



Journal of the Medical Technologist Association of Thailand

วารสารเทคนิคการแพทย์

Vol. 51 No. 3 December 2023

ปีที่ 51 ฉบับที่ 3 ธันวาคม 2566

CONTENT

Review Article

- The Application of Mitochondrial DNA Variation Testing in Human 8661
Prapatsorn Areesirisuk and Budsaba Rerkamnuaychoke

- A Study of Consistencies between HbA1c and the Incidence of Eye and Kidney Complication in Diabetic Patients from Promkiri Hospital Nakhon Si Thammarat Province 8726
Jeerasak Yartrak Duangnate Pipatsatitpong and Kanyanath Piumngam

Original Articles

- Phenomenological Approach on Experiences of Medical Technology Teachers in Small Private Online Course (SPOC)-based Flipped Classroom 8677
Patcharin Panjaburee Kaittiyos Kuldejchaichan and Somying Loharungsikul

- Incidence of Dengue Virus Infection and Dengue Serotypes Changed in Ratchaburi Province During 2012-2020 8743
Arisara Posanacharoen Sumalee Chanama Pattara Wongjaroen, et al.

- Development and Psychometric Validation of the Knowledge and Attitudes Questionnaire toward Long COVID (KA-long COVID) 8698
Pawared Ontong Orawan Boonmakerd and Sutinun Juntorn

- Extraction and Evaluation of Antifungal Compounds against Mucormycosis and Aspergillosis from Thai Herbal GPO Products Used for COVID-19 Patients 8756
Yordhathai Thongsri Narathit Chanraeng Peeranut Poorungreang, et al.

- Incidence of Carbapenemase Production in *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Patients of Bamrasnaradura Infectious Diseases Institute 8713
Kannikar Khummasorn Worada Samosornsuk Chollanant Khattiyaweche and Seksun Samosornsuk

- Simple Sample Preparation with SDS for Direct Identification from Positive Blood Culture Using MALDI-TOF MS. 8772
Nuttiya Srisurat and Krittika Kamlangharn



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



TOPAIR
CLEAN AIR SOLUTIONS



ecoline
BIO SAFETY CABINET
CLASS II A2

TopAir's Ecoline Biosafety Cabinet protects lab staff, the environment and sensitive work processes in which



M-UNIVERSAL



M-DIAGNOSTIC



M-SCIENCE

MPW[®]
MED. INSTRUMENTS

Laboratory
Centrifuge

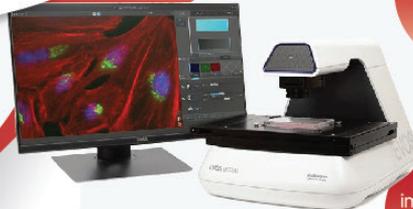
High performance automation and robotic solutions



Attune CytPix
Flow Cytometer

invitrogen

Authorized Distributor



EVOS M7000
Imaging Systems

Easy-to-use interface, designed by biologists

Live-cell analysis capability

Powerful image analysis software options

ZINEXTS
Zinexts Life Science Corp.

MagPurix[®] 12 EVO

Compact and sleek instrumentation that is ideal for clinical diagnosis, used to purify 1 to 12 samples simultaneously per run





วารสาร เทคนิคการแพทย์

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย
ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

ปีที่ 51 ฉบับที่ 3 ธันวาคม 2566

วารสารเทคนิคการแพทย์ ขอเรียนเชิญผู้แต่งส่งบทความมาตีพิมพ์ในวารสารเทคนิคการแพทย์ ซึ่งสามารถส่งบทความได้ทั้งรูปแบบภาษาไทยและภาษาอังกฤษ โดยลงทะเบียนเพื่อส่งบทความเข้าสู่ระบบออนไลน์ Thai Journals online (ThaiJo 2) ที่ <https://www.tci-thaijo.org/index.php/jmt-amtt/index> และเลือก “สำหรับผู้แต่ง” เพื่อศึกษาการเตรียมต้นฉบับบทความประเภทต่าง ๆ ของวารสารฯ ก่อนเลือก “ส่งบทความ” เข้าสู่ระบบออนไลน์ และขอเชิญชวนผู้แต่งส่งบทความปริทัศน์ (Review article) พร้อมคำถามแบบปรนัย จำนวน 5-10 ข้อ ซึ่งบทความที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารเทคนิคการแพทย์ จะถูกนำไปใช้ในการเก็บคะแนน CMTE สำหรับนักเทคนิคการแพทย์ต่อไป

สำหรับบทความในวารสารฉบับนี้ ประกอบด้วย บทความปริทัศน์ จำนวน 1 เรื่อง คือเรื่อง “การประยุกต์การทดสอบไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในมนุษย์” บทความนิพนธ์ต้นฉบับ (Original article) จำนวน 7 เรื่อง โดยเนื้อหาของบทความ จัดตามกลุ่มวิชาดังนี้ 1) บทความทางด้านกัญญาวิทยาและไวรัสวิทยา จำนวน 3 เรื่อง 2) บทความทางด้านจุลชีววิทยา จำนวน 2 เรื่อง 3) บทความทางด้านการวิจัยการศึกษา จำนวน 1 เรื่อง และ 4) บทความทางด้านเคมีคลินิก จำนวน 1 เรื่อง

วารสารเทคนิคการแพทย์จะเผยแพร่เป็นรูปแบบออนไลน์ทั้งหมด ตั้งแต่ฉบับปี 52 ฉบับที่ 1 เดือนเมษายน 2567 เป็นต้นไป

สมชาย วิริยะยุทธกร
บรรณาธิการวารสารเทคนิคการแพทย์



วารสาร เทคนิคการแพทย์

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

ปีที่ 51 ฉบับที่ 3 ธันวาคม 2566

สารบัญ

บทความปริทัศน์

- การประยุกต์การทดสอบไมโทคอนเดรียล ดีเอ็นเอในมนุษย์ 8661
ประภัสสร อารีศิริสุข และ
บุษบา ฤกษ์อำนาจโชค

นิพนธ์ต้นฉบับ

- ปรากฏการณ์วิทยาต่อประสบการณ์ของ อาจารย์เทคนิคการแพทย์ในห้องเรียน กลับด้านโดยใช้บทเรียนออนไลน์แบบ Small Private Online Course (SPOC) พัชรินทร์ ปัญจนური
เกียรติยศ กุลเดชชัยชาญ และ
สมหญิง โลหะรังสิกุล 8677
- การพัฒนาและตรวจสอบคุณภาพเชิงจิตวิทยา ของแบบสอบถามความรู้และทัศนคติที่มีต่อ ภาวะลองโควิด ปวีเรศ อ่อนทอง
อรวรรณ บุญมาเกิด และ
สุธินันท์ จันทร 8698
- อุบัติการณ์ของการสร้างเอนไซม์คาร์บาपीนีเมส ใน *Pseudomonas aeruginosa* ที่แยกได้จาก ผู้ป่วยของสถาบันบำราศนราดูร
กรรณิการ์ คำมะสอน
วรดา สโมสรรสุข
ชลนันทน์ ชัตติยเวช และ
เสกสรรค์ สโมสรรสุข 8713

- การศึกษาความสอดคล้องระหว่างค่า HbA1c กับอัตราการเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตาและไต ในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2
โรงพยาบาลพรหมคีรี จังหวัดนครศรีธรรมราช
จิรศักดิ์ ญาตรีภย์
ดวงเนตร พิพัฒน์สถิตพงศ์ และ
กัญญาณัฐ เปี่ยมงาม 8726
- อุบัติการณ์การติดเชื้อและซีโรทัยป์ไวรัสแดงกึ่ง ในจังหวัดราชบุรี ระหว่างปี พ.ศ. 2555-2563
อริสรา โปษณเจริญ
สุมาลี ชนะมา
ภัทร วงษ์เจริญ และคณะ 8743
- การสกัดและทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรค มีวอร์โมโคสิสและโรคแอสเปอร์จิลโลสิสจาก ผลิตภัณฑ์สมุนไพรฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชัน ที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยโควิด 19
ยอดหทัย ทองศรี
นราทิพย์ จันแรง
พีรณัฐ ผู้รุ่งเรือง และคณะ 8756
- การเตรียมตัวอย่างแบบง่ายด้วย SDS เพื่อ วิจัยเชื้อโดยตรงจากตัวอย่างเลือดด้วย MALDI-TOF MS
นัตถุญา ศรีสุราษ และ
กฤติกา กำลังหาญ 8772



วารสาร เทคนิคการแพทย์

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย
ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

Vol. 51 No. 3 December 2023

CONTENTS

Review Article

- The Application of Mitochondrial DNA Variation Testing in Human 8661
*Prapatsorn Areesirisuk and
Budsaba Rerkamnuaychoke*

Original Articles

- Phenomenological Approach on Experiences of Medical Technology Teachers in Small Private Online Course (SPOC)-based Flipped Classroom 8677
*Patcharin Panjaburee
Kaittiyos Kuldejchaichan and
Somying Loharungsikul*
- Development and Psychometric Validation of the Knowledge and Attitudes Questionnaire toward Long COVID (KA-long COVID) 8698
*Pawared Ontong
Orawan Boonmakerd and
Sutinun Juntorn*
- Incidence of Carbapenemase Production in *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Patients of Bamrasradura Infectious Diseases Institute 8713
*Kannikar Khummasorn
Worada Samosornsuk
Chollanant Khattiyawech and
Seksun Samosornsuk*

- A Study of Consistencies between HbA1c and the Incidence of Eye and Kidney Complication in Diabetic Patients from Promkiri Hospital Nakhon Si Thammarat Province 8726
*Jeerasak Yartrak
Duangnate Pipatsatitpong and
Kanyanath Piumngam*
- Incidence of Dengue Virus Infection and Dengue Serotypes Changed in Ratchaburi Province During 2012-2020 8743
*Arisara Posanacharoen
Sumalee Chanama
Pattara Wongjaroen, et al.*
- Extraction and Evaluation of Antifungal Compounds against Mucormycosis and Aspergillosis from Thai Herbal GPO Products Used for COVID-19 Patients 8756
*Yordhathai Thongsri
Narathit Chanraeng
Peeranut Poorungreang, et al.*
- Simple Sample Preparation with SDS for Direct Identification from Positive Blood Culture Using MALDI-TOF MS. 8772
*Nuttiya Srisurat and
Krittika Kamlangharn*



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

เจ้าของ

สมาคมเทคนิคการแพทย์
แห่งประเทศไทย ในพระอุปถัมภ์
พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี
พระวรราชทานิถิตตามาตุ

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

กำหนดการออก

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

พิมพ์ที่

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

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.

Owner

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

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

Publication

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

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	सानติยานนท์	ศ. ดร.วันเพ็ญ	ชัยคำภา
ศ. ดร.วิฑูรย์	ไวยนันท์	ศ. นพ.ยง	ภู่วรรณ
ศ. ดร.ประมวญ	เทพชัยศรี	นายสมชัย	เจ็ดเสริมอนันต์
ดร. สลักจิต	ชุตินงษ์วิเวท	รศ. ดร.พิทักษ์	สันตนิรันดร์
ศ. ดร.วีระพงศ์	ปรัชญาลิทธิกุล		

อดีตรรณาธิการ

ศ. ดร.พรทิพย์	โล่ห์เลขา	รศ. กุลนารี	สิริสาลี
รศ. ดร.ปราณี	ลิ้นนะชัย	น.ส. ทศนีย์	สกุลดำรงค์พานิช
รศ. ดร.กำพล	รุจิวิเศษณ์		

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	ภู่ทอง	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

คณะบรรณาธิการ

ศ. ดร.ศรีสินี คุณสมิทธิ	มหาวิทยาลัยมหิดล
ศ. ดร.วัชระ กสิณฤกษ์	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ศ. ดร.เพทาย เย็นจิตโสมนัส	มหาวิทยาลัยมหิดล
ศ. ดร.สมพนธ์ วรรณวิมลรักษ์	มหาวิทยาลัยมหิดล
ศ. ดร.ฉัตรเฉลิม อิศรางกูร ณ อยุธยา	มหาวิทยาลัยมหิดล

คณะกรรมการ

ศ. พลตรีหญิง ดร.อ้อยทิพย์ ณ ถลาง	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศ. ดร.วันชัย มาลีวงษ์	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ศ. ดร.สาคร พรประเสริฐ	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ศ. ดร.สุพรรณ ฟุ่เจริญ	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ศ. ดร.ภาวพันธ์ ภัทรโกศล	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ศ. ดร.สุดา ดุษิวิโรจนกุล	มหาวิทยาลัยมหิดล
Assoc. Prof. Chuan-Liang Kao	National Taiwan University
รศ. พรรณี พิเศษ	มหาวิทยาลัยมหิดล
รศ. พญ.จิราพร สิริธิดาวร	มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
รศ. ดร.จินตนา จิรดาวร	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รศ. อิสยา จันทรวีทยานุชิต	มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
รศ. ดร.กาญจนา สุริยะพรหม	มหาวิทยาลัยรังสิต
รศ. ดร.เกรียงไกร กิจเจริญ	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รศ. ดร.ศิริพร ปรุณวิทยา	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รศ. ดร.ปาลณี อัมรานนท์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ผศ. พิศิษฐ์ นามจันทรา	มหาวิทยาลัยรังสิต
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.ไข่มุกด์ ช่างศรี	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
อ. ทศนีย์ สกุดดำรงพานิช	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
อ. ดร.พิริยาภรณ์ จงตระกูล	มหาวิทยาลัยมหิดล

ผู้จัดการ

นางสาวรณพร คำพามา



วารสาร เทคนิคการแพทย์

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

JOURNAL OF THE MEDICAL TECHNOLOGIST ASSOCIATION OF THAILAND

Advisors

Assoc. Prof. Dr. Rachana Santiyantong
Prof. Dr. Vithoon Viyanant
Prof. Dr. Pramuan Tapchaisri
Dr. Salakchit Chutipongvivat
Prof. Dr. Virapong Prachayasittikul

Prof. Dr. Wanpen Chaicumpa
Prof. Dr. Yong Poovorawan
Mr. Somchai Jeadsermanant
Assoc. Prof. Dr. Pitak Santanirand

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

Thammasat University
Thammasat University
Kasetsart University
Thammasat University
Thammasat University

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
Prof. Maj Gen Dr. Oytip Na Thalang

Mahidol University
Chiang Mai University
Mahidol University
Mahidol University
Mahidol University
Thammasat University

Editorial Board

Prof. Dr. Wanchai Maleewong	Khon Kaen University
Prof. Dr. Sakorn Pornprasert	Chiang Mai University
Prof. Dr. Supan Fucharoen	Khon Kaen University
Prof. Dr. Parvapan Bhattarakosol	Chulalongkorn University
Prof. Dr. Suda Louisirirothanakul	Mahidol 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. Chintana Chirathaworn	Chulalongkorn 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
Assoc. Prof. Dr. Palanee Ammaranond	Chulalongkorn University
Asst. Prof. Pisit Namjuntra	Rangsit 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. Piriyaoporn Chongtrakool	Mahidol University

Manager

Miss Ranaporn Kampama

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. 2564-2567

EXECUTIVE BOARD OF AMTT 2021-2024

ที่ปรึกษา	ทพ.นิเวศน์ ประยูรเชียร	Nivest Prayoonthein	Consultants
ที่ปรึกษา	ทพ.บัณฑิต คูวิจิตรสุวรรณ	Bundit Khuvichitsuwan	Consultants
นายกสมาคมฯ	รศ.ดร.ทพ.พิทักษ์ สันตนิรันดร์	Assoc. Prof. Dr. Pitak Santanirand	President
อุปนายกฯ 1 และการเงินบัญชี	ทพญ.อุมาพร ทรัพย์เจริญ	Umaporn Subcharoen	Vice-president and Finance and Accounting
อุปนายกฯ 2	ทพญ.นิตยา โคมงาม	Nitaya Chomengam	Vice-president
อุปนายกฯ 3	ทพญ.มยุรี จันทร์โท	Mayuree Chuntho	Vice-president
อุปนายกฯ 4	ทพญ.สมจิตร์ จินากักดี	Somjit Jinapak	Vice-president
บรรณาธิการ	รศ.ทพ.สมชาย วิริยะยุทธกร	Assoc. Prof. Somchai Viriyayudhakorn	Editor
สวัสดิการ	ทพ.ชัยพฤกษ์ เจริญจิตต์	Dhaiyapruck Chalemjit	Social welfare
วิเทศสัมพันธ์	ผศ.ดร.ทพ.เทวฤทธิ์ สระชนะ	Assist. Prof. Dr. Tewarit Sarachana	International Affairs
นายทะเบียน	อ.ดร.ทพ.ประสงค์ แคน้ำ	Dr. Prasong Khaenam	Registrar
วิชาการ	รศ.ดร.ทพญ.ปานัน รั้ววงศ์จिरกุล	Assoc. Prof. Dr. Panan Rattawongjirakul	Scientific chairman
ประชาสัมพันธ์	อ.ดร.ทพ.ธนสาร ศิริรัตน์	Dr. Thanasan Sirirat	Public relations
เหรัญญิก	ทพญ.ภัทราภรณ์ บุญขันท์	Patraporn Boonkant	Treasurer
เลขาธิการฯ	ทพ.ไพบูลย์ รัตนชัยพรพันธ์	Paiboon Rattanchaipornpun	Secretary general
กรรมการกลาง	ทพ.ชวชล เศรษฐอุดม	Dhavachol Setthaudom	Committee
กรรมการกลาง	ทพญ.ธัญธารีย์ สิริธัญญ์สกุล	Thantharee Sirithansakul	Committee
กรรมการกลาง	ทพ.ณภัทร ไชยมงคล	Napat Chaimongkol	Committee
กรรมการกลาง	อ.ดร.ทพ.ปฐมพงษ์ สถาพรพงษ์	Dr. Patompong Satapornpong	Committee
กรรมการกลาง	อ.ทพ.นนทวิชญ์ ไพรัตน์	Nontawit Pirat	Committee
กรรมการกลาง	อ.ทพ.ภาณุพงศ์ สหายสุข	Panupong Sahaisook	Committee
กรรมการกลาง	ทพญ.จันทร์เพ็ญ บุญบาศรี	Janpen Boosabasri	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
○ เพิ่มหน้าด้านในสี	อัตรา 9,000 บาท/ฉบับ	รวม 27,000 บาท/ปี

ตั้งแต่ฉบับที่ ปี

รวมทั้งสิ้นเป็นเงิน บาท ตัวอักษร (.....)

จำนวนพิมพ์ครั้งละ 150 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

The Application of Mitochondrial DNA Variation Testing in Human

Prapatsorn Areesirisuk and Budsaba Rerkamnuaychoke*

*Department of Pathology, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital,
Mahidol University, Bangkok, Thailand*

Abstract

Mitochondrial DNA (mtDNA) is a useful genetic marker that can be applied in various applications including the human evolution study, anthropology, maternal lineage identification in forensic genetics, as well as the mutation variations of mitochondrial genes to predict the medical diagnosis. The mtDNA mutation variations are collected from popular international databases including GenBank, EMPOP, and MITOMAP used as references and mtDNA data comparison to achieve the quality and standardized analysis.

Keywords: Mitochondrial genome, mtDNA mutation, Database

*Corresponding author E-mail address: budsaba.rer@mahidol.ac.th

การประยุกต์การทดสอบไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในมนุษย์

ประภัสสร อารีสิริสุข และ บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค*

ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร

บทคัดย่อ

ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA: mtDNA) เป็นเครื่องหมายพันธุกรรม (genetic marker) ที่มีประโยชน์และสามารถนำมาประยุกต์ได้หลายด้าน เช่น การศึกษาวิวัฒนาการของมนุษย์ การศึกษาด้านมานุษยวิทยาการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลในงานนิติพันธุศาสตร์ รวมไปถึงความผันแปรของการกลายในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอสำหรับทำนายการเกิดโรคในทางการแพทย์ ความผันแปรของตำแหน่งการกลายที่ได้มีการรวบรวมไว้ในฐานข้อมูลสากลที่ได้รับความนิยม เช่น GenBank, EMPOP และ MITOMAP สำหรับใช้ในการอ้างอิงและเปรียบเทียบข้อมูลไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอเพื่อให้เกิดการวิเคราะห์ที่มีคุณภาพและได้มาตรฐาน

คำสำคัญ: จีโนมของไมโทคอนเดรีย ตำแหน่งการกลายในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ ฐานข้อมูล

1. บทนำ

ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) เป็นออร์แกเนลล์ของเซลล์ (cellular organelle) มีดีเอ็นเอเป็นสารพันธุกรรมของตัวเองโดยเฉพาะเรียกว่า ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA: mtDNA) ในเซลล์ของมนุษย์ ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ มีลักษณะเป็น double stranded DNA ที่มีลักษณะเป็นวงกลม สามารถจำลองโมเลกุลดีเอ็นเอและสังเคราะห์โปรตีนได้เอง ซึ่งมีการกระจายอยู่ในไซโทพลาสซึม ภายในเซลล์จะมีไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอประมาณ 1,000-10,000 ชุด^(1,2) แตกต่างจากดีเอ็นเอในนิวเคลียส (nuclear DNA) ที่พบเพียง 2 ชุดต่อเซลล์ ด้วยคุณสมบัตินี้จึงนิยมตรวจไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในกรณีที่ไม่สามารถตรวจดีเอ็นเอในนิวเคลียสได้อย่างสมบูรณ์ เช่น การตรวจตัวอย่างส่งตรวจที่เสื่อมสภาพ หรือไม่มีดีเอ็นเอในนิวเคลียส เป็นต้น

จีโนมของไมโทคอนเดรีย (mitochondrial genome) มีความยาว 16,569 คู่เบส (base pair) และยีน 37 ยีน ประกอบด้วยยีนที่ถอดรหัสเป็นอาร์เอ็นเอถ่ายโอน (transfer RNA: tRNA) จำนวน 22 ยีน เป็นไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอ (ribosomal RNA: rRNA) จำนวน 2 ยีน และเป็นรหัสของการสังเคราะห์โปรตีนจำนวน 13 ยีน เพื่อทำหน้าที่ผลิตพลังงานในรูปของอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (adenosine triphosphate: ATP) ให้แก่เซลล์⁽¹⁻³⁾ ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอมีโครงสร้างดังแสดงใน Fig. 1 ทั้งนี้ลำดับสารพันธุกรรมในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเออาจมีการเปลี่ยนแปลงได้ เนื่องจากมีอัตราการกลายสูง

มีรายงานว่าอัตราการกลายของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอสูงกว่าดีเอ็นเอนิวเคลียสประมาณ 10-20 เท่า จึงนิยมใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ซึ่งการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอมีรูปแบบการถ่ายทอดไม่เป็นไปตามกฎของเมนเดล (non-Mendelian inheritance) แต่เป็นการถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมผ่านแม่ (maternal inheritance) ผ่านทางไซโทพลาสซึม (cytoplasm) ของเซลล์ไข่ของแม่ และถ่ายทอดไปยังลูกรุ่นต่อไปทุกคนโดยไม่มีกรรมตัวหรือแลกเปลี่ยนพันธุกรรมกับดีเอ็นเอจากสายพ่อ ทำให้ความแตกต่างของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในรุ่นลูกหลานปัจจุบันที่สืบสายจากบรรพบุรุษหญิงเดียวกันในอดีตเกิดขึ้นจากผลของการกลายที่เกิดขึ้นใหม่ทั้งสิ้น^(4,5) นอกจากนี้ในบางกรณีการกลายที่เกิดขึ้นในยีนของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเออาจทำให้เกิดโรคได้เช่นกัน จากหลักการถ่ายทอดทางพันธุกรรมผ่านแม่ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ อีกทั้งขนาดข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมในจีโนมของไมโทคอนเดรียมีขนาดไม่ใหญ่มากและยิ่งไปกว่านั้นด้วยเทคโนโลยีในการหาลำดับพันธุกรรมในปัจจุบัน ทำให้สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ในเวลาอันรวดเร็ว ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอจึงเป็นอีกหนึ่งเครื่องมือทางพันธุกรรม ที่นิยมนำมาประยุกต์ทั้งทางด้านการศึกษาทางวิวัฒนาการ (evolution) มานุษยวิทยา (anthropology) นิติพันธุศาสตร์ (forensic genetics) และการแพทย์เพื่อวินิจฉัยโรคที่เกิดจากการกลายของยีนในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอได้เป็นอย่างดี

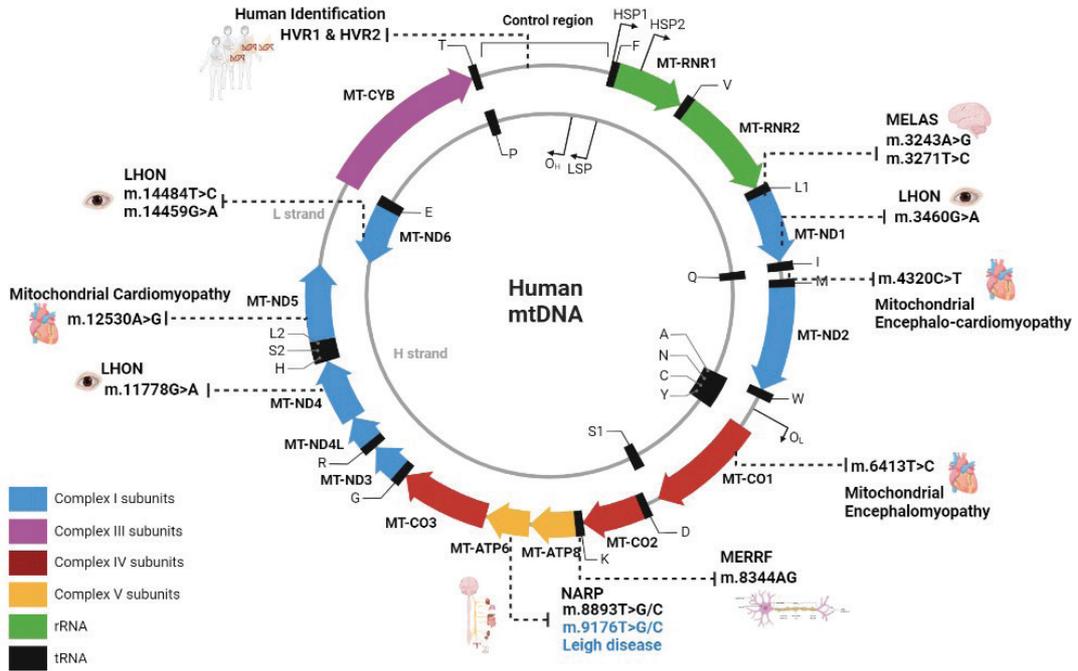


Fig. 1 Mitochondrial DNA structure and common mutant regions for several applications.

2. รูปแบบการรายงานข้อมูลการกลายของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอมีหลายเทคนิค ได้แก่ การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิคแซงเกอร์ (Sanger sequencing) และเทคโนโลยี next generation sequencing (NGS) นอกจากนี้ยังมีเทคนิคใหม่ที่ใช้ตรวจหากลุ่มตำแหน่งการกลายที่สำคัญของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ และมีผลต่อการทำนายโรคที่จำเพาะได้ในคราวเดียว เรียกว่า เทคนิค multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) โดยทุกเทคนิคมีจุดมุ่งหมายเดียวกันคือ การศึกษาความหลากหลายของรูปแบบการกลายของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

รูปแบบการรายงานตำแหน่งการกลายจึงมีความสำคัญ โดยรายงานตำแหน่งการกลายของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ ซึ่งเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของตัวอย่างที่ต้องการตรวจพิสูจน์กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเออ้างอิง (revised Cambridge Reference Sequence: rCRS 1999; NC_012920.1) ที่รายงานโดย Andrews และคณะ⁽⁶⁾ ซึ่งเป็นรูปแบบตำแหน่งที่แตกต่างไปจากลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง (rCRS 1999; NC_012920.1)⁽⁶⁾ และชนิดของนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนไป ในที่นี้จะยกตัวอย่างการรายงานรูปแบบการกลายของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ 3 รูปแบบได้แก่

(1) การกลายแบบเฉพาะจุด (point mutation) คือ การเปลี่ยนชนิดของนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งนั้น เช่น นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 16093 ในบริเวณ HVR 1 (hyper variable region 1) มีการกลายพันธุ์จากเบส T เป็น C จะมีรูปแบบการเขียนได้ดังนี้ T16093C 16093C หรือ 16093T>C เป็นต้น

(2) การกลายแบบขาดหาย (deletion mutation) คือ การขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งนั้น อาจจะมีการหายไปเพียง 1 เบส หรือ หายไปมากกว่า 1 เบส เช่น นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 249 ในบริเวณ HVR 2 มีการกลายแบบขาดหายของเบส A จะมีรูปแบบการเขียนได้ ดังนี้ 249DEL, 249del หรือ 249- เป็นต้น

(3) การกลายแบบสอดแทรก (insertion mutation) คือ การเพิ่มนิวคลีโอไทด์เข้าไปในลำดับดีเอ็นเอตำแหน่งนั้น ซึ่งอาจจะเพิ่มขึ้นเพียงจำนวน 1 เบส หรือมากกว่า 1 เบส ที่เป็นชนิดเดียวกัน หรือเบสต่างชนิดกันก็ได้ เช่น นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 309 ในบริเวณ HVR 2 มีลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง คือ C แต่มีการเพิ่มจำนวน C มา 1 เบส จะมีรูปแบบการเขียนได้ดังนี้ 309.1C หากมีการเพิ่มจำนวน C มา 2 เบส จะมีรูปแบบการเขียนได้ดังนี้ 309.2C โดยตัวเลขหลังตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่เกิดการกลายจะแสดงจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่เพิ่มขึ้น^(2, 7)

3. การประยุกต์ข้อมูลการกลายในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

จากการรายงานพบว่ามีการนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอมาประยุกต์อย่างแพร่หลายในงานวิจัยหลายด้าน ซึ่งในงานวิจัยแต่ละด้านจะใช้รูปแบบการรายงานที่เป็นมาตรฐานเดียวกัน โดยอาจจะมีความจำเพาะเจาะจงมากขึ้นในบางรายงานแต่ไม่ได้เปลี่ยนแปลงจากเดิมมากนัก โดยมีข้อจำกัดหรือจุดเด่นในการรายงานในแต่ละรูปแบบ

ของการประยุกต์ ซึ่งรูปแบบการรายงานหลักจะเป็นการรายงานรูปแบบตำแหน่งการกลายของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง โดยมีการประยุกต์ข้อมูลความหลากหลายของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเออย่างแพร่หลายดังนี้

3.1 นิติพันธุศาสตร์ (forensic genetics)

จากการที่รูปแบบการกลายของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอมีความหลากหลาย (mtDNA polymorphism pattern) มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมผ่านแม่ไปสู่ลูกหลาน โดยเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณควบคุม (control region) ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอที่มีอัตราการกลายสูงกว่าบริเวณอื่น เรียกว่า hypervariable region (HVR) มี 3 บริเวณ ได้แก่ HVR1, HVR2 และ HVR3 หรือ เรียกว่า D-loop (displacement loop) นอกจากนี้การที่แต่ละเซลล์มีจำนวน copy ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอภายในเซลล์เป็นจำนวนมาก ทำให้มีโอกาสที่จะสกัดเอาไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ ออกจากตัวอย่างที่เสื่อมสภาพ ตัวอย่างที่ไม่สมบูรณ์และไม่มีนิวเคลียสมาวิเคราะห์ได้ การตรวจพิสูจน์ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ จึงเป็นอีกหนึ่งการทดสอบทางนิติพันธุศาสตร์ที่นำมาใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล โดยสามารถวิเคราะห์ได้จากความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณ HVR 1 และ HVR 2 เป็นอย่างน้อย^(2, 8) หลักการแปรผลของการตรวจพิสูจน์ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ อาศัยหลักการที่บุคคลซึ่งสืบเชื้อสายมาจากสายมารดาเดียวกันจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ ที่สองบริเวณดังกล่าวไม่แตกต่างกัน^(2, 7)

รูปแบบการรายงานผลของการตรวจวิเคราะห์ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในงานนิติวิทยาศาสตร์มีความสำคัญเป็นอย่างมาก รูปแบบการรายงานต้องได้มาตรฐาน และสามารถเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการได้ โดยแต่ละห้องปฏิบัติการต้องมีหลักการรายงานผลตาม

แนวทาง (guideline) ของ Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWADM)⁽⁷⁾ เพื่อให้มีการรายงานตำแหน่งและรูปแบบการรายงานผลที่ตรงกัน ได้มาตรฐานและสามารถเปรียบเทียบผลการตรวจพิสูจน์ได้ทั่วโลก นอกจากนี้ยังมีรายงานว่านอกจากบริเวณ HVR1, HVR2 และ HVR3 แล้ว ยังมียีนที่อยู่บริเวณ coding region ที่นำมาใช้ตรวจเพิ่มเติมได้ เช่น *ND4* และ *ND5* ที่ให้ค่า power of discrimination ใกล้เคียงกับ HVR1 และ HVR2⁽⁹⁾ ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมทางเลือกเพื่อเพิ่มความสามารถในการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลได้

ในปัจจุบันเทคโนโลยีการลำดับสารพันธุกรรมได้รับการพัฒนาอย่างรวดเร็วทำให้ราคาถูกลง ทำให้มีการนำเทคโนโลยีนี้มาประยุกต์ในงานต่าง ๆ มากขึ้น รวมทั้งการใช้ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในการพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายมารดาเป็นที่นิยมมากขึ้น^(10, 11) นอกจากนี้ข้อมูลความหลากหลายของชุดลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mtDNA haplotypes diversity) ของแต่ละประเทศมีความสำคัญและมีเอกลักษณ์ในประชากรแต่ละกลุ่ม จึงมีการจัดกลุ่มรูปแบบ haplotype โดยจำแนกกลุ่มประชากรตามความผันแปรของนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งต่าง ๆ เพื่อศึกษาความจำเพาะของกลุ่มประชากรในแต่ละภูมิภาคเรียกว่า haplogroup สำหรับอธิบายความจำเพาะของสารพันธุกรรมของกลุ่มประชากรอีกด้วย การศึกษาความจำเพาะของประชากรของแต่ละประเทศจึงมีความสำคัญและมีประโยชน์ในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล เช่น ในกรณีการตามหาบุคคลสูญหาย ซึ่งในประเทศไทยได้มีการศึกษาทั้ง haplotype และ haplogroup ในกลุ่มประชากรไทยปัจจุบัน (modern Thai population)

ซึ่ง haplogroup ที่พบมากที่สุดคือ F1a และพบในลำดับถัดมา ได้แก่ B5a และ M7b ตามลำดับ⁽¹²⁾ โดย haplogroup ดังกล่าว มีความผันแปรของนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่จำเพาะในกลุ่มประชากรเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งมีภูมิศาสตร์ที่อยู่ใกล้ประเทศไทยอีกด้วย นอกจากนี้ ประภัศร และคณะ⁽¹²⁾ ได้ศึกษา haplogroup ในกลุ่มประชากรไทยปัจจุบัน และได้นำข้อมูลไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอดังกล่าวไปเผยแพร่ในฐานข้อมูล EMPOP ซึ่งนำไปใช้ประโยชน์ในการอ้างอิงและเปรียบเทียบกับข้อมูลอื่นได้

3.2 มานุษยวิทยา (anthropology)

มานุษยวิทยา (anthropology) เป็นการศึกษาเกี่ยวกับข้อมูลมนุษย์และศึกษาวิวัฒนาการของมนุษย์ ซึ่งเริ่มมีการใช้ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในการศึกษาทางมานุษยวิทยาตั้งแต่ปีคริสต์ศักราช 1987⁽¹³⁾ ต่อมาการศึกษาเกี่ยวกับพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลและพันธุศาสตร์ประชากร (population genetics) ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอมนุษย์ในภูมิภาคต่าง ๆ ทั่วโลกได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว⁽¹⁴⁾ ทำให้มีการประยุกต์ในการสืบค้นความสัมพันธ์ในแง่ของวิวัฒนาการและในแง่โครงสร้างทางภูมิศาสตร์ภายในกลุ่มประชากรได้เป็นอย่างดี

จุดเด่นของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอที่เหมาะสมต่อการนำมาศึกษาด้านมานุษยวิทยา มีหลายประการ เช่น

- ไมโทคอนเดรียมีจำนวน copy มากภายในเซลล์ ทำให้มีโอกาสที่จะสกัดเอาไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่มีอายุเก่าแก่ซึ่งอาจอยู่ในสภาพที่ไม่ดีหรือเสื่อมสภาพ มาวิเคราะห์ได้
- ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอมีวิวัฒนาการค่อนข้างเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอในนิวเคลียสของสัตว์หลายชนิดรวมถึงมนุษย์

- ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ ไม่เกิด genetic recombination และมีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมผ่านสายแม่เท่านั้น ทำให้การแปลผลไม่ซับซ้อนเหมือนดีเอ็นเอในนิวเคลียส เนื่องจากนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอมีลำดับคงเดิมทุกประการเมื่อมีการถ่ายทอดจากแม่ไปสู่ลูก ดังนั้นความแตกต่างในระดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่างจะสะท้อนให้เห็นถึงความแตกต่างของวิวัฒนาการในแต่ละประชากรได้⁽¹⁵⁾

จากหลักการที่กล่าวมาข้างต้นพบว่าการศึกษาความหลากหลายของสารพันธุกรรมในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ ยังสามารถนำมาประยุกต์ในการสืบสวน การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของซากโครงกระดูกโบราณในแหล่งโบราณคดี และความสัมพันธ์ระหว่างประชากรในพื้นที่ระหว่างโครงกระดูกกับชนกลุ่มต่าง ๆ รวมