิดการจับตัวเป็นกลุ่มก้อนของเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มก้อนเซลล์ PBMC ที่ทำปฏิกิริยาร่วมกับ PHA ที่ความเข้มข้นสูง พบว่าขนาดของกลุ่มก้อนที่ใหญ่ขึ้นส่งผลต่อค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าการใช้ PHA ที่ความเข้มข้นต่ำ

นอกจากนี้เพื่อแก้ปัญหาการจับตัวเป็นกลุ่มก้อนของเซลล์ PBMC ที่ทำปฏิกิริยาร่วมกับ PHA ในงานวิจัยของ Kay⁽⁹⁾ ได้ทดลองนำสาร EDTA เข้ามาป้องกันการเปลี่ยนแปลงทางเมแทบอลิซึมของเซลล์ลิมโฟไซต์ที่ทำปฏิกิริยาร่วมกับ PHA และยังมี การทดลองของ Alford⁽¹⁰⁾ ที่พบว่า EDTA ความเข้มข้น 1.6 - 2 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งการเหนี่ยวนำให้เซลล์ลิมโฟไซต์เกาะกลุ่มกันได้ ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงนำ EDTA ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นสารเคมีเดมาใช้เพื่อลดการจับตัวของเซลล์ PBMC โดยตรวจสอบผลการรอดชีวิต การเกิดกลุ่มก้อน และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ PBMC ซึ่งพบว่า การใช้ EDTA ในกลุ่มทดสอบทั้ง 3 กลุ่มให้ผลต่ออัตราการรอดชีวิตไม่แตกต่างกัน และไม่มี ความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามผลการทดสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 เท่า เพื่อ ดูลักษณะการเกิดกลุ่มก้อนของเซลล์ PBMC พบว่า ในกลุ่มที่ 3 ซึ่งใช้ EDTA เลี้ยงร่วมในปฏิกิริยาของ เซลล์ PBMC กับ PHA ให้ผลการเกิดกลุ่มก้อนน้อยที่สุด และเมื่อตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิค MTT พบว่า การใช้ EDTA ในช่วงก่อนปฏิกิริยาหรือ ร่วมในปฏิกิริยาของเซลล์ PBMC กับ PHA ให้ผลดี ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ PBMC

เอกสารอ้างอิง

1. Foongladda S, Roengsanthia D, Arjrat-tanakool W, Chuchottaworn C, Chaiprasert A, Franzblau SG. Rapid and simple MTT method for rifampicin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis 2002; 6: 1118-22.
2. Vinjamuri S, Shanker D, Ramesh RS, Nagarajan S. *In vitro* evaluation of hemolytic activity and cell viability assay of hexanoic extracts of *Bridelia Ferruginea* Benth. World J Pharm Pharm Sci 2015; 4: 1263-8.
3. Tofzikovskaya Z, Casey A, Howe O, Connor CO, Mamara MM. *In vitro* evaluation of the cytotoxicity of a folate-modified b-cyclodextrin as a new anti-cancer drug delivery system. J Incl Phenom Macrocycl Chem 2015; 81: 85-94.
4. Fotakis G, Timbrell JA. *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. Toxicol Lett 2006; 160: 171-7.
5. Jo HY, Kim Y, Park HW, *et al.* The Unreliability of MTT Assay in the Cytotoxic Test of Primary Cultured Glioblastoma Cells. Exp Neurobiol 2015; 24: 235-45.

6. Sun W, Xing L, Lin H, Leng K, Zhai Y, Liu X. Assessment and comparison of *in vitro* immunoregulatory activity of three astaxanthin stereoisomers. J Ocean Univ China 2016; 15: 283-7.
7. Price P, McMillan TJ. Use of the tetrazolium assay in measuring the response of human tumor cells to ionizing radiation. Cancer Res 1990; 50: 1392-6.
8. Venugopal P, Balasubramanian S, Majumdar AS, Ta M. Isolation, characterization, and gene expression analysis of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells under xeno-free culture conditions. Stem Cells Cloning 2011; 4: 39-50.
9. Kay JE. Interaction of lymphocytes and phytohaemagglutinin: inhibition by chelating agents. Exp Cell Res 1971; 68: 11-6.
10. Alford RH. Metal cation requirements for phytohemagglutinin-induced transformation of human peripheral blood lymphocytes. J Immunol 1970; 104: 698-703.
11. Singkome T, Greeta D. Preparation of crude red kidney bean extract for growth stimulation and cell division of peripheral blood mononuclear cells. J Assoc Med Sci 2012; 45: 23-31. (in Thai)

Emergence of Colistin Resistance in Carbapenems Resistant *Enterobacteriaceae* strains

Nittaya Singpoltan

Department of Medical Technology Maharat Nakhonratchasima Hospital,
Nakhonratchasima Province, Thailand

Abstract

The multidrug resistant organisms are major problem of public health worldwide. *Enterobacteriaceae* is one of the family that is increasing in drug resistance especially to carbapenems, a broad spectrum and high potency antibiotic. Colistin has been used as the last resort for the treatment of carbapenems resistant strains. In the recent years, there are many reports of colistin resistance by gene transfer via the mechanism of plasmid mediated colistin resistance gene, *mcr-1*. This research aimed to study the emergence of colistin resistance and the resistance gene profile in carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* (CRE). During August to December 2019, 80 isolates of CRE (68 *Klebsiella pneumoniae*, 8 *Escherichia coli* and 4 *Enterobacter cloacae*) which were isolated from the clinical microbiology unit, Maharat Nakhon Ratchasima Hospital were studied. The bacteria were identified by using a Vitek 2 compact instrument. Antimicrobial susceptibility testing was performed by disk diffusion method. The minimal inhibitory concentration (MIC) of colistin was done by microbroth dilution method via Sensititre machine. Six resistance genes (*bla*_{NDM}, *bla*_{OXA48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM} and *mcr-1*) were detected by multiplex PCR. The results showed that colistin-resistance rate was 18.8% (15/80) whereas the *mcr-1* gene was not found. The detecting resistance gene profile of 15 colistin resistant isolates were *bla*_{NDM} 9 isolates, *bla*_{OXA48-like} 5 isolates and one isolate without any resistance gene was detected. Although the *mcr-1* gene was not found, it showed that the colistin resistance mechanism does not depend only on this gene and it is still necessary for further study to avoid the emergence of more colistin resistant in CRE isolates.

Keywords: Colistin resistance, *Enterobacteriaceae*

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

Received: 17 April 2019

Revised: 25 May 2020

Accepted: 17 August 2020

อุบัติการณ์การดื้อยาโคลิสตินในเชื้อ *Enterobacteriaceae* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยากลุ่ม Carbapenems

นิตยา สิงห์พลทัน

กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลมหาสารนครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา

บทคัดย่อ

เชื้อดื้อยานับว่าเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญทั่วโลก เชื้อแบคทีเรียแกรมลบวงศ์ *Enterobacteriaceae* เป็นเชื้อชนิดหนึ่งที่พบว่ามีอัตราการดื้อยาเพิ่มมากขึ้นโดยเฉพาะการดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems ซึ่งเป็นยาที่มีศักยภาพสูงเพราะเป็นยาที่มีการออกฤทธิ์กว้างและดีที่สุดในการรักษาการติดเชื้อนี้ และได้มีการนำยาโคลิสตินมาใช้เป็นยาทางเลือกสุดท้ายในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อดื้อยานี้ ปัจจุบันมีรายงานพบเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาโคลิสติน โดยพบว่ามีกลไกที่สามารถส่งต่อยีนดื้อยาข้ามสายพันธุ์ได้ง่ายและเร็วขึ้น (plasmid mediated resistance mechanism, MCR-1) การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาอุบัติการณ์การดื้อยาโคลิสตินและชนิดของยีนดื้อยาในเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems (CRE) โดยศึกษาในเชื้อ CRE จำนวน 80 สายพันธุ์ แบ่งเป็นเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* 68 สายพันธุ์ *Escherichia coli* 8 สายพันธุ์และเชื้อ *Enterobacter cloacae* 4 สายพันธุ์ โดยการเก็บข้อมูลระหว่างเดือนสิงหาคมถึงธันวาคม พ.ศ. 2562 ที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลมหาสารนครราชสีมา การจำแนกชนิดเชื้อทำโดยเครื่องอัตโนมัติ Vitek 2 compact ทดสอบความไวต่อยาด้วยวิธี disk diffusion ตรวจหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ต่อยาโคลิสตินด้วยวิธี microbroth dilution โดยใช้เครื่องอัตโนมัติ และตรวจหายีนดื้อยา 6 ชนิด (*bla*_{NDM}, *bla*_{OXA48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM} and *mcr-1*) โดยวิธี multiplex PCR ผลการศึกษาพบอัตราการดื้อยาโคลิสตินร้อยละ 18.8 (15/80) ผลการตรวจหายีนดื้อยาไม่พบยีน *mcr-1* ที่ทำให้เชื้อดื้อยาโคลิสติน พบยีนดื้อยา *bla*_{NDM} ในเชื้อ 9 สายพันธุ์, ยีนดื้อยา *bla*_{OXA48-like} ในเชื้อ 5 สายพันธุ์ และไม่พบชนิดของยีนดื้อยาที่ตรวจหา 1 สายพันธุ์ จากผลการศึกษาพบการดื้อยาโคลิสตินเป็นสัญญาณเตือนว่าต้องมีการเฝ้าระวังการดื้อยานี้และต้องวางแผนหาแนวทางการเลือกจ่ายยาเพื่อรักษาการติดเชื้อดื้อต่อยากลุ่มนี้ อย่างไรก็ตามจากการศึกษากครั้งนี้ไม่พบยีน *mcr-1* ในเชื้อที่ดื้อยาโคลิสตินซึ่งแสดงว่าการดื้อยาโคลิสตินของเชื้ออาจไม่ได้ขึ้นกับยีน *mcr-1* เพียงอย่างเดียวซึ่งจะต้องศึกษาต่อไป

คำสำคัญ: การดื้อต่อยาโคลิสติน เชื้อ *Enterobacteriaceae*

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

รับบทความ: 17 เมษายน 2563

แก้ไขบทความ: 25 พฤษภาคม 2563

รับตีพิมพ์บทความ: 17 สิงหาคม 2563

บทนำ

เชื้อดื้อยานับว่าเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญทั่วโลกและกำลังได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากการกระจายของเชื้อดื้อยาเพิ่มมากขึ้น และอย่างรวดเร็ว ก่อให้เกิดความยากลำบากในการเลือกใช้ยาต้านจุลชีพ การดื้อยาในเชื้อแกรมลบที่เป็นปัญหาอุบัติใหม่ และเป็นสิ่งที่น่ากลัวมากที่สุดปัญหาหนึ่ง คือการระบาดของเชื้อในวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems (carbapenem resistant *Enterobacteriaceae*, CRE) ซึ่งถือเป็นยากลุ่มสุดท้ายที่มีฤทธิ์กว้างที่สุด การดื้อต่อยา carbapenems เกิดจาก 2 กลไกหลักคือการสร้างเอนไซม์ carbapenemases เช่น KPC, NDM-1, IMP หรือ VIM หรือการสร้าง β -lactamase enzymes เช่น ESBL, AmpC ร่วมกับการกลายพันธุ์ของโปรตีน porin ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก ปัจจุบัน มีรายงานการพบ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems ในหลายประเทศ ซึ่งส่งผลกระทบต่อการรักษาและสัมพันธ์กับอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยที่เพิ่มสูงขึ้น^(1,2) อีกทั้งยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ดังกล่าวสามารถแพร่กระจายออกไปได้ง่ายเนื่องจากพบได้บนหน่วยพันธุกรรมเคลื่อนที่ จึงจำเป็นต้องมีการเฝ้าระวังและควบคุมการระบาดของเชื้อดื้อยาในกลุ่มนี้

ยาโคลิสติน (colistin) หรือ polymyxin E เป็นยาต้านจุลชีพหนึ่งในสองขนานในกลุ่ม polymyxins ที่นำมาใช้ในคนได้นอกเหนือจาก polymyxin B ยาโคลิสติน มีการนำมาใช้ครั้งแรกที่ประเทศญี่ปุ่นเมื่อ พ.ศ. 2492 และที่ยุโรปและสหรัฐอเมริกาเมื่อ พ.ศ. 2493 และ พ.ศ. 2503 ตามลำดับ ยานี้ถูกนำมาใช้รักษาโรคติดเชื้ออยู่ยาวนาน 20 ปี จนมียาด้านจุลชีพกลุ่มอื่นที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นและปลอดภัยมากขึ้น ความนิยมใช้ยาโคลิสตินจึงลดลงมาก ยาโคลิสตินถูกนำไปใช้รักษาผู้ป่วยทั่วไปอีกครั้งตั้งแต่ พ.ศ. 2530

สำหรับโรคติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อต่อยาหลายขนาน ยาโคลิสตินเป็นยาด้านจุลชีพประเภท polypeptide ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ยานี้ออกฤทธิ์ทำลายเชื้อแบคทีเรีย (bactericidal) โดยการแย่งจับและจับแคลเซียมและแมกนีเซียมของผนังเซลล์ (cell membrane) ของแบคทีเรีย ทำให้ผนังเซลล์รั่วและแบคทีเรียตายในที่สุด⁽³⁾

โคลิสติน เป็นยาทางเลือกสุดท้ายที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาหลายขนาน (multidrug resistance, MDR) รวมทั้งเชื้อกลุ่ม *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems ซึ่งปัจจุบันพบว่าเชื้อกลุ่มนี้มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น เมื่อนำยาโคลิสตินมาการรักษาการติดเชื้อในผู้ป่วยจำนวนมากขึ้นก็เริ่มพบเชื้อดื้อต่อยานี้เพิ่มขึ้น ทั้งเชื้อที่ดื้อจริงต่อยาโคลิสติน และเชื้อที่ดื้อยาแฝงต่อยาโคลิสติน (heteroresistance)^(4, 5) การดื้อต่อยาโคลิสตินของแบคทีเรียส่วนใหญ่เกิดจากการดัดแปลง lipopolysaccharide (LPS) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของเชื้อ เช่น การลดการสร้าง LPS การลดส่วนประกอบของแคลเซียมและแมกนีเซียมในเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก ปัจจัยสำคัญที่สัมพันธ์กับการดื้อต่อยาโคลิสตินคือการได้รับยาโคลิสตินติดต่อกันเป็นเวลานาน⁽⁶⁾ เมื่อเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2558 มีรายงานว่าพบเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อต่อยาโคลิสติน ด้วยกลไกการดื้อยาที่สามารถส่งต่อยีนดื้อยาข้ามสายพันธุ์ได้ง่ายขึ้นและเร็วขึ้น (plasmid mediated resistance mechanism, MCR-1) ในฟาร์มปศุสัตว์ของประเทศจีน⁽⁷⁾ การศึกษาตรวจหายีน *mcr-1* ที่ดื้อต่อยาโคลิสตินในเชื้อ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems ในโรงพยาบาลต่างๆ ในประเทศจีน ช่วงเดือนมกราคมปี พ.ศ. 2557 ถึงเดือนธันวาคมปี พ.ศ. 2558 พบยีน *mcr-1* ในผู้ป่วย 3 รายใน 2 จังหวัด แสดงให้เห็นว่ามีการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาเกิดขึ้น⁽⁸⁾ ต่อมาในช่วงเดือนธันวาคมปี พ.ศ.

2558 มีรายงานว่าพบเชื้อแบคทีเรียที่มียีนดื้อยา *mcr-1* ในคนและเนื้อสัตว์ในประเทศอังกฤษ⁽⁹⁾ ปัจจุบันพบเชื้อแบคทีเรียที่มียีนดื้อยา *mcr-1* ในหลายประเทศรวมทั้งประเทศไทย⁽¹⁰⁾ โดยมีรายงานการดื้อต่อยาโคลิสตินที่เกิดจากยีน *mcr-1* ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2560 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย⁽¹¹⁾ และมีรายงานตรวจพบยีน *mcr-1* เช่นกันที่ โรงพยาบาลสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ กรมแพทย์ทหารเรือ จังหวัดชลบุรี⁽¹²⁾ การศึกษาที่โรงพยาบาลศิริราชพบความชุกของเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* ที่ดื้อต่อ colistin ร้อยละ 47.5⁽¹³⁾ การดื้อต่อยาโคลิสตินในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นและอาจเป็นปัญหาในอนาคตงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาหาอุบัติการณ์การดื้อต่อยาโคลิสตินของเชื้อ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems รวมถึงตรวจหายีนดื้อยาสชนิด *mcr-1* ในเชื้อ CRE ที่ดื้อต่อยาโคลิสติน ที่โรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา เพื่อเป็นข้อมูลในการติดตามเฝ้าระวังการดื้อยานี้ต่อไปในอนาคต

วัสดุและวิธีการ

1. ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ศึกษา

ศึกษาในเชื้อแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจที่ส่งตรวจที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา เก็บข้อมูลระหว่างเดือนสิงหาคมถึงเดือนธันวาคม ปี พ.ศ. 2562 จำนวน 80 สายพันธุ์ โดยเป็นเชื้อตัวอย่างแรก (first isolates) ที่แยกได้จากผู้ป่วยไม่ซ้ำราย ซึ่งได้จากการวินิจฉัยแยกชนิดของเชื้อโดยวิธีทดสอบทางชีวเคมี (biochemical test) และโดยเครื่องอัตโนมัติ Vitek 2 compact (bioMérieux, France) ให้ผลเป็นเชื้อกลุ่ม *Enterobacteriaceae* และทุกสายพันธุ์ที่เก็บตัวอย่างต้องให้ผลการทดสอบความไวต่อยาเป็นดื้อ

(resistant) ต่อยากลุ่ม carbapenems ชนิดใดชนิดหนึ่งหรือทั้ง 3 ชนิด แล้วจึงนำเชื้อมาทดสอบความไวต่อยาโคลิสติน เพื่อตรวจหาการดื้อต่อยาโคลิสติน

2. สารต้านจุลชีพที่ใช้ทดสอบ

การวิจัยนี้ทดสอบการดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems ด้วยวิธี disk diffusion test โดยใช้แผ่นยาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร (Oxoid, UK) ประกอบด้วยยา 3 ชนิด คือ ertapenem 10 ไมโครกรัม, imipenem 10 ไมโครกรัม, meropenem 10 ไมโครกรัม และแปลผลการทดสอบตามมาตรฐานของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)⁽¹⁴⁾ สำหรับยาโคลิสติน ทดสอบโดยวิธีหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาในการยับยั้งเชื้อ minimum inhibitory concentration (MIC) และแปลผลการทดสอบตามมาตรฐานของ European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)⁽¹⁵⁾

3. การทดสอบความไวเชื้อต่อสารต้านจุลชีพ

3.1 วิธี Disk diffusion หรือ Kirby-Bauer method

ทดสอบโดยปรับความขุ่นของเชื้อ *Enterobacteriaceae* ที่แยกได้ ปรับเทียบความขุ่นให้เท่ากับ 0.5 McFarland Standard ($1-2 \times 10^8$ CFU/mL) เกลี่ยเชื้อให้ทั่วผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar (BBL, Becton Dickinson, USA.) ที่มีความหนา 4 มิลลิเมตร วางแผ่นยาที่ต้องการทดสอบโดยแผ่นยามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ประกอบด้วยยาชนิดต่างๆ ดังต่อไปนี้คือ amoxicillin/clavulanic acid 30 ไมโครกรัม, ceftriaxone 30 ไมโครกรัม, ceftazidime 30 ไมโครกรัม, cefepime 30 ไมโครกรัม, amikacin 30 ไมโครกรัม, gentamicin 10 ไมโครกรัม, netilmicin 30 ไมโครกรัม, cipro-

floxacin 5 ไมโครกรัม, piperacillin/tazobactam 110 ไมโครกรัม, ertapenem 10 ไมโครกรัม, imipenem 10 ไมโครกรัม, meropenem 10 ไมโครกรัม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ

บริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญรอบแผ่นสารต้านจุลชีพ (inhibition zone) เทียบกับเกณฑ์มาตรฐานของ Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) แปลผลเป็นไว (susceptible), ไวปานกลาง (intermediate) และดื้อ (resistant) (Table 1)

Table 1 Zone diameter and MIC breakpoints of carbapenems and colistin for *Enterobacteriaceae* according to CLSI

Antimicrobial agent	Zone diameter breakpoint (mm)			MIC breakpoint (µg/mL)		
	S	I	R	S	I	R
Ertapenem	≥22	19-21	≤18	≤0.5	1	≥2
Imipenem	≥23	20-22	≤19	≤1	2	≥4
Meropenem	≥23	20-22	≤19	≤1	2	≥4
Colistin*	-	-	-	≤2	-	>2

*Interpreted according to EUCAST⁽¹⁵⁾

S; susceptible, I; intermediate, R; resistant

3.2 วิธี Sensititre™-ARIS™2X (Thermo Fisher Scientific, Cleveland, OH, USA)

ทดสอบความไวต่อยาโคลิสตินเชิงปริมาณ เพื่อหาค่าความเข้มข้นของยาคต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อ และแปลผลทดสอบตามมาตรฐานของ EUCAST (Table 1)

4. การตรวจยืนยันและหาชนิดของยีนดื้อยา

แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาโคลิสตินเก็บรักษาใน nutrient agar ก่อนนำส่งที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เพื่อตรวจยืนยันผลการดื้อยา และตรวจหาชนิดของยีนดื้อยา โดยตรวจหาชนิดของ

ยีนดื้อยา 6 ชนิด ได้แก่ *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM} และ *mcr-1* โดยวิธี multiplex PCR⁽¹⁶⁾ โดยใช้ไพรเมอร์ดังแสดงใน Table 2

ผลการศึกษา

เชื้อ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม carbapenems ที่ใช้ในการศึกษา

เชื้อ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม carbapenems ที่ใช้ในการศึกษา รวม 80 สายพันธุ์ เป็นเชื้อ *K. pneumoniae*, *E. coli* และ *E. cloacae* ชนิดละ 68, 8 และ 4 สายพันธุ์ ตามลำดับ โดยแยกได้จากสิ่งส่งตรวจที่แตกต่างกัน ข้อมูลแสดงใน Table 3

Table 2 The sequences of oligonucleotide primers

Primer	Sequence (5' to 3')	Product	
		Gene	size (bp)
NDM-F	5'- AACGGTTTGGCGATCTGGTTTTC -3'	<i>bla</i> _{NDM}	621
NDM-R	5'- GGCGGAATGGCTCATCACGATC -3'		
IMP-F	5'- GCGGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC -3'	<i>bla</i> _{IMP}	232
IMP-R	5'- GTA CGGTTTAAAYAAAACAACCACC -3'		
OXA48-F	5'- GGGCGTGGTTAAGGATGAACAC -3'	<i>bla</i> _{OXA-48}	438
OXA48-R	5'- TTATCATCAAGTTCAACCCAACCG -3'		
VIM-F	5'- GATGGTGTGGTTCGCATA -3'	<i>bla</i> _{VIM}	390
VIM-R	5'- CGAATGCGCAGCACCAG -3'		
KPC-F	5'- CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG -3'	<i>bla</i> _{KPC}	798
KPC-R	5'- CTTGTCATCCTTGTTAGGCG -3'		
MCR1-F	5'- GGGTGTGCTACCAAGTTTGC -3'	<i>mcr-1</i>	1126
MCR1-R	5'- CATTGGCGTGATGCCAGTTT -3'		

Table 3 Characteristics of 80 *Enterobacteriaceae* isolates

Organism	Specimen (n)				
	sputum	urine	blood	other	total
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	45	8	10	5	68
<i>Escherichia coli</i>	1	3	4	-	8
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	1	2	-	4
Total	47	12	16	5	80

ความไวต่อยาโคลิสตินของเชื้อ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems

ผลทดสอบความไวต่อยาโคลิสตินของเชื้อ CRE ทั้งหมด 80 สายพันธุ์ด้วยวิธี Sensititre™ ARIS™2X พบเป็นเชื้อดื้อต่อยาโคลิสติน 15 สายพันธุ์ (ร้อยละ 18.8) โดยเป็นเชื้อ *K. pneumoniae* 13 สายพันธุ์ ร้อยละ 16.2 (13/80), *Escherichia coli* 1 สายพันธุ์ ร้อยละ 1.2 (1/80) และ *E. cloacae* 1 สายพันธุ์ ร้อยละ 1.2 (1/80) โดยทั้ง 15 สายพันธุ์ มีค่า MIC ของยาโคลิสตินมากกว่าหรือเท่ากับ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร

ผลการทดสอบยีนดื้อยา carbapenem และยีนดื้อยาโคลิสตินชนิด *mcr-1* ของเชื้อ *Enterobacteriaceae* ดื้อต่อยาโคลิสติน ด้วยวิธี multiplex PCR

ผลตรวจหายีนดื้อยา carbapenem 5 ชนิด (*bla*_{NDM}, *bla*_{OXA48-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM}) และยีนดื้อยาโคลิสตินชนิด *mcr-1* ของเชื้อ *Enterobacteriaceae* ดื้อต่อยาโคลิสติน 15 สายพันธุ์ ด้วยวิธี multiplex PCR พบยีนดื้อยาสายพันธุ์ *bla*_{NDM} ในเชื้อ *K. pneumoniae* 8 สายพันธุ์ และ *E. coli* 1 สายพันธุ์ และพบยีนดื้อยาสายพันธุ์ *bla*_{OXA48-like} ในเชื้อ *K. pneumoniae* 5 สายพันธุ์ ทั้งนี้ ตรวจไม่พบยีนดื้อยาทั้ง 6 ชนิดในเชื้อ *E. cloacae* 1 สายพันธุ์ ซึ่งการดื้อยาอาจเกิดจากกลไกอื่นหรือยีนชนิดอื่นๆ ที่ไม่ได้ตรวจหาในครั้งนี้ ในการศึกษานี้ตรวจไม่พบยีนดื้อยาโคลิสตินชนิด *mcr-1* ในเชื้อ *Enterobacteriaceae* ดื้อต่อยาโคลิสติน ทั้ง 15 สายพันธุ์ ข้อมูลแสดงใน Table 6

ความไวต่อสารต้านจุลชีพของเชื้อ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems และโคลิสติน

ผลทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพของเชื้อ

K. pneumoniae ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems ทั้ง 68 สายพันธุ์ พบว่า เชื้อ *K. pneumoniae* ส่วนใหญ่ (มากกว่าร้อยละ 86) ดื้อต่อยาที่ใช้ทดสอบ ยกเว้นยา amikacin, gentamicin และ netilmicin ที่ยังพบว่ามีความไวอยู่ที่ประมาณ ร้อยละ 81, 75 และ 71 ตามลำดับ ข้อมูลแสดงใน Table 4

ในขณะที่ เชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อต่อยาโคลิสตินทั้ง 13 สายพันธุ์ มีความไวต่อยา amikacin, gentamicin และ netilmicin ร้อยละ 38, 38 และ 46 ตามลำดับ ในจำนวนนี้ *K. pneumoniae* ที่ดื้อต่อยาโคลิสติน สายพันธุ์ที่มียีนดื้อยาสายพันธุ์ *bla*_{OXA48-like} ให้ผลความไวต่อยา amikacin, gentamicin และ netilmicin ร้อยละ 100 ส่วน *K. pneumoniae* ที่ดื้อต่อยาโคลิสติน สายพันธุ์ที่มียีนดื้อยาสายพันธุ์ *bla*_{NDM} ให้ผลดื้อต่อยาทั้งสามชนิด ข้อมูลแสดงใน Table 5

วิจารณ์

โคลิสตินเป็นยาทางเลือกสุดท้ายที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาหลายขนาน (multidrug resistant, MDR) รวมทั้งเชื้อกลุ่ม *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems ซึ่งปัจจุบันพบว่าเชื้อกลุ่มนี้มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น เมื่อนำยาโคลิสตินมาใช้ในการรักษาการติดเชื้อดื้อยามากขึ้น ก็เริ่มพบการดื้อต่อยาโคลิสตินทำให้เกิดปัญหาในการจัดการรักษาการติดเชื้อดื้อยาดังกล่าว ดังนั้นการวิจัยนี้จึงได้ศึกษาอุบัติการณ์การดื้อต่อยาโคลิสตินในเชื้อ *Enterobacteriaceae* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems ที่โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยราชภัฏวชิรเวศน์ จังหวัดเชียงใหม่ ระหว่างเดือนสิงหาคมถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2562 และนำเชื้อสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาโคลิสตินไปตรวจหาชนิดของยีนที่ทำให้เชื้อดื้อต่อยาโคลิสตินด้วยกลไกการดื้อยาแบบใหม่ที่สามารถส่งต่อยีนดื้อยาข้ามสายพันธุ์ได้ง่ายขึ้นและเร็วขึ้น (plasmid mediated colistin

Table 4 Antimicrobial susceptibility profile of 68 carbapenem resistant *K. pneumoniae*

Antimicrobial agent	%Susceptible	%Resistant
Amoxicillin/clavulanic acid	0	100
Ceftriaxone	1	99
Ceftazidime	1	99
Cefepime	6	94
Amikacin	81	19
Gentamicin	75	25
Netilmicin	71	29
Ciprofloxacin	6	94
Piperacillin/tazobactam	0	100
Ertapenem	0	100
Meropenem	14	86
Imipenem	10	90

Table 5 Susceptibility results of 15 colistin resistant in carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* isolates

Organism	Resistance gene	%Susceptibility							
		ETP	IMP	MEM	CIP	AK	GN	NET	CL
<i>K. pneumoniae</i> (13)	<i>bla</i> _{OXA48-like} (5)	0	20	20	0	100	100	100	0
	<i>bla</i> _{NDM} (8)	0	0	0	0	0	0	0	0
	All (13)	0	8	8	0	38	38	46	0
<i>E. coli</i> (1)	<i>bla</i> _{NDM}	0	0	0	0	100	0	0	0
<i>E. cloacae</i> (1)	none	0	0	0	100	100	100	100	0

ETP; ertapenem, IMP; imipenem, MEM; meropenem, CIP; ciprofloxacin, AK; amikacin, GN; gentamicin, NET; netilmicin, CL; colistin

Table 6 Laboratory testing results of 15 colistin resistant in carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* isolates

Organism	Specimen	Resistant gene	MIC (µg/mL)			
			ETP	MEM	IMP	CL
1. <i>K. pneumoniae</i>	sputum	<i>bla</i> _{OXA48-like}	>4	>8	>8	4
2. <i>K. pneumoniae</i>	sputum	<i>bla</i> _{NDM}	>4	>8	8	>4
3. <i>K. pneumoniae</i>	sputum	<i>bla</i> _{NDM}	>4	8	2	>4
4. <i>K. pneumoniae</i>	urine	<i>bla</i> _{OXA48-like}	2	1	1	>4
5. <i>K. pneumoniae</i>	urine	<i>bla</i> _{NDM}	>4	8	8	>4
6. <i>K. pneumoniae</i>	sputum	<i>bla</i> _{NDM}	>4	>8	>8	>4
7. <i>K. pneumoniae</i>	sputum	<i>bla</i> _{NDM}	>4	8	2	4
8. <i>K. pneumoniae</i>	urine	<i>bla</i> _{NDM}	>4	>8	8	4
9. <i>K. pneumoniae</i>	sputum	<i>bla</i> _{OXA48-like}	>4	>8	>8	>4
10. <i>K. pneumoniae</i>	sputum	<i>bla</i> _{OXA48-like}	>4	>8	>8	>4
11. <i>E. coli</i>	blood	<i>bla</i> _{NDM}	>4	4	2	>4
12. <i>K. pneumoniae</i>	blood	<i>bla</i> _{NDM}	>4	>8	>8	4
13. <i>E. cloacae</i>	blood	not detect	>4	>8	>8	>4
14. <i>K. pneumoniae</i>	sputum	<i>bla</i> _{NDM}	>4	>8	8	>4
15. <i>K. pneumoniae</i>	sputum	<i>bla</i> _{OXA48-like}	>4	>8	8	>4

ETP; ertapenem, IMP; imipenem, MEM; meropenem, CL; colistin

resistance, MCR-1) เพื่อนำผลการศึกษาไปใช้เป็นข้อมูลในการเฝ้าระวังติดตามสถานการณ์ดื้อยาในโรงพยาบาลและควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาเหล่านี้ในโรงพยาบาลต่อไป

ในการศึกษานี้ ตัวอย่างเชื้อ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems 80 สายพันธุ์ ประกอบด้วย เชื้อ *K. pneumoniae* 68 สายพันธุ์

E. coli 8 สายพันธุ์ และเชื้อ *E. cloacae* 4 สายพันธุ์ พบเชื้อที่ดื้อต่อยาโคลิสติน 15 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 18.8 (15/80) ส่วนใหญ่เป็นเชื้อ *K. pneumoniae* ร้อยละ 16.2 (13/80) พบในเชื้อ *E. coli* ร้อยละ 1.2 (1/80) และเชื้อ *E. cloacae* ร้อยละ 1.2 (1/80) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในแถบเอเซียแปซิฟิกที่รายงาน *K. pneumoniae*

ดื้อต่อยาโคลิสตินร้อยละ 13.8 ที่อินเดีย และร้อยละ 50 ที่ฟิลิปปินส์ แต่ในช่วงเวลาใกล้เคียงกัน ในประเทศไทยมีรายงาน *K. pneumoniae* ที่ดื้อต่อโคลิสตินเพียงร้อยละ 7.3⁽¹⁷⁾ ซึ่งในการศึกษารังนี้พบอัตราการดื้อต่อยาโคลิสตินที่สูงกว่าการศึกษาหลายแห่งที่มีรายงานก่อนหน้านี้ เช่น ในปี พ.ศ. 2554 มีรายงานจากประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน พบการดื้อต่อยาโคลิสตินในเชื้อ CRE ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่ไม่ได้รับการรักษาด้วยยาโคลิสติน ร้อยละ 4.9 (4/82)⁽¹⁸⁾ สำหรับในประเทศไทย มีรายงานการดื้อต่อยาโคลิสตินในเชื้อ *K. pneumoniae* จากสถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินี ในปี พ.ศ. 2549-2550 พบว่า *K. pneumoniae* 55 ตัวอย่าง ที่ไวต่อยากลุ่ม carbapenems ร้อยละ 100 แต่ดื้อต่อยาโคลิสตินร้อยละ 7.3⁽¹⁹⁾ และรายงานของ Olaitan และคณะ ซึ่งได้สำรวจในคนสุขภาพดี ในประเทศไทย ลาว อีสราเอล ไนจีเรีย และฝรั่งเศส ระหว่างปี พ.ศ. 2555-2556 โดยการแยกเชื้อจากอุจจาระ พบว่า *K. pneumoniae* ดื้อต่อยาโคลิสติน ร้อยละ 6.6 (14/212)⁽²⁰⁾ และรายงานการศึกษาที่โรงพยาบาลศรีนครินทร์ซึ่งเป็นโรงพยาบาลขนาดใหญ่ในภูมิภาคเดียวกัน ที่พบอัตราการดื้อต่อยาโคลิสตินในเชื้อ CRE ร้อยละ 12.4 (36/291) และพบอัตราการดื้อต่อยาโคลิสตินของเชื้อ *K. pneumoniae* ร้อยละ 17.9⁽²¹⁾ อย่างไรก็ตาม มีรายงานจาก Capone และคณะ พบการดื้อต่อยาโคลิสตินของเชื้อ *K. pneumoniae* ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาล 9 แห่งในกรุงโรม ประเทศอิตาลี ปี พ.ศ. 2553-2554 สูงถึงร้อยละ 36.1⁽²²⁾ อย่างไรก็ดี ในการศึกษาพบว่าอัตราการดื้อต่อยาโคลิสตินน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาที่โรงพยาบาลศิริราชในผู้ป่วยนอนโรงพยาบาลที่ได้รับการรักษาด้วยโคลิสติน ซึ่งเป็นเชื้อที่ colonization พบความชุกของเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* ที่ดื้อต่อโคลิสตินถึงร้อยละ 47.5⁽¹⁴⁾ อัตราการดื้อต่อยาโคลิสตินที่

แตกต่างกันอาจเกิดจาก ช่วงเวลาที่ศึกษา เกณฑ์การคัดเลือกตัวอย่าง ชนิดของสิ่งส่งตรวจและจำนวนตัวอย่างเชื้อที่ศึกษา

ผลตรวจหาชนิดของยีนดื้อยา ตรวจไม่พบยีนดื้อยาโคลิสตินชนิด *mcr-1* พบยีนดื้อยา 2 ชนิด ได้แก่ *bla*_{NDM} และ *bla*_{OXA48-like} ซึ่งเป็นยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ที่ทำให้เชื้อดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems การตรวจไม่พบยีนดื้อยาโคลิสตินชนิด *mcr-1* ในการศึกษาครั้งนี้แสดงว่าการดื้อยาโคลิสตินไม่ได้ขึ้นกับยีน *mcr-1* เพียงอย่างเดียวซึ่งต้องทำการศึกษาต่อไป โดยก่อนหน้านี้มีรายงานการศึกษาตรวจหา ยีน *mcr-1* ที่ดื้อต่อยาโคลิสตินในเชื้อ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems ในโรงพยาบาลต่างๆ ในประเทศจีนช่วงเดือนมกราคม พ.ศ. 2557 ถึง เดือนธันวาคม พ.ศ. 2558 พบยีน *mcr-1* ในผู้ป่วย 3 รายใน 2 จังหวัด แสดงว่ามีการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาเกิดขึ้น ในประเทศไทยมีการรายงานการดื้อต่อยาโคลิสตินที่เกิดจากยีน *mcr-1* ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2560 จากการศึกษาของวันทนา ปวีณกิตติพร และคณะ ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข⁽¹¹⁾ และมีรายงานการศึกษาที่โรงพยาบาลสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ กรมแพทย์ทหารเรือ จังหวัดชลบุรี ซึ่งมีการตรวจพบยีน *mcr-1*⁽¹²⁾ เช่นกัน ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องมีการเฝ้าระวังการดื้อยานี้ และควบคุมการระบาดในโรงพยาบาลด้วย

การรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาหลายขนาน (MDR) รวมทั้งเชื้อกลุ่ม *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems มักใช้ยาหลายชนิดร่วมกัน (combination therapy) จากการศึกษาพบว่ายีน *K. pneumoniae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems ให้ผลความไวต่อยา amikacin มากที่สุดคือร้อยละ 81 รองลงมาคือยา gentamicin ร้อยละ 75 ส่วนเชื้อ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อ

ยาในกลุ่ม carbapenems ที่ดื้อต่อยาโคลิสตินยังมีผลความไวต่อยาทั้ง amikacin และ gentamicin ร้อยละ 38-100 ข้อมูลนี้อาจเป็นประโยชน์ต่อแพทย์ในการเลือกยาที่เหมาะสมในการรักษาผู้ป่วยได้

สรุป

การศึกษานี้เป็นการรายงานการดื้อต่อยาโคลิสตินในเชื้อ CRE ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมาเป็นครั้งแรก โดยพบการดื้อยาร้อยละ 18.8 และยังคงตรวจไม่พบยีนดื้อยาชนิด *mcr-1* ที่ทำให้เชื้อดื้อต่อยาโคลิสตินในการศึกษาครั้งนี้ ดังนั้นจึงควรมีการเฝ้าระวังและมีมาตรการควบคุมไม่ให้มีการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยานี้เพิ่มขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณจารุกรณ์ วิศาลสวัสดิ์ หัวหน้ากลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา ที่ให้การสนับสนุนในการทำวิจัยนี้ ขอขอบคุณ ผศ.ประพันธ์ หลวงสุข คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ได้ให้คำปรึกษาและชี้แนะแก้ไขบทความวิจัยนี้ ขอขอบคุณ ดร.อนุศักดิ์ เกิดสิน สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้คำปรึกษาและสนับสนุนข้อมูลในการวิจัยทำให้การศึกษาวิจัยสำเร็จลุล่วงด้วยดี และขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาระบบบริการ โรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Bratu S, Mooty M, Nichani S, *et al.* Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: epidemiology and recommendations for detection. *Antimicrob Agent and Chemother* 2005; 49: 3018-20.
2. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, *et al.* Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 2010; 10: 597-602.
3. Thamlikitkul V. Colistin: Antimicrobial for treat gram negative bacterial infection. *Siriraj Med Bull* 2008; 1: 152-8. (in Thai)
4. Antonaidou A, Kontopidou A, Kontopidou F, *et al.* Colistin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* emerging in intensive care unit patients: first report of a multiclonal cluster. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 786-90.
5. Beno P, Kremery V, Demitrovicova A. Bacteraemia in cancer patients caused by colistin-resistant gram-negative bacilli after previous exposure to ciprofloxacin and /or colistin. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 497-8.

6. Matthaiou DK, Michalopoulos A, Rafailidis PI, *et al.* Risk factors associated with the isolation of colistin-resistant Gram-negative bacteria: a matched case-control study. *Crit Care Med* 2008; 36: 807-11.
7. Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, *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* 2016; 16: 161-8.
8. Yu H, Qu F, Shan B, *et al.* Detection of the *mcr-1* colistin resistance gene in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* from different hospitals in China. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60: 5033-5.
9. Doumith M, Godbole G, Ashton P, *et al.* Detection of plasmid-mediated *mcr-1* gene conferring colistin resistance human and food isolates of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* in England and Wales. *J Antimicrob Chemother* 2016; 71: 2300-5.
10. Olaitan AO, Chabou S, Okdah L, *et al.* Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. *Lancet Infect Dis* 2016; 16: 289-90.
11. Paveenkittiporn W, Kerdsin A, Chokngam S, Bunthi C, Sangkitporn S, Gregory CJ. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance and New Delhi metallo- β -lactamase gene in extensively drug-resistant *Escherichia coli* isolated from a patient in Thailand. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2017; 87: 157-9.
12. Srijan A, Margulieux KR, Ruekit S, *et al.* Genomic characterization of nonclonal *mcr-1*-positive multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* from clinical samples in Thailand. *Microb Drug Resist* 2018; 24: 403-10.
13. Wangchinda W, Pati N, Maknakhon N, Seenama C, Tiengrim S, Thamlikitkul V. Collateral damage of using colistin in hospitalized patients on emergence of colistin-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* colonization and infection. *Antimicrob Resist Infect Control* 2018; 7: 1-12.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2019. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th Informational supplement. M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
15. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Sweden: Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019. [cite 2020 April 9] available from: https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
16. Hatrogjit R, Kerdsin A, Akeda Y, Hamada S. Detection of plasmid-mediated colistin-resistant and carbapenem-resistant genes by multiplex PCR. *MethodsX* 2018; 5: 532-6.
17. Bialvaei AZ, Samadi KH. Colistin mechanisms and prevalence of resistance. *Curr Med Res Opin* 2015; 31: 707-21.

18. Chen S, Hu F, Zhang X, *et al.* Independent emergence of colistin-resistant *Enterobacteriaceae* clinical isolates without colistin treatment. J Clin Microbiol 2011; 49: 4022-3.
19. Punpanich W, Tantichattanont W, Wongwatcharapaiboon S, Treeraweeraiphong V. *In vitro* susceptibility pattern of cephalosporin-resistant Gram-negative bacteria. J Med Assoc Thai 2008; 91: 21-7.
20. Olaitan AO, Diene SM, Kempf M, *et al.* Worldwide emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from health humans and patients in Lao PDR, Thailand, Israel, Nigeria and France owing to inactivation of the PhoP/PhoQ regulator mgrB: an epidemiological and molecular study. Int J Antimicrob Agents 2014; 44: 500-7.
21. Sangrut S, Siripanthong S. Surveillance of colistin resistance in carbapenem-non-susceptible *Enterobacteriaceae* isolates from Srinagarind Hospital. [B.Sc. Thesis in Medical Technology] Khon Khaen: Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Khaen University; 2015. (in Thai)
22. Capone A, Giannella M, Fortini D, *et al.* High rate of colistin resistance among patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection account for an excess of mortality. Clin Microbiol Infect 2013; 19: E23-30.

Prevalence of Thalassemia Carriers of Foreign Spouses Attending at the Antenatal Clinic, Metropolitan Health and Wellness Institution, Bangkok

Nutcha Hiriotuppa*

Laboratory of Metropolitan Health and Wellness Institution, Bangkok, Thailand

Abstract

Thalassemia is one of the genetic disorders considered to be a serious health issue in Thailand. The proportion of thalassemia carriers in the Thai population differs from one region to another. Each year, more than 10,000 new thalassemia cases are diagnosed, some of which have severe anemic symptoms. Currently, Thailand is facing the settlement of many migrant workers from neighboring countries, thus, it is very important to assess the prevalence of thalassemia carriers, as well as the possibility of newborns with severe thalassemia conditions in this population. In this study, the data of thalassemia diagnosis in migrant workers were collected from January to December 2019 at the Metropolitan Health and Wellness Institution's Antenatal Care Clinic in Bangkok. The total number of 162 (81 couples) migrants were recruited with 56 (34.57%) Burmese, 58 (35.80%) Laos and 48 (29.63%) Cambodian. Diagnosis of beta-thalassemia was carried out using the capillary electrophoresis while alpha-thalassemia-1 SEA and THAI type deletions were analyzed by real-time PCR. The results from 162 migrants showed that there were 5 (3.09%) with beta-thalassemia trait, 54 (33.33%) with HbE trait, 3 (1.85%) with double heterozygous alpha-thalassemia-1 SEA type deletion and HbE trait, 12 (7.41%) with homozygous HbE and 8 (4.94 %) with alpha-thalassemia-1 SEA type deletion trait. In addition, one couple from Laos was found to carry a risk of having a new born with beta-thalassemia/HbE disease. When the Hardy-Weinberg Formula (HWF) was used to genetically estimate the number of the new born with severe thalassemia diseases per 10,000 pregnancies, it was predicted that 3 babies would be born with homozygous beta-thalassemia, 75 with beta-thalassemia/HbE disease and 12 with Hb Bart's hydrops fetalis. Taken together, these data suggest that the intensive control, prevention and management of thalassemia diseases at the national level are very important issue to be implemented.

Keywords: Thalassemia, Thalassemia trait screening, Severe thalassemia, Metropolitan Health and Wellness Institution, Bangkok

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

Received: 3 April 2020

Revised: 20 April 2020

Accepted: 5 June 2020

ความชุกพาหะธาลัสซีเมียในกลุ่มสมรสต่างด้าวที่มาฝากครรภ์ ของสถาบันพัฒนาสุขภาพเขตเมือง กรุงเทพฯ

ณัชชา หิริโอดัปปะ*

กลุ่มงานคลินิกห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชั้นสูติร สถาบันพัฒนาสุขภาพเขตเมือง กรุงเทพฯ

บทคัดย่อ

โรคโลหิตจางธาลัสซีเมียจัดเป็นโรคทางพันธุกรรมที่เป็นปัญหาสำคัญสำหรับประเทศไทย ประชากรไทยมีคนที่เป็พาหะของธาลัสซีเมีย (thalassemia carrier) ในสัดส่วนที่แตกต่างกันไปตามภูมิภาค ในแต่ละปีมีผู้ป่วยโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียเกิดใหม่จำนวนปีละไม่ต่ำกว่า 10,000 ราย ซึ่งผู้ป่วยเหล่านี้มีอาการรุนแรงและมีภาวะซีด ปัจจุบันมีการย้ายถิ่นฐานของประชากรต่างด้าวมาประกอบอาชีพในประเทศไทยจำนวนมาก ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาความชุกของพาหะธาลัสซีเมีย พร้อมทั้งวิเคราะห์ความเป็นไปได้ในการเกิดบุตรต่างด้าวที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง จากการศึกษาในช่วงเดือนมกราคม-เดือนธันวาคม พ.ศ. 2562 โดยการตรวจหาพาหะธาลัสซีเมียในกลุ่มสมรสต่างด้าวที่มาฝากครรภ์ที่สถาบันพัฒนาสุขภาพเขตเมือง กรุงเทพฯ จำนวน 81 คู่ (162 คน) จำแนกเป็น พม่า 56 คน (ร้อยละ 34.57) ลาว 58 คน (ร้อยละ 35.80) กัมพูชา 48 คน (ร้อยละ 29.63) ซึ่งการตรวจวินิจฉัยเบต้า-ธาลัสซีเมีย (beta-thalassemia) ทำโดยการตรวจวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของฮีโมโกลบินด้วยวิธีแคปิลลารี อิเล็กโตรโฟรีซิส (capillary electrophoresis) และตรวจวินิจฉัยอัลฟา-ธาลัสซีเมีย-1 ชนิด SEA และ THAI type deletions โดยวิธี real-time PCR พบว่าในจำนวน 162 ราย มีผู้ที่เป็นพาหะของเบต้า-ธาลัสซีเมีย 5 ราย (ร้อยละ 3.09) พาหะฮีโมโกลบินอี 54 ราย (ร้อยละ 33.33) พาหะฮีโมโกลบินอีร่วมกับพาหะอัลฟา-ธาลัสซีเมีย-1 ชนิด SEA type deletion 3 ราย (ร้อยละ 1.85) โอลิโกแซ็กส์ฮีโมโกลบินอี 12 ราย (ร้อยละ 7.41) และพาหะอัลฟา-ธาลัสซีเมีย-1 ชนิด SEA type deletion 8 ราย (ร้อยละ 4.94) นอกจากนี้พบคู่เสี่ยงชาวลาวที่มีโอกาสเกิดบุตรเป็นโรคเบต้า-ธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอี (beta-thalassemia /HbE disease) 1 คู่ เมื่อคำนวณตามหลักการทางพันธุศาสตร์โดยใช้สูตรของฮาร์ดีและไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg formulation) เพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการเกิดบุตรเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง ของสตรีต่างด้าวที่ตั้งครรภ์ทุก 10,000 ราย พบว่ามีโอกาสที่จะเกิดบุตรเป็นโอลิโกแซ็กส์เบต้า-ธาลัสซีเมีย 3 คน เบต้า-ธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอี 75 คน และฮีโมโกลบินบาร์ตไฮดรอปฟีทัลลิส (Hb Bart's hydrops fetalis) 12 คน ดังนั้นจึงควรมีการควบคุมป้องกันโรค และการบริหารจัดการดูแลในระดับประเทศอย่างจริงจังต่อไป

คำสำคัญ: ธาลัสซีเมีย การคัดกรองพาหะธาลัสซีเมีย โรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง สถาบันพัฒนาสุขภาพเขตเมือง กรุงเทพฯ

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

รับบทความ: 3 เมษายน 2563

แก้ไขบทความ: 20 เมษายน 2563

รับตีพิมพ์บทความ: 5 มิถุนายน 2563

บทนำ

โรคโลหิตจางธาลัสซีเมีย (thalassemia)⁽¹⁾ เป็นโรคโลหิตจางเรื้อรังชนิดหนึ่งที่มีสาเหตุจากความผิดปกติทางพันธุกรรม ทำให้ร่างกายมีการสร้างโปรตีนโกลบินที่มีลักษณะผิดปกติ ส่งผลให้เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยมีอายุสั้นและถูกทำลายได้ง่ายทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการซีดเหลืองเรื้อรังและมีภาวะแทรกซ้อนต่างๆ ตามมา จากการศึกษาด้านประชากรพันธุศาสตร์⁽²⁾ พบว่ามีประชากรร้อยละ 35 (มากกว่า 20 ล้านคน) ของประเทศเป็นพาหะของโรคโลหิตจางธาลัสซีเมีย โดยพบความชุกของอัลฟา-ธาลัสซีเมียชนิด α^0 —thalassemia ร้อยละ 2-9 ชนิด α^+ —thalassemia ร้อยละ 8-30 เบต้า-ธาลัสซีเมีย (β —thalassemia) ร้อยละ 1-3 และฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดฮีโมโกลบิน อีเทรต (Hb E trait) ร้อยละ 10-50 ทำให้ในแต่ละปีมีผู้ป่วยจำนวน 20,000 รายเป็นผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรง มีภาวะซีดเรื้อรัง และมีผู้ป่วยโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียเกิดใหม่ ปีละไม่ต่ำกว่า 10,000 ราย จากรายงานของ Tanphaichitr VS ในนามมูลนิธิโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียแห่งประเทศไทย⁽³⁾ พบผู้ที่เป็นพาหะของโรคธาลัสซีเมีย (thalassemia trait) ในแต่ละภูมิภาค มีความชุกของยีนธาลัสซีเมียชนิดต่างๆ ไม่เท่ากัน โดยภาคเหนือมียีนอัลฟา-ธาลัสซีเมีย ร้อยละ 30 ยีนเบต้า-ธาลัสซีเมีย ร้อยละ 9-10 และพบยีนฮีโมโกลบินอี ร้อยละ 8 ภาคอีสานมียีนอัลฟา-ธาลัสซีเมีย ร้อยละ 20 ยีนเบต้า-ธาลัสซีเมีย ร้อยละ 6 และยีนฮีโมโกลบินอี ร้อยละ 20-60 ภาคใต้พบยีนอัลฟา-ธาลัสซีเมีย ร้อยละ 16 ยีนเบต้า-ธาลัสซีเมีย ร้อยละ 2-4 และยีนฮีโมโกลบินอี ร้อยละ 9-11 ภาคกลางพบยีนอัลฟา-ธาลัสซีเมีย ร้อยละ 20-25 ยีนเบต้า-ธาลัสซีเมีย ร้อยละ 3 ยีนฮีโมโกลบินอี ร้อยละ 13-19 เนื่องจากภาวะโลหิตจางเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของไทยและประเทศต่างๆ ทั่วโลก ซึ่งสำหรับประเทศไทย เชื่อว่าสาเหตุสำคัญเกิดจากการขาดธาตุเหล็ก จึงมีการณรงค์แก้ปัญหาด้วยการให้ยาเสริมธาตุเหล็ก โดยเฉพาะในหญิงตั้งครรภ์⁽⁴⁾

อย่างไรก็ตามบริเวณที่มีความชุกของโรคธาลัสซีเมียสูง เช่น เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ก็เป็นสาเหตุหนึ่งของภาวะโลหิตจางในประชากร การวิจัยทำให้ทราบถึงสาเหตุที่แท้จริง จึงมีความสำคัญต่อการควบคุมและป้องกันแก้ปัญหาภาวะโลหิตจางในประชากรได้อย่างถูกต้อง เนื่องจากปัจจุบันมีการย้ายถิ่นฐานของประชากรต่างด้าวซึ่งอาจเกิดจากเหตุผลทางเศรษฐกิจหรือทางสังคม ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางความชุกของยีนธาลัสซีเมียชนิดต่างๆ และพบว่าคนต่างด้าวที่มาอาศัยอยู่ในประเทศไทยมีการคลอดบุตรมากขึ้น ทำให้การเฝ้าระวังอุบัติการณ์ผู้ป่วยโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียเกิดใหม่ชนิดรุนแรงเปลี่ยนแปลงไป จึงจำเป็นต้องศึกษาหาความชุกพาหะธาลัสซีเมียของคนต่างด้าวที่อาศัยในประเทศไทยเพื่อการวางแผนป้องกันควบคุมโรคธาลัสซีเมียต่อไป การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความชุกพาหะธาลัสซีเมียของกลุ่มสมรสต่างด้าวทุกคนที่มาฝากครรภ์ ที่สถาบันพัฒนาสุขภาพเขตเมือง กรุงเทพฯ และเพื่อศึกษาวิเคราะห์ความเป็นไปได้ในการเกิดบุตรเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงของสตรีต่างด้าวที่ตั้งครรภ์ทุก 10,000 การตั้งครรภ์ ซึ่งเป็นประโยชน์ ต่อการวางแผนการควบคุมต่อไปในเขตกรุงเทพฯ

วัสดุและวิธีการ

การศึกษานี้เป็นการวิจัยเชิงวิเคราะห์ ณ จุดเวลาใดเวลาหนึ่ง (cross-sectional analytic studies) เพื่อประเมินขนาดของพาหะโรคธาลัสซีเมียในกลุ่มสมรสต่างด้าวทุกคนที่มาฝากครรภ์ที่สถาบันพัฒนาสุขภาพเขตเมือง กรุงเทพฯ ช่วงปี พ.ศ. 2562 จำนวน 81 คู่ (162 คน) กลุ่มสมรสต่างด้าวทุกคนที่มาฝากครรภ์ได้รับการให้คำปรึกษาทางพันธุกรรม และการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อสนับสนุนการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียตามแนวทางของกระทรวงสาธารณสุข⁽⁵⁻⁶⁾ โดยมีกระบวนการดำเนินงานประกอบด้วย การตรวจหาพาหะธาลัสซีเมีย อัลฟาและเบต้าด้วยการพิจารณาจาก

ค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง โดยใช้ค่า MCV <80 fL และ MCH <27 pg อ้างอิงตามเกณฑ์ของ Weatherall DJ และ Clegg JB⁽⁷⁾ การตรวจหาปริมาณและชนิดของฮีโมโกลบิน (Hb typing) ด้วยวิธีแคปิลลารี อิเล็กโตรโฟรีซิส และการตรวจความผิดปกติของอัลฟา-ธาลัสซีเมีย-วันเทรต ด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ยีนด้วยวิธีเรียล-ไทม์พีซีอาร์ของอัลฟา-ธาลัสซีเมีย-วัน ชนิดเซาท์อีสต์เอเชียและชนิดไทย (Southeast Asian type และ THAI type alpha thalassemia-1 real-time PCR) เพื่อหาพื้นที่เสี่ยงต่อการเกิดโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง⁽⁸⁾ นอกจากนี้ได้ทดลองทำนายประชากรที่เป็นธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงที่อาจจะเกิดขึ้นเมื่อประชากรมีสัดส่วนอัลลีลคงที่ โดยนำความถี่ของยีนมาวิเคราะห์คำนวณโดยใช้หลักการประชากรพันธุศาสตร์ของฮาร์ดีและไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg formulation; HW)^(9, 10) [$p^2 + 2pq + q^2 = 1$ เมื่อ p เป็นความถี่อัลลีลเบต้า-ธาลัสซีเมีย และ q คือความถี่อัลลีลฮีโมโกลบินอี] ซึ่งใช้เป็นหลักในการคำนวณประชากรที่มีความเป็นไปได้ในการเกิดบุตรเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง ได้แก่ โฮโมไซกัสเบต้า-ธาลัสซีเมีย เบต้า-ธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอี และฮีโมโกลบิน บาร์ต ไฮดรอป ฟีทัลลิส (Hb Bart's hydrops fetalis) ของสตรีตั้งครรภ์ทุก 10,000 ราย

ผลการวิจัย

ผลตรวจคู่สมรสต่างตัวทุกคนที่มาฝากครรภ์ที่สถาบันพัฒนาสุขภาพระดับเขตเมือง กรุงเทพฯ จำนวนทั้งหมด 81 คู่ (162 คน) เป็นชาวพม่า 56 คน (ร้อยละ 34.57) ชาวลาว 58 คน (ร้อยละ 35.80) ชาวกัมพูชา 48 คน (ร้อยละ 29.63) โดยตรวจหาปริมาณและชนิดของฮีโมโกลบินด้วยวิธีแคปิลลารี อิเล็กโตรโฟรีซิส และวิธีเรียล-ไทม์พีซีอาร์ในการตรวจ อัลฟา-ธาลัสซีเมีย-วัน ชนิดเซาท์อีสต์เอเชียและชนิดไทย พบว่าเป็นปกติ 80 คน (ร้อยละ 49.38) เบต้า-ธาลัสซีเมียเทรต 5 คน (ร้อยละ 3.09) ฮีโมโกลบินอีเทรต 54 คน (ร้อยละ 33.33) ฮีโมโกลบินอีร่วมกับอัลฟา-ธาลัสซีเมีย-วันเทรต ชนิดเซาท์อีสต์เอเชีย 3 คน (ร้อยละ 1.85) โฮโมไซกัสฮีโมโกลบินอี 2 คน (ร้อยละ 7.41) พบอัลฟา-ธาลัสซีเมีย-วันเทรตชนิดเซาท์อีสต์เอเชีย 8 คน (ร้อยละ 4.94) ดังแสดงใน Table 1 และพบคู่เสี่ยงชาวลาวที่มีโอกาสเกิดบุตรเป็นโรคเบต้า-ธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอี 1 คู่ และเมื่อนำข้อมูลที่ได้คำนวณตามหลักการทางพันธุศาสตร์⁽⁹⁾ ได้ความถี่อัลลีล (allelic frequency) ดังแสดงใน Table 2

Table 1 Percent of various types of Thalassemia in this study

Thalassemia type	Individual (%)
Heterozygous beta thalassemia	5 (3.09)
Heterozygous Hb E	54 (33.33)
Homozygous Hb E	12 (7.41)
Heterozygous alpha thalassemia-1 SEA type deletion	8 (4.94)
Double heterozygous alpha thalassemia-1 SEA type deletion / Hb E	3 (1.85)
Normal	80 (49.38)
Total	162 (100)

Table 2 Beta-globin allele and alpha-globin allele frequency of individuals in this study

Thalassemia type	Individual (%)	β^A	β^0 or β^+	β^E	$\alpha\alpha$	-- SEA *
Heterozygous beta thalassemia (beta thalassemia trait)	5 (3.09)	5	5	0	10	0
Heterozygous Hb E (Hb E trait)	54 (33.33)	54	0	54	108	0
Homozygous Hb E	12 (7.41)	0	0	24	24	0
Heterozygous alpha thalassemia-1 (alpha thalassemia-1 trait)	8 (4.94)	16	0	0	8	8
Double heterozygous alpha thalassemia-1 / Hb E	3 (1.85)	3	0	3	3	3
Normal	80 (49.38)	160	0	0	160	0
Total	162 (100)	238	5	81	313	11

-- SEA *หมายถึง ยีนอัลฟา-ธาลัสซีเมีย-วันเทรตชนิดเซาท์อีสต์เอเชีย

ความถี่ของยีน:

- beta-thalassemia $= 5/324 = 0.015$
- HbE $= 81/324 = 0.250$
- alpha-thalassemia $11/324 = 0.034$

ผลการทดลองใช้ HW ทำนายประชากรที่เป็นธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงที่อาจเกิดขึ้นเมื่อประชากรมีสัดส่วนอัลลีลคงที่ เมื่อนำข้อมูลความถี่อัลลีลมาคำนวณโดยใช้หลักการประชากรพันธุศาสตร์ของฮาร์ดีและไวน์เบิร์ก⁽¹⁰⁾ [$p^2 + 2pq + q^2 = 1$ เมื่อ p เป็นความถี่อัลลีลเบต้า-ธาลัสซีเมีย และ q คือความถี่อัลลีล ฮีโมโกลบินอี] เพื่อหาความเป็นไปได้ในการเกิดของเด็กที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง ได้ผลดังนี้

- homozygous beta-thalassemia $= (0.015 \times 0.015) \times 10,000 = 2.25$ หรือ 3 คน
- beta-thalassemia/HbE disease $= (2 \times 0.015 \times 0.250) \times 10,000 = 75$ คน
- homozygous alpha-thalassemia-1 (Hb Bart's hydrops fetalis) $= (0.034 \times 0.034) \times 10,000 = 11.56$ หรือ 12 คน

วิจารณ์

ผลการทดลองใช้ Hardy-Weinberg formulation ทำนายประชากรที่เป็นธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงที่อาจเกิดขึ้นเมื่อประชากรมีสัดส่วนอัลลีลคงที่ เพื่อเปรียบเทียบข้อมูลกับผลการศึกษาวิจัยของ นายแพทย์

วิชัย และคณะ⁽¹¹⁾ ที่แสดงความชุกของพาหะโรคธาลัสซีเมียในคนไทยทั่วประเทศและได้แสดงข้อมูลของศูนย์อนามัยที่ 1 กรุงเทพฯ ในปี พ.ศ. 2547 ซึ่งพบว่าความเป็นไปได้ในการเกิดบุตรเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงของสตรีตั้งครรภ์ทุก 10,000 การตั้งครรภ์ เป็นโฮโมไซกัส-เบต้าธาลัสซีเมีย 1 คน ฮีโมโกลบินอี/เบต้าธาลัสซีเมีย 37 คน และ ฮีโมโกลบิน บาร์ต ไฮดรอปฟีทาลิส 7 คน และจากการศึกษาของ ณัฏฐา หิริโตนัปะ เรื่อง ความชุกของพาหะโรคธาลัสซีเมียคนไทย ในสถาบันพัฒนาสุขภาพระดับเขตเมือง กรุงเทพฯ ในปี พ.ศ. 2560⁽¹²⁾ พบความเป็นไปได้ในการเกิดบุตรเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง ของสตรีตั้งครรภ์ทุก 10,000

การตั้งครรภ์ เป็นโฮโมไซกัสเบต้า-ธาลัสซีเมีย 1 คน ฮีโมโกลบินอี/เบต้า-ธาลัสซีเมีย 22 คนและ ฮีโมโกลบิน บาร์ต ไฮดรอปฟีทาลิส 9 คน และจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าในปี พ.ศ. 2562 มีความเป็นไปได้ในการเกิดบุตรต่างตัวเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง โฮโมไซกัสเบต้า-ธาลัสซีเมีย 3 คนมากกว่าปี พ.ศ. 2547 และ พ.ศ. 2560 อีกทั้งมีการเพิ่มขึ้นของชนิดเบต้า-ธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอีถึง 75 คน มากกว่าปี พ.ศ. 2547 และ พ.ศ. 2560 และมีการเพิ่มขึ้นของ ฮีโมโกลบิน บาร์ต ไฮดรอปฟีทาลิส 12 คน มากกว่าปี 2547 (7 คน) และ 2560 (9 คน) ดังแสดงใน Table 3

Table 3 Comparable of estimate the number of the newborn babies with severe Thalassemia diseases per 10,000 pregnancies in 2004, 2017 and 2019

Report (Nationality/status, Year of report)	Severe Thalassemia diseases (number newborn babies per 10,000 pregnancies)		
	Homozygous β thal	β thal/HbE	Hb Bart's hydrops fetalis
Thai, 2004 ⁽¹¹⁾	1	37	7
Thai, 2017 ⁽¹²⁾	1	22	9
Immigrant workers, 2019	3	75	12

แสดงให้เห็นว่าสถานการณ์โรคธาลัสซีเมียในพื้นที่เขตกรุงเทพมหานคร มีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งอาจเกิดจากการย้ายถิ่นของคนต่างด้าวที่มาทำงานในเขตกรุงเทพมหานครมากขึ้น เมื่อนำข้อมูลการฝากครรภ์ของสถาบันพัฒนาสุขภาพระดับเขต ปี พ.ศ. 2562 มีคู่สมรสต่างด้าวที่มาฝากครรภ์ทั้งหมด 81 คู่ (162 คน) พบคู่เสี่ยงชาวลาวที่มีโอกาสเกิดบุตรเป็นโรค เบต้า-ธาลัสซีเมีย/ ฮีโมโกลบินอี 1 คู่ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาวิจัยของ Tritipsombut J และคณะ⁽¹³⁾ ที่ได้ศึกษาในพื้นที่เขตนครหลวงเวียงจันทน์โดยนำแนวทางการ

ดำเนินงานที่ใช้ได้ผลดีในประเทศไทยไปประยุกต์ใช้กับหญิงตั้งครรภ์ชาวลาว พบว่าธาลัสซีเมียในประชากรลาวมีความซับซ้อนและพื้นฐานการเกิดโรคคล้ายกับคนอีสานมาก แต่มีความถี่ของการตรวจพบแตกต่างกัน โดยพบ Hb E ร้อยละ 30.1 อัลฟาธาลัสซีเมีย-วัน สูงถึงร้อยละ 8.6 ส่วน เบต้า ธาลัสซีเมียพบร้อยละ 2.3 ซึ่งสูงกว่าที่พบในภาคอีสานของไทย ดังนั้นจึงอาจใช้เป็นเหตุผลอธิบายถึงโอกาสการพบธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงได้มากกว่าในกลุ่มประชากรลาว

สรุป

จากผลการวิเคราะห์ด้วยหลักการของประชากรพันธุศาสตร์ โดยใช้ข้อมูลการฝากครรภ์ของสถาบันพัฒนาสุขภาพเขตเมืองฯ เดือนมกราคมถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2562 มีคู่สมรสต่างด้าวที่มาฝากครรภ์ 81 คู่ (162 คน) เป็นชาวพม่า 56 คน (ร้อยละ 34.57) ชาวลาว 58 คน (ร้อยละ 35.80) ชาวกัมพูชา 48 คน (ร้อยละ 29.63) พบคู่เสี่ยงที่มีโอกาสเกิดบุตรเป็นโรคเบต้า-ธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอี 1 คู่ และเมื่อนำผลการศึกษาที่ได้มาวิเคราะห์ความเป็นไปได้ในการเกิดบุตรเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงของสตรีต่างด้าวที่ตั้งครรภ์ทุก 10,000 ครรภ์ จะมีโอกาสเป็น ฮีโมโกลบินเบต้า-ธาลัสซีเมีย 3 คน เบต้า-ธาลัสซีเมีย/ ฮีโมโกลบินอี 75 คนและฮีโมโกลบิน บาร์ต ไฮดรอป ฟีทลิส 12 คน โรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงนับเป็นปัญหาที่สำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในปัจจุบันคนต่างด้าวที่อาศัยอยู่ในประเทศไทยมีจำนวนหลายแสนคน ซึ่งคนเหล่านี้สามารถสร้างครอบครัวกับคนไทย และคนต่างด้าวด้วยกัน ทำให้มีบุตรหลานเกิดขึ้นมาก ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการบริหารจัดการป้องกัน ควบคุมการเกิดของเด็กที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง เนื่องจากเด็กที่เกิดมาและเป็นโรคจะต้องใช้เงินจำนวนมากในการรักษาพยาบาล

ข้อเสนอแนะ

กระทรวงสาธารณสุขควรมีมาตรการและวิธีคัดกรองในหญิงตั้งครรภ์และสามี ทั้งคนไทยและต่างด้าวให้มีการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด เพื่อป้องกันไม่ให้เด็กเกิดใหม่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง อีกทั้งควรมีการศึกษาวิจัยความชุกธาลัสซีเมียในวัยเรียน-วัยรุ่นในระดับประเทศ และควรสนับสนุนงานวิจัยใหม่ๆ เช่น การจัดการความรู้เรื่องโรคธาลัสซีเมีย เพื่อลดความเสี่ยงในการเกิดบุตรเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง ตลอดจนนำ

ความรู้ดังกล่าวมาใช้ประกอบการวางแผนควบคุมโรคธาลัสซีเมียให้ลดลง เพื่อประหยัดงบประมาณค่าใช้จ่ายในระดับประเทศต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited hemoglobin disorders: an increasing global health problem. Bull World Health Organ 2001; 79: 704-12.
2. Viprakasit V. Comprehensive Management for Thalassemia. J Hematol Transfus Med 2013; 23: 303-20.
3. Tanphaichitr VS. Current situation of thalassemia in Thailand. The 7th International Conference on Thalassemia and Hemoglobinopathies; 1999: 78-9.
4. World Health Organization. Iron deficiency anemia: Assessment, prevention and control for program manager, Geneva, WHO/NHD 2001; 01: 3.
5. Department of Medical Services. Guidelines for the care of thalassemia patients in general practice. Bangkok; 2017: 45-52.
6. Insiripong S, Yingsitsiri W, Boondumrong-sagul J, Noiwanakul J. Prevalence of thalassemia traits in people without anemia or microcytosis. J Hematol Trans fus Med 2014; 24: 25-9.
7. Weatherall DJ, Clegg JB. The laboratory diagnosis of the thalassemias. In: The thalassemia syndromes. 4rd ed. Blackwell Scientific Publication: Oxford; 2001: 690.

8. He S, Zhang Q, Li D, *et al.* Prevention and control of Hb Bart's Disease in Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2014; 178: 138-41.
9. Khoury MJ, Little J, Burke W. Human genome epidemiology: a scientific foundation for using genetic information to improve health and prevent disease. New York: Oxford University Press; 2004.
10. Christine A, Andrews C. The Hardy-Weinberg Principle. *Nature Education Knowledge* 2010; 3: 65.
11. Tienthavorn V, Pattanapongsthorn J, Charoensak S, Sac-Tunge R, Charoenkwan P, Sanguansermisri T. Prevalence of Thalassemia Carriers in Thailand. *Thai Journal of Hematology and Transfusion Medicine* 2006; 16: 307-12.
12. Hiriotuppa N. Prevalence of Thalassemia trait of spouses attending at the Antenatal Clinic, Metropolitan Health and Wellness Institution, Bangkok. *Thailand Journal of Health Promotion and Environmental* 2018; 41: 93-9.
13. Tritipsombut J, Sanchaisuriya K, Phollarp P, *et al.* Micromapping of thalassemia and hemoglobinopathies in different regions of northeast Thailand and Vientiane, Lao PDR. *Hemoglobin* 2012; 36: 47-56.

Outcome of The Prenatal Beta-Thalassemia Control Program

Molthicha Soonklang^{*1}, Nopporn Sawatjui¹, Suppagira Soepsrisook²,
Manasicha Mekjarasnapha², and Monthana Chantharaniyom^{1, 3}

¹*Thalassemia Center, Khon Kaen Hospital, Khon Kaen Province, Thailand*

²*Department of Obstetrics and Gynecology, Khon Kaen Hospital, Khon Kaen Province, Thailand*

³*Department of Pediatrics, Khon Kaen Hospital, Khon Kaen Province, Thailand*

Abstract

Beta thalassemia (β -thalassemia) is an inherited hemoglobin disorders and can be found in Thailand. β -thalassemia can be found in 3-9% of Thai population and 13% approximately abnormal hemoglobin E (HbE), which is found mostly in northeastern Thai population. As a result, Thai couples are at risk of giving birth to babies with β -thalassemia major. The objective of this study was to develop a program for control and prevention of β -thalassemia. This retrospective descriptive research collected data from medical records and DNA β -thalassemia records at Khon Kaen Hospital during October, 2016-September, 2018. A total 6,151 couples were screened for thalassemia using complete blood count (CBC) and dichlorophenol indophenols precipitation test (DCIP). All positive screening samples were confirmed by hemoglobin typing (HPLC) and reverse dot blot hybridization (RDB) analysis using β -thalassemia test kit (Southeast Asia Panel, SEA) 22 panels which was a new technique. Only one blood tube was used in the entire process from screening through the molecular confirmation. Couples at risk were assessed by clinician and referred to genetic counseling, prenatal diagnosis and/or termination. The screening tests classified 235 (3.82%) couples as β -thalassemia carriers (MCV<80 fl and MCH<27 pg). Genes that cause thalassemia major were found in 92 (1.5%) couples based on molecular confirmation. After genetic counseling and prenatal diagnosis, 14 (0.23%) fetuses with β -thalassemia major were found. Thirteen couples (0.21%) made decision to terminate their fetuses and only one couple made decision to continue the pregnancy (β^0 -thalassemia/HbE) and planned to receive bone marrow transplantation in the future. In conclusion, the program established in this study is effective for control and prevention of

*Corresponding author E-mail address: bbec01monticha@gmail.com

β -thalassemia by reducing number of new cases with these diseases. This program can suggest a guideline to prevent the birth of babies with β -thalassemia major and related issues.

Keywords: Beta-thalassemia genes, Genetic counseling, Prenatal diagnosis

ผลลัพธ์ของการควบคุมและป้องกันโรคเบตาธาลัสซีเมียแบบ ครบวงจรร่วมกับการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด

มลติชา สูญกลาง^{*1} นพพร สวัสดิ์จ้อย¹ ศุภจิรา สืบสีสุข² มนสิชา เมฆจรสณภา²
และ มนธนา จันทรนิยม^{1, 3}

¹ศูนย์ธาลัสซีเมีย โรงพยาบาลขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น ²กลุ่มงานสูติ-นรีเวช โรงพยาบาลขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น
³กลุ่มงานกุมารเวชกรรม โรงพยาบาลขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น

บทคัดย่อ

โรคเบตาธาลัสซีเมียเป็นโรคพันธุกรรมทางโลหิตวิทยาที่สามารถพบได้บ่อยในประเทศไทย โดยพบประชากรที่มียีนเบตาธาลัสซีเมีย (β -Thalassemia) ประมาณร้อยละ 3-9 และพบยีนฮีโมโกลบินผิดปกติชนิด hemoglobin E (Hb E) โดยเฉลี่ยร้อยละ 13 ซึ่งสามารถพบได้มากขึ้นในประชากรภาคอีสาน ส่งผลให้คู่สมรสที่มียีนผิดปกติเสี่ยงต่อการให้กำเนิดบุตรที่เป็นโรคเบตาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง (β -thalassemia major) การศึกษาค้นคว้านี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาแนวทางการควบคุมและป้องกันโรคเบตาธาลัสซีเมียรายใหม่ เป็นการศึกษาเชิงพรรณนาโดยใช้ข้อมูลย้อนหลังจากฐานข้อมูลเวชระเบียนโรงพยาบาลขอนแก่น และทะเบียนตรวจดีเอ็นเอเบตาธาลัสซีเมีย ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2559 ถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2561 กลุ่มตัวอย่างเป็นหญิงตั้งครรภ์และสามี ที่มาฝากครรภ์ในโรงพยาบาลขอนแก่น จำนวน 6,151 คู่ โดยทุกรายได้รับการตรวจความสมบูรณ์ของเม็ดเลือดแดง (CBC) ตรวจคัดกรองฮีโมโกลบินอีด้วยน้ำยา DCIP ในรายที่มีผลผิดปกติอย่างใดอย่างหนึ่งจะตรวจยืนยันชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน และตรวจยืนยันระดับโมเลกุลด้วยเทคนิค reverse dot blot hybridization (RDB) ซึ่งเป็นชุดตรวจ β -thalassemia (Southeast Asia Panel, SEA) 22 panels ที่ได้พัฒนาขึ้น โดยใช้ตัวอย่างเลือดเพียง 1 หลอดสำหรับการตรวจคัดกรองจนถึงการตรวจยืนยันระดับโมเลกุล (one tube service) จากนั้นประเมินคู่เสี่ยง หากพบว่าหญิงตั้งครรภ์มีโอกาสให้กำเนิดทารกเป็นโรคเบตาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง จะให้คำปรึกษาทางพันธุศาสตร์ และแพทย์เฉพาะทางจะดำเนินการวินิจฉัยทารกในครรภ์ และพิจารณายุติการตั้งครรภ์ จากการศึกษาพบว่าหญิงฝากครรภ์และสามี จำนวน 235 คู่ คิดเป็นร้อยละ 3.82 (235/6,151) มีผลคัดกรองโรคธาลัสซีเมียเบื้องต้นผิดปกติ (MCV<80 fl และ MCH<27 pg) และมีความเสี่ยงต่อการเป็นพาหะเบตาธาลัสซีเมีย หลังการตรวจระดับโมเลกุลเพื่อหาความผิดปกติของเบตาโกลบิน พบว่าหญิงตั้งครรภ์และสามี 92 คู่ คิดเป็นร้อยละ 1.5 (92/6,151) มียีนที่ก่อให้เกิดโรคเบตาธาลัสซีเมียรุนแรง โดยหลังจากการให้คำปรึกษาทางพันธุศาสตร์ และวินิจฉัยทารกในครรภ์ พบว่ามีทารกเป็นเบตาธาลัสซีเมียรุนแรง 14 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.23 (14/6,151) ได้รับการยุติการตั้งครรภ์ 13 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.21 (13/6,151) และประสงค์

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: bbec01monticha@gmail.com

ตั้งครรภ์ต่อ 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.02 (1/6,151) โดยต้องการรักษาด้วยวิธีการปลูกถ่ายไข่กระดูก โดยสรุปรูปแบบการดำเนินงานเพื่อควบคุมและป้องกันโรคเบตาธาลัสซีเมียรายใหม่ที่เกิดขึ้น สามารถควบคุม และลดอุบัติการณ์ของโรคเบตาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมทั้งใช้เป็นแนวทางสำหรับการวางแผนป้องกันผลกระทบที่เกิดจากการตั้งครรภ์ทารกที่เป็นโรคเบตาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงได้

คำสำคัญ: ยีนเบตาธาลัสซีเมีย การให้คำปรึกษาทางพันธุศาสตร์ การวินิจฉัยทารกในครรภ์

บทนำ

โรคเบตาธาลัสซีเมียเป็นโรคพันธุกรรมทางโลหิตวิทยา โดยพบว่าร้อยละ 3-9 ของประชากรในประเทศไทย มียีนเบตาธาลัสซีเมีย (β -thalassemia) และพบยีนฮีโมโกลบินผิดปกติ hemoglobin E (HbE) ในคนอีสานสูงถึงร้อยละ 30 - 40⁽¹⁾ ผู้ที่มีความผิดปกติของยีนเบตาธาลัสซีเมียบนโครโมโซมเพียงอย่างเดียวจะไม่มีอาการ หรือเรียกว่าพาหะ (trait) ผู้ป่วยที่เป็นโรคซึ่งคิดเป็นประมาณร้อยละ 1 ของประชากร เกิดจากการที่ประชากรไทยมียีนผิดปกติดังกล่าวแฝงอยู่ เมื่อมีการสมรสกันระหว่างหญิง-ชายทำให้เกิดการปฏิสัมพันธ์ (interaction) ของยีนเบตา จึงทำให้พบผู้ป่วยโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียได้ ทั้งที่มีความรุนแรงน้อย ปานกลาง และรุนแรงมาก ซึ่งโรคเบตาธาลัสซีเมียที่มีอาการรุนแรงมาก (β -thalassemia major) คือ homozygous β -thalassemia (β^0/β^0) เกิดจากการมีความผิดปกติของ beta-globin gene บนโครโมโซมทั้งคู่ทำให้ไม่สามารถสร้าง beta-globin chain ได้ ผู้ป่วยเหล่านี้จะให้ผลการตรวจ Hb typing เป็น A₂F ส่วนโรคเบตาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงปานกลาง (β -thalassemia intermedia) คือ β -thalassemia/Hb E (β^0/β^E) เกิดจากการมีความผิดปกติของ beta-globin gene บนโครโมโซมคู่ที่ 11 ข้างเดียว ทำให้สร้าง beta-globin chain ไม่ได้ และอีกข้างสร้างได้ลดลง การตรวจ Hb typing จะให้ผลเป็น EF หรือ EFA อาการที่สำคัญของทารกที่มีภาวะนี้คือ ทารกจะมีความผิดปกติ ซีด หน้าตาเปลี่ยนแปลง ตับ ม้ามโต ซึ่งต้องได้รับเลือดเป็นประจำและอายุขัยสั้น⁽²⁾ จึงต้องได้รับการดูแล และเสียค่าใช้จ่ายเป็นจำนวนมาก โดยมีประมาณการค่าใช้จ่ายในการดูแลทารกที่เป็นโรคนี้สูงถึงรายละ 1.26-6.6 ล้านบาท ในกรณีที่ทารกมีชีวิตอยู่จนถึงอายุประมาณ 10-30 ปี⁽³⁾ ดังนั้น การตรวจคัดกรองโรคธาลัสซีเมียในสตรีตั้งครรภ์ และคู่สมรส การตรวจยืนยันและการวินิจฉัยทารกก่อน

คลอดจึงมีความสำคัญ เนื่องจากทั้งคู่มีโอกาสถ่ายทอดพันธุกรรมสู่ทารกในครรภ์ ทำให้ทารกเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงได้ โรงพยาบาลขอนแก่นมีหน้าที่ให้บริการตรวจ และให้การรักษาทันทีที่สุดแก่ผู้ป่วยเป็นโรคธาลัสซีเมีย และควบคุมป้องกันโรคเบตาธาลัสซีเมียในเขตสุขภาพที่ 7 (จังหวัดขอนแก่น จังหวัดร้อยเอ็ด จังหวัดมหาสารคาม จังหวัดกาฬสินธุ์) และจังหวัดใกล้เคียง เพื่อลดจำนวนผู้ป่วยรายใหม่ ซึ่งไม่เพียงแต่ลดปัญหาที่จะเกิดกับผู้ป่วยเอง แต่เป็นการลดความสูญเสียทางเศรษฐกิจ สังคม และการกระทบต่อจิตใจของคนในครอบครัว สนองนโยบาย และยุทธศาสตร์แห่งชาติ ซึ่งการดำเนินงานเพื่อให้บรรลุเป้าหมายนั้น กระบวนการและขั้นตอนในการควบคุมและป้องกันโรคเบตาธาลัสซีเมีย จะต้องรวดเร็ว ถูกต้อง เข้าถึง ครบวงจร (one stop service) รวมถึงการให้ความรู้แก่สตรีตั้งครรภ์เกี่ยวกับโรคเบตาธาลัสซีเมีย การถ่ายทอดทางพันธุกรรม ผลกระทบต่อทารกและมารดา การตัดสินใจในการตั้งครรภ์ต่อไป ตลอดจนการยุติการตั้งครรภ์⁽⁴⁾ ดังนั้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาแนวทางการควบคุมป้องกัน และลดอุบัติการณ์การเกิดโรคเบตาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง โดยสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการวางแผนป้องกันโรคเบตาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นในอนาคต

วัตถุประสงค์และวิธีการ

ตัวอย่างที่ศึกษา

ศึกษาโดยการรวบรวมข้อมูลย้อนหลังจากหญิงตั้งครรภ์และคู่สมรส ที่มาตรวจคัดกรองโรคธาลัสซีเมียในโรงพยาบาลขอนแก่น ซึ่งใช้ข้อมูลจากฐานข้อมูลเวชระเบียนผู้ป่วยนอก และทะเบียนตรวจโรคเบตาธาลัสซีเมีย ตั้งแต่ เดือนตุลาคม พ.ศ. 2559 ถึง เดือนกันยายน พ.ศ. 2561 จำนวน 6,151 คู่

วิธีการศึกษา

รวบรวมข้อมูลย้อนหลังจากงานเวชระเบียน ผู้ป่วยนอก และทะเบียนตรวจโรคเบตาธาลัสซีเมีย

โดยคู่ฝากครรภ์จะได้รับการตรวจคัดกรองเพื่อหาพาหะธาลัสซีเมีย ตามแนวทางการตรวจคัดกรอง (Fig. 1) ดังนี้

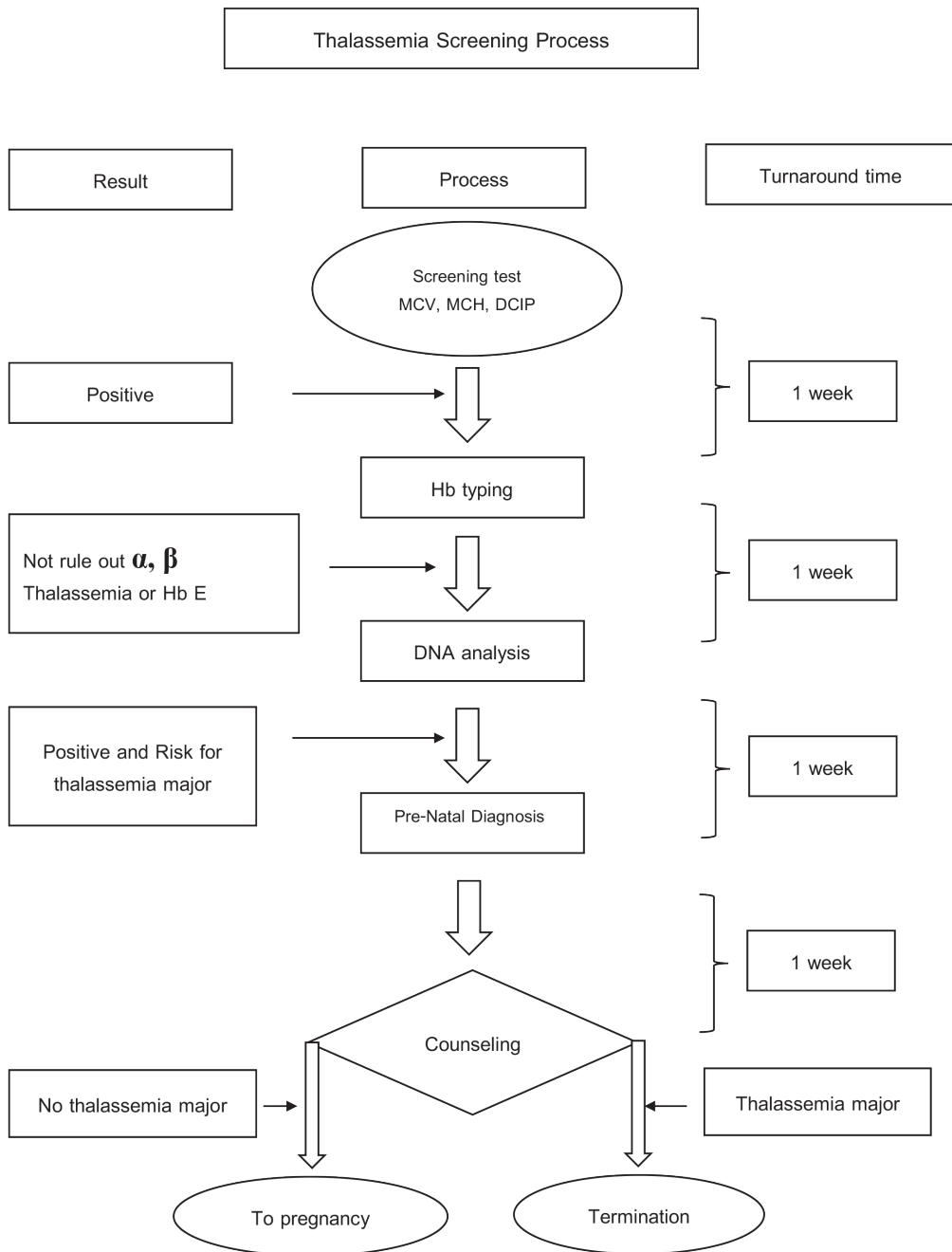


Fig. 1 Thalassemia Screening Process in Khon Kaen Hospital

1. การตรวจคัดกรองด้วยวิธี MCV, MCH และ DCIP

เจาะเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณแขน ปริมาตร 1-3 มิลลิลิตร ใส่หลอดเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งตัว ชนิด EDTA 1 หลอด ตรวจคัดกรองความสมบูรณ์ของเม็ดเลือดแดง (CBC) ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ รุ่น Sysmex XE-2100 ใช้หลักการ electrical resistance และ hydrodynamic focusing method ในการนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดง และ SLS-hemoglobin method ในการวัด hemoglobin เพื่อดู mean corpuscular volume (MCV) และ mean corpuscular hemoglobin (MCH) ตรวจคัดกรองพาหะ Hb E โดยใช้เทคนิค dichlorophenol indophenols precipitation test (DCIP)^(5,6) ด้วยชุดทดสอบ KKU-DCIP-Clear reagent kit หากได้ผลบวกอย่างใดอย่างหนึ่ง ทั้งคู่จะได้รับการตรวจยืนยันด้วยชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน

2. การตรวจยืนยันชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน (Hb typing) และการตรวจยืนยันระดับโมเลกุล

ตรวจยืนยันชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ VARIANT II Hemoglobin Testing System ใช้หลักการ high performance liquid chromatography โดยใช้สารควบคุมคุณภาพภายใน จากนั้นนำผลตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินของคู่ฝากครรภ์มาประเมินความเสี่ยงโอกาสการเกิดโรคเบตาธาลัสซีเมียรุนแรงของทารกในครรภ์เบื้องต้น ได้แก่ homozygous β^0 -thalassemia (β^0/β^0) และ β^0 -thalassemia/Hb E (β^0/β^E) หากพบว่า มีความเสี่ยง จะได้รับการตรวจยืนยันระดับโมเลกุล ซึ่งเป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมาใหม่เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนเบตาโกลบิน โดยใช้เทคนิค reverse dot blot hybridization (RDB) ด้วยชุดตรวจ GenoFlow β -thalassemia Genotyping Test kit (Southeast Asia

Panel, (SEA) 22 panels) ซึ่งเป็นชุดตรวจการกลายพันธุ์ของยีนเบตาโกลบิน จำนวน 22 ชนิดที่พบบ่อยในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ของบริษัท ไบโอแอนด์พี จำกัด และเป็นเทคนิคที่อาศัยการออกแบบและสังเคราะห์ allele specific oligonucleotide (ASO) probe (Fig. 2) โดยใช้หลอดเลือดหลอดเดิมไม่ต้องเจาะใหม่ (one tube service) ผลตรวจการกลายพันธุ์ของเบตาโกลบินจะถูกนำมาประเมินความเสี่ยงระดับโมเลกุลรายที่มีความเสี่ยงต่อการให้กำเนิดทารกเป็นโรคเบตาธาลัสซีเมียรุนแรง จะต้องได้รับการให้คำปรึกษาทางพันธุศาสตร์ และการวินิจฉัยทารกในครรภ์ ซึ่งรายที่จะต้องวินิจฉัยทารกในครรภ์ ควรมีอายุครรภ์ไม่เกิน 22 สัปดาห์

3. การตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ การให้คำปรึกษา และพิจารณายุติการตั้งครรภ์

ดำเนินการโดยเจ้าหน้าที่ที่มีความเชี่ยวชาญ และผ่านการอบรมการให้คำปรึกษาด้านพันธุศาสตร์ โดยเจ้าหน้าที่จะแจ้งถึงความเสี่ยงของการทำหัตถการทุกครั้ง แพทย์เฉพาะทางเวชศาสตร์ทารกและมารดา (maternal fetal medicine) จะเก็บชิ้นเนื้อรกในหญิงตั้งครรภ์ (CVS) อายุครรภ์ 11-14 สัปดาห์ น้ำคร่ำ (amniocentesis) ในหญิงตั้งครรภ์อายุครรภ์ 17 - 20 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างเลือดจากสายสะดือทารกในครรภ์ (cordocentesis) อายุครรภ์ 18-22 สัปดาห์⁽⁷⁾ อย่างใดอย่างหนึ่งขึ้นกับอายุครรภ์ จากนั้นนำส่งตรวจวินิจฉัยโรคเบตาธาลัสซีเมียทารกในครรภ์ โดยการตรวจระดับโมเลกุล ซึ่งจะต้องระบุการกลายพันธุ์ของยีนเบตาโกลบินของพ่อกับแม่ ลงในใบส่งตรวจและเจาะเลือดของแม่ส่งไปตรวจการปนเปื้อนเลือดแม่ด้วยทุกครั้ง เพื่อผลการตรวจที่ถูกต้องแม่นยำ โดยขั้นตอนการตรวจตั้งแต่การคัดกรอง การตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน การตรวจระดับโมเลกุลจากเลือด และการวินิจฉัยทารกในครรภ์ ทุกขั้นตอนใช้ระยะเวลา ขั้นตอนละ 1 สัปดาห์ รวมระยะเวลาการคัดกรองโรคธาลัสซีเมียในคู่ฝากครรภ์

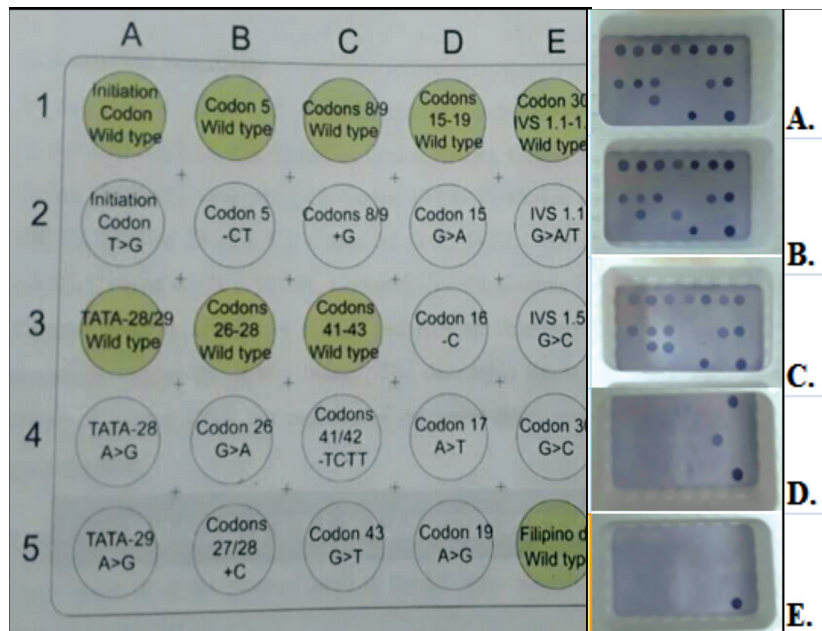


Fig. 2 β -thalassemia test kit (Southeast Asia Panel, (SEA) 22 panels) by Reverse Dot Blot hybridization technique (Green: “Positive Control” result; Blue: “Negative Control” result and White: types of beta globin mutations result.)

A: Positive for Codons 41/42-TCTT,

B: Positive for Compound heterozygous Hb E and Codon 17 A>T

C: Positive for Compound heterozygous Hb E and Codons 41/42-TCTT

D: Positive Control and E: Negative Control

ไม่เกิน 4 สัปดาห์ ซึ่งลดระยะเวลาจากเดิมที่ใช้เวลา 9-10 สัปดาห์ เพื่อเพิ่มโอกาสเข้าถึงการวินิจฉัยทารกในครรภ์ และลดอาการแทรกซ้อนจากการทำหัตถการ ถ้าอายุครรภ์เกิน 22 สัปดาห์

อย่างไรก็ตามศักยภาพทางห้องปฏิบัติการของ ศูนย์ธาลัสซีเมีย โรงพยาบาลขอนแก่น ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ผลของ $(\delta\beta)^0$ -thalassemia, rare abnormal Hb และส่งตรวจจากการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ ได้ จึงต้องส่งตัวอย่างเพื่อตรวจวิเคราะห์ที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการ

แพทย์ (ศวป.) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และ ห้องปฏิบัติการ บริษัท แอท-ยีนส์ จำกัด

ผลการวิจัย

การตรวจคัดกรองโรคธาลัสซีเมียในหญิงตั้งครรภ์และคู่สมรสของโรงพยาบาลขอนแก่น ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2559 ถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2561 มีผู้เข้ารับบริการ จำนวน 6,151 คู่ สามารถติดตามสามีมารับการตรวจคัดกรองโรคธาลัสซีเมียได้ ร้อยละ 98.2 โดยมีผลตรวจคัดกรองด้วยดัชนีเม็ดเลือดแดง MCV/

MCH และ/หรือ DCIP ผิดปกติอย่างใดอย่างหนึ่ง คือ ค่า MCV<80 fl, MCH<27 pg และ/หรือ DCIP ผลเป็นบวก 5,539 คู่ (ร้อยละ 90) ซึ่งจะได้รับการตรวจยืนยันด้วยชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน (Hb typing) ต่อ

จากผลการตรวจคัดกรองและยืนยันด้วยชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน พบว่า ผู้เข้ารับบริการมีผลตรวจผิดปกติ และถูกประเมินว่ามีความเสี่ยงต่อการมีโอกาสให้กำเนิดบุตรเป็นโรคเบตาธาลัสซีเมียรุนแรงเบื้องต้นจำนวน 235 คู่ (ร้อยละ 3.82) โดยทารกในครรภ์มีโอกาสเกิดโรคเบตาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงเป็น homozygous β^0 -thalassemia (β^0/β^0) จำนวน 2 คู่ และ β^0 -thalassemia/Hb E (β^0/β^E) จำนวน 233 คู่ จากนั้นคู่เสี่ยงทั้งหมด 235 คู่ มาตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของเบตาโกลบิน และประเมินความเสี่ยงต่อการให้กำเนิดบุตรเป็นโรคเบตาธาลัสซีเมียรุนแรง พบว่าหญิงตั้งครรภ์และคู่สมรสจำนวน 100 คู่ (ร้อยละ 1.63) ไม่เสี่ยงต่อการให้กำเนิดบุตรเป็นโรคเบตาธาลัสซีเมียที่มีอาการรุนแรง พบคู่เสี่ยงที่เสี่ยงให้กำเนิดบุตรเป็นโรคเบตาธาลัสซีเมียที่มีอาการปานกลาง 36 คู่ (ร้อยละ 0.59) โดยมีความเสี่ยงเป็น β^+ /Hb E thalassemia 34 คู่ และ ($\delta\beta$)⁰/Hb E —thalassemia 2 คู่ และพบคู่เสี่ยงที่เสี่ยงต่อการให้กำเนิดบุตรเป็นโรคเบตาธาลัสซีเมียที่มีอาการรุนแรง 92 คู่ (ร้อยละ 1.5) เป็นชนิด homozygous β^0 -thalassemia 1 คู่ β^0 /Hb E thalassemia 89 คู่ β^+ /Hb E thalassemia ชนิดการกลายพันธุ์ IVS 1.5 (G>C) ซึ่งทำให้เกิดโรคเบตาธาลัสซีเมียที่มีอาการรุนแรง 1 คู่ และ β^0/β^+ thalassemia 1 คู่ ไม่ทราบชนิดการกลายพันธุ์ 7 คู่

ดำเนินการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์แก่หญิงตั้งครรภ์ที่มีโอกาสให้กำเนิดบุตรเป็นโรคเบตาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง 92 ราย ผลการวินิจฉัยทารกในครรภ์พบว่าทารกในครรภ์ปกติ ไม่พบการกลายพันธุ์ของเบตาโกลบิน 26 ราย (ร้อยละ 0.42) เป็นพาหะฮีโมโกลบินอี

40 ราย (ร้อยละ 0.65) พาหะ β^0 -thalassemia 9 ราย (ร้อยละ 0.15) พาหะ β^+ -thalassemia 2 ราย (ร้อยละ 0.03) โฮโมไซกัสฮีโมโกลบินอี 1 ราย (ร้อยละ 0.02) โรคเบตาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง (homozygous β^0 -thalassemia) 1 ราย (ร้อยละ 0.02) และ β^0 /Hb E thalassemia 13 ราย (ร้อยละ 0.21)

จากผลการให้คำแนะนำและปรึกษาระดับพันธุศาสตร์แก่พ่อและแม่ที่มีทารกในครรภ์เป็นโรคเบตาธาลัสซีเมียที่มีอาการรุนแรง 14 ราย (ร้อยละ 0.23) มีหญิงตั้งครรภ์ตัดสินใจตั้งครรภ์ต่อ 1 ราย (ร้อยละ 0.02) และยุติการตั้งครรภ์ 13 ราย (ร้อยละ 0.21) (Table 1) หลังการยุติการตั้งครรภ์และหลังคลอดได้เก็บเลือดจากสายสะดือตรวจยืนยันโรคธาลัสซีเมีย พบว่าผลตรวจถูกต้องตรงกัน เป็นไปตามกฎการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมตามหลักของเมนเดล (Mendelian genetics)

การตรวจการกลายพันธุ์ของเบตาโกลบินและชนิดฮีโมโกลบินในคู่เสี่ยงทั้งหมด 235 คู่ ได้รับการตรวจยืนยันระดับโมเลกุล พบการกลายพันธุ์ของ β^0 -thalassemia 91 ราย ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์ชนิด CD41/42(-TTCT) สูงที่สุด 45 ราย รองลงมาเป็น CD17(A>T), IVS2.654(C>T), IVS1.1 (G>A/T), CD571/72(+A), IVS2.1(G>A) และ CD27/28(+C) จำนวน 21, 12, 6, 4, 2 และ 1 รายตามลำดับ มีชนิดฮีโมโกลบินเป็น A₂A 72 ราย EE/EF 4 ราย EF 13 ราย EFA 1 ราย และ EE/EFBart's 1 ราย พบการกลายพันธุ์ β^+ -thalassemia 35 ราย ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์ชนิด -28 (A>G) 32 ราย รองลงมาเป็นชนิด CD 19 (A>G) และ IVS1.5 (G>C) 2 และ 1 รายตามลำดับ มีชนิดฮีโมโกลบินเป็น A₂A 27 ราย EFA 7 ราย และ A₂FA 1 ราย นอกจากนี้ยังพบการกลายพันธุ์ ($\delta\beta$)⁰-thalassemia เป็นชนิด 12.6 kbdel 2 ราย โดยให้ผลเป็นลบต่อการตรวจด้วยเทคนิค reverse dot blot hybridization (RDB) ชุดตรวจ GenoFlow B-thalassemia Genotyping Test kit

Table 1 Outcome of the prenatal Beta-thalassemia control program in Khon Kaen Hospital

Test : Result	Total 6,151 (100%)	
CBC and/or DCIP : Positive	5,539 (90%)	
H b typing	235 (3.82%)	
: Risk for homozygous β -thalassemia		2 (0.03%)
: Risk for β /Hb E		233 (3.79%)
DNA analysis		
No risk for β -thalassemia major	100 (1.63%)	
Risk for β -thalassemia intermedia	36 (0.59%)	
: β^+ /Hb E thalassemia		34 (0.55%)
: $(\delta\beta)^0$ /Hb E -thalassemia		2 (0.03%)
Risk for β -thalassemia major	92 (1.5%)	
: β^0/β^0 thalassemia		1 (0.02%)
: β^0 /Hb E thalassemia		89 (1.45%)
: β^+ /Hb E thalassemia		1 (0.02%)
: β^0/β^+ thalassemia		1 (0.02%)
Prenatal Diagnosis	92 (1.5%)	
: Normal		26 (0.42%)
: Hb E carrier		40 (0.65%)
: β^0 -thalassemia carrier		9 (0.15%)
: β^+ -thalassemia carrier		2 (0.03%)
: Homozygous Hb E gene		1(0.02%)
: β^0/β^0 -thalassemia		1(0.02%)
: β^0 /Hb E thalassemia		13 (0.21%)
Continue pregnancy	1(0.02%)	
Termination	13 (0.21%)	

(Southeast Asia Panel, (SEA) 22 panels) ซึ่งมีผลชนิดฮีโมโกลบินเป็น A_2 FA และ EF พบชนิดละ 1 ราย ซึ่งไม่ใช่ชนิดฮีโมโกลบินในคนปกติ จึงได้ส่งตรวจการกลายพันธุ์ยังหน่วยงานที่มีศักยภาพสูงกว่า พบเพียงฮีโมโกลบินอีอื่น ไม่พบการกลายพันธุ์ของเบตาโกลบินอื่น 42 ราย มีผลชนิดฮีโมโกลบินเป็น EFA 1 ราย EF 2 ราย EE/EF 35 ราย EE/EF Bart's 2 ราย และ EA with High Hb F 2 ราย ไม่พบการกลายพันธุ์ของเบตาโกลบินอื่นเลย 58 ราย มีผลชนิดฮีโมโกลบินเป็น A_2 A 53 ราย A_2 FA 3 ราย และ rare abnormal Hb 2 ราย ไม่ทราบการกลายพันธุ์ 7 ราย มีผลชนิดฮีโมโกลบินเป็น EF 5 ราย และ EFA 2 ราย (Table 2)

จากผลการตรวจเบตาธาลัสซีเมียระดับโมเลกุล นำมาประเมินความเสี่ยงโอกาสการเกิดโรคเบตาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงและให้คำแนะนำปรึกษาในการตั้งครรภ์ ดังนี้

- หญิงตั้งครรภ์ 58 ราย มีผลตรวจไม่พบการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคเบตาธาลัสซีเมียรุนแรง ได้รับการแนะนำให้ตั้งครรภ์ต่อไป

- หญิงตั้งครรภ์ 36 ราย มีผลตรวจระดับโมเลกุลเป็น β^+ -thalassemia 34 ราย และเป็น $\delta\beta^0$ -thalassemia 2 ราย แนะนำให้ตั้งครรภ์ต่อไป พร้อมทั้งให้ข้อมูลว่ามีโอกาสให้กำเนิดบุตรเป็น β^+ -thalassemia / Hb E หรือ thalassemia intermedia ซึ่งมีอาการเกิดโรคเบตาธาลัสซีเมียปานกลาง 25 %

- หญิงตั้งครรภ์ 42 ราย มีผลตรวจชนิด EE/EF 35 ราย EF 2 ราย EE/EF Bart's 2 EA with High Hb F 2 ราย และ EFA 1 ราย และตรวจระดับโมเลกุลพบเพียงฮีโมโกลบินอีอื่น จากผลการตรวจดังกล่าว จึงแนะนำให้ติดตามประวัติการตรวจวินิจฉัยความผิดปกติของเบตาธาลัสซีเมียครอบครัว (further investigate for identify β -gene mutation (paternal or maternal) and taking family pedigree history) ไม่พบประวัติการรักษาให้ตั้งครรภ์ต่อไป

- ในรายที่มีผลตรวจเป็น β^0 -thalassemia 91 ราย และ β^+ -thalassemia 1 ราย ชนิด IVS 1.5 (G>C) มีโอกาสให้กำเนิดบุตรเป็นโรคธาลัสซีเมียรุนแรงชนิด β^0/β^E และชนิด β^+/β^E จึงแนะนำให้รับการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ต่อไป และจากการแนะนำให้หญิงตั้งครรภ์ 7 ราย เข้ารับการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนเบตาโกลบินที่พบการระบาดได้น้อยในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เนื่องจากตรวจไม่พบการกลายพันธุ์ของยีนเบตาโกลบินในชุดตรวจ 22 มิวเตชัน เป็นชนิด EF 5 ราย และ EFA 2 ราย โดยตรวจการกลายพันธุ์ของยีนเบตาโกลบินพบเพียงฮีโมโกลบินอี แต่ผลการคัดกรองเบื้องต้นผิดปกติ อย่างไรก็ตามเนื่องจากผลการตรวจการกลายพันธุ์เพิ่มเติม จะต้องมีค่าใช้จ่ายเพิ่มเติม จึงไม่ได้ส่งตรวจวิเคราะห์ต่อไป และแพทย์ได้ติดตามประวัติการตรวจวินิจฉัยความผิดปกติของเบตาธาลัสซีเมียครอบครัว (further investigate for identify β -gene mutation (paternal or maternal) and taking family pedigree history) และประวัติการรักษา ซึ่งไม่พบประวัติการรักษาด้วยการรับเลือด จึงให้ตั้งครรภ์ต่อไป

หญิงตั้งครรภ์ที่มีโอกาสให้กำเนิดบุตรเป็นโรคเบตาธาลัสซีเมียอาการรุนแรงทั้งหมดได้รับการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ 92 ราย พบว่าทารกในครรภ์เป็น homozygous β^0 -thalassemia (β^0/β^0) 1 ราย เป็นชนิด compound homozygous CDs41/42 (-TTCT) และเป็น β^0 -thalassemia/Hb E (β^0/β^E) 13 ราย โดยเป็นชนิด Hb E ร่วมกับ CDs41/42 (-TTCT) 8 ราย, CDs71/72 (+A) 2 ราย, IVS1.1 (G>A/T) 1 ราย, CD27 (+C) 1 ราย และ CD17 (A>T) 1 ราย จากการให้คำปรึกษาด้านพันธุศาสตร์ พบว่าหญิงตั้งครรภ์ 13 ราย ตัดสินใจยุติการตั้งครรภ์ ส่วน 1 ราย ที่มีผลตรวจ β^0 -thalassemia/Hb E (β^0/β^E) ชนิด CD27 (+C) คู่สมรสต้องการตั้งครรภ์ต่อไป และมีความประสงค์จะเข้ารับการรักษาด้วยการปลูกถ่ายไขกระดูกต่อไป

Table 2 The results of DNA and Hb typing analysis in 235 risk couples for major β -thalassemia

Genotype	Mutation	Hb typing (Number)	Number	Percent
β^0 -thalassemia	CDs 41/42 (-TTCT)	A ₂ A (37)	45	19.15
		EE/EF (1)		
		EF (7)	21	8.94
	CD 17 (A>T)	A ₂ A (17)		
		EF (2)		
		EFA (1)		
	IVS 2.654 (C>T)	EE/EFBart's (1)	12	5.11
		A ₂ A (6)		
		EE/EF (3)		
	IVS 1.1 (G>A/T)	EF (3)	6	2.55
CDs 71/72 (+A)		A ₂ A (6)	4	1.7
		A ₂ A (3)		
	IVS 2.1 (G>A)	EF (1)	2	0.85
CDs 27/28 (+C)		A ₂ A (2)	1	0.43
		A ₂ A (1)		
β^+ -thalassemia	-28 (A>G)	A ₂ A (25)	32	13.62
		EFA (6)		
		A ₂ FA (1)		
	CD 19 (A>G)	A ₂ A (1)	2	0.85
		EFA (1)		
IVS 1.5 (G>C)	A ₂ A (1)	1	0.43	
$(\delta\beta)^0$ -thalassemia	12.6 kb del	A ₂ FA (1) EF (1)	2	0.85
β^E -thalassemia	CD 26 (G>A)	EE/EF (35) EF (2) EE/EFBart's (2) EA with High Hb F (2) EFA (1)	42	17.87
Normal		A ₂ A(53) A ₂ FA (3) Rare Abnormal Hb (2)	58	24.68
Unknown mutation		EF(5) EFA(2)	7	2.98

Table 3 The prenatal diagnosis results in 14 subjects that are affected for severe thalassemia syndromes

Severe thalassemia syndrome	Mutation	Number	Percent
Homozygous β^0 -thalassemia β^0 -thalassemia/HbE	CDs 41/42 (-TTCT)	1	7.14
		13	92.86
	CDs 41/42 (-TCTT)/HbE	8	57.14
	CDs 71/72 (+A)/HbE	2	14.29
	IVS 1.1 (G>T)/HbE	1	7.14
	CD 27 (+C)/HbE	1	7.14
	CD 17 (A>T)/HbE	1	7.14

วิจารณ์

การตรวจคัดกรองพาหะของโรค และการให้คำปรึกษาด้านพันธุศาสตร์ รวมถึงการวินิจฉัยทารกในครรภ์เป็นหลักการสำคัญของการป้องกันโรคธาลัสซีเมีย⁽⁸⁾ จากการดำเนินงานของศูนย์ธาลัสซีเมีย โรงพยาบาลขอนแก่น เพื่อควบคุมและป้องกันโรคเบตาธาลัสซีเมียรุนแรง ได้พัฒนาการตรวจการกลายพันธุ์ของยีนเบตา-ไกลบิน มุ่งเน้นให้มีกระบวนการตรวจคัดกรองและการตรวจวิเคราะห์ที่รวดเร็ว (one stop service) ตั้งแต่กระบวนการตรวจคัดกรองจนถึงกระบวนการตรวจยืนยันระดับโมเลกุล แต่ละขั้นตอนใช้เวลา 1 สัปดาห์ รวมระยะการตรวจคัดกรองโรคเบตาธาลัสซีเมียในคู่ฝากครรภ์ ไม่เกิน 4 สัปดาห์ ใช้เวลาน้อยกว่าระบบเดิม 5-6 สัปดาห์ ซึ่งช่วยลดระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์ได้ดี มีการนำเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ที่ทันสมัยมาประยุกต์ใช้ ร่วมกับการทำงานอย่างบูรณาการของเจ้าหน้าที่ทั้งภายในและภายนอกโรงพยาบาล ส่งผลให้การดำเนินการตรวจวิเคราะห์มีประสิทธิภาพ นอกจากการตรวจวิเคราะห์ที่มีความสะดวก และรวดเร็วแล้ว การพัฒนาเทคนิค และเลือกใช้เครื่องมือสำหรับตรวจวิเคราะห์ที่มีความหลากหลาย เป็นมาตรฐานสากล เช่น การตรวจ

วิเคราะห์ด้วยเทคนิค DNA sequencing, RFLP, HPFH เป็นต้น จะช่วยให้ผลการตรวจวิเคราะห์ ถูกต้องแม่นยำ และมีความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น ซึ่งเป็นโอกาสในการพัฒนาต่อไปในรายที่มีการกลายพันธุ์ที่พบได้น้อย

อย่างไรก็ตาม การดำเนินโครงการเพื่อการป้องกันและควบคุมโรคเบตาธาลัสซีเมียรุนแรง มักพบปัญหาและอุปสรรคที่สำคัญ ได้แก่ หนึ่งตั้งครรภ์ที่มีบุตรในครรภ์เสี่ยงต่อโรคเบตาธาลัสซีเมียรุนแรงไม่ได้รับการวินิจฉัยทารกในครรภ์ รวมถึงพบปัญหาในการติดตามสามีมาตรวจเลือด⁽⁹⁾ จากการให้บริการของศูนย์ธาลัสซีเมียในเขตพื้นที่ภาคอีสานพบว่า ยังมีคู่ฝากครรภ์บางส่วนเข้าไม่ถึงบริการ จึงควรจัดให้มีศูนย์บริการตรวจโรคเบตาธาลัสซีเมียรุนแรงอย่างครบถ้วนทั่วถึง รวมทั้งควรมีรูปแบบการติดตามให้สามีมาตรวจเลือดเนื่องจากในบางกรณีที่ภรรยาไม่ผลการตรวจคัดกรองผิดปกติ ยังไม่สามารถติดตามสามีมาตรวจเลือดได้ครบทั้งหมด ทำให้มีความเสี่ยงที่จะมีผู้ป่วยโรคเบตาธาลัสซีเมียรายใหม่เกิดขึ้น⁽¹⁰⁾ การกำหนดให้มีการเจาะเลือดสามีตั้งแต่ครั้งแรกที่พาภรรยามาฝากครรภ์ อาจเป็นแนวทางหนึ่งในการแก้ไขปัญหาดังกล่าวได้ดี จากการศึกษาของจำรัส วงศ์คำ และคณะ⁽¹¹⁾ พบว่าการจัดบริการ

ตรวจคัดกรองธาลัสซีเมียทั้งสามีและกรรยาอย่างเป็นระบบ เบ็ดเสร็จครั้งเดียว ร่วมกับการผสานเข้ากับโครงการสายใยรักแห่งครอบครัว ซึ่งมีการให้คำแนะนำสู่ศึกษาในรูปแบบโรงเรียนพ่อแม่ ช่วยให้สามารถติดตามตรวจเลือดสามีเพื่อตรวจหาความเสี่ยงได้เพิ่มขึ้น

สำหรับการให้คำปรึกษาด้านพันธุศาสตร์ในกรณีที่มีผลการตรวจพบว่ามีความเสี่ยงที่จะให้กำเนิดทารกที่มีโรคเบตาธาลัสซีเมียรุนแรงนั้น ดำเนินการโดยเจ้าหน้าที่ซึ่งผ่านการอบรมเกี่ยวกับการให้คำปรึกษาด้านพันธุศาสตร์ ในขั้นตอนการให้คำปรึกษานี้ มีความสำคัญมากที่จะให้ความรู้เกี่ยวกับโรค อัตราเสี่ยงของบุตร รวมถึงการสนับสนุนทางจิตใจ ซึ่งทั้งหมดจะมีส่วนช่วยในการตัดสินใจรักษาทารกในครรภ์ หรือพิจารณายุติการตั้งครรภ์ได้อย่างทันท่วงที ช่วยป้องกันและลดจำนวนผู้ป่วยโรคเบตาธาลัสซีเมียรายใหม่ได้

สรุป

รูปแบบการดำเนินงานเพื่อควบคุมและป้องกันโรคเบตาธาลัสซีเมียรุนแรงรายใหม่ที่พัฒนาขึ้น มีการนำองค์ความรู้และเทคโนโลยีด้านธาลัสซีเมียที่มีความก้าวหน้ามาใช้ประโยชน์ (one tube service - one stop service) ช่วยลดระยะเวลาในการส่งตรวจ โดยมุ่งเน้นให้มีการทำงานร่วมกันอย่างบูรณาการของสหสาขาวิชาชีพ สามารถควบคุม และลดการเกิดใหม่ของโรคเบตาธาลัสซีเมียรุนแรงได้ดี สามารถใช้เป็นแนวทางสำหรับการวางแผนป้องกันโรคเบตาธาลัสซีเมียรุนแรงให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์ธาลัสซีเมีย กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ กลุ่มงานสูติ-นรีเวช แผนกฝากครรภ์ ห้องคลอด และกลุ่มงานกุมารเวชกรรม โรงพยาบาลขอนแก่น รวมถึงเจ้าหน้าที่

โรงพยาบาลขอนแก่นผู้เกี่ยวข้องทุกท่านที่ให้ความร่วมมือ และอำนวยความสะดวกในการสืบค้นข้อมูลสำหรับการวิจัยครั้งนี้เป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

1. The committee on clinical practice guidelines for diagnosis of thalassemia syndromes. Clinical practice guidelines for diagnosis and management of thalassemia syndromes. Bangkok: Queen Sirikit National Institute of Health; 2014. (in Thai)
2. Saengkitphon S., Saengkitphon Si. Thalassemia: guidelines for prevention. 7th ed. Nonthaburi: Clinical research center, Department of medical sciences; 2015. (in Thai)
3. Thianthawon V., Phattarakulvaninch S., Phattanapongtorn J. The role of Department of Health on thalassemia prevention. Proceeding of the 13th Thailand thalassemia conference. Bangkok; 2007. (in Thai)
4. Pattanapongthorn J. Genetic counselling in thalassemia disease. Proceeding of the 19th Thailand thalassemia conference. Bangkok; 2013. (in Thai)
5. Chuntho M. Carrier screening for thalassemia in pregnant women by using the complete blood count and hemoglobin electrophoresis methods. KKMJ. 2008; Vol. 32 Supp 16: 165-72. (in Thai)

6. Yooyen K., Fucharoen G., Fucharoen S., Yamsri S., Sae-ung N. Appropriate MCV and MCH cut off values for screening of a-thalassemia 1 and beta-thalassemia: Data from 4 community hospitals in northeast Thailand. J Med Tech Phy Ther 2011; 23: 147-9
7. Suntharasaj T. Clinical practice guideline by The Royal Thai College of Obstetricians and Gynaecologists 2007-2012. 1st ed. Bangkok: The Royal Thai College of Obstetricians and Gynaecologists; 2012. (in Thai)
8. Ratanasiri T. Prevention and control of thalassemia in obstetric practice. Srinagarind Med J 2007; 22: 471-6. (in Thai)
9. Sirivatanapa P., Wanapirak C. The problems in prenatal control of severe thalassemia at Chiang Mai. Chiang Mai: Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University; 2005; 4-7. (in Thai)
10. Phaphong J. An assessment of couples at risk of having a child with severe thalassemia at Kumphawapi Hospital, Udon Thani province. J Med Tech Assoc Thailand 2015; 43: 5347-58. (in Thai)
11. Wongkham J., Ratanasiri T., Komwilaisak R., Saksiriwuttho P., Paibool M., Chatvised P. Thalassemia screening in pregnant women at Antenatal Care Clinic, Srinagarind Hospital. Srinagarind Med J 2013; 28: 170-7. (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 และพิมพ์เลขหน้าที่ต้องกลางขอบล่างของทุกหน้า 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) ให้เรียงลำดับเลขตามที่ปรากฏก่อนหลังในเนื้อเรื่อง

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 messangers 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

- ☐ ใส่หมายเลขเรียงลำดับที่อ้างอิงถึง
- ☐ 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, pierceable 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 :

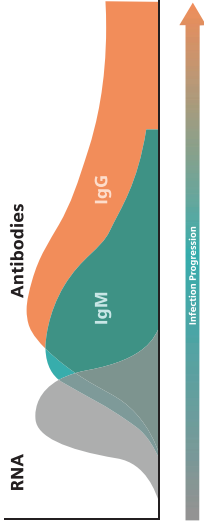
Bangkok Inter Products Co., Ltd.
91/247-251 Suwinthawong Road, Minburi, Bangkok 10510
Tel: 662 543-7430 Fax: 662 543-7900
Email: info@b-i-p.co.th Website: www.b-i-p.co.th

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?

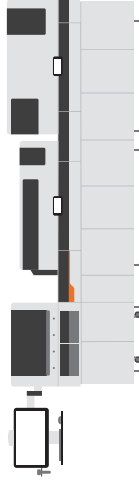
A highly sensitive test should capture nearly all true positive results. A highly specific test should avoid nearly all false positive results.

100%
sensitivity²

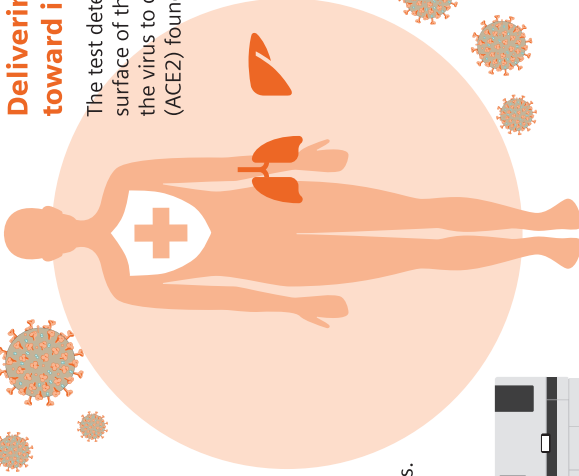
99.8%
specificity³

Rapid

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

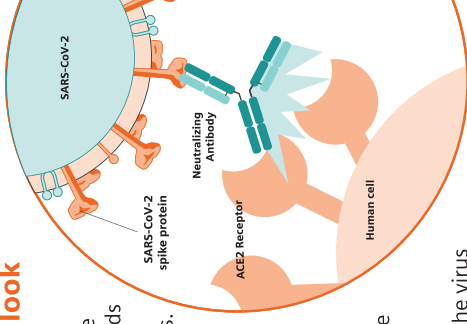


Total antibody blood tests, which run on laboratory analyzers, detect antibodies to SARS-CoV-2 (including IgG and IgM), that are used to identify those with an immune response that indicates recent infection or prior exposure.



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

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

50M/month

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(b)(1), unless the authorization is terminated or revoked sooner. Product availability may vary by country and is subject to regulatory requirements.

2. Based on results for the ADVIA Centaur COVID21 assay.

3. Based on results for the ADVIA Centaur XP, ADVIA Centaur XPT, ADVIA Centaur GP, ADVIA Centaur Vista and Dimension EXL analyzers.

4. Data as of 12/1/2020. Data subject to change.

5. Data as of 12/1/2020.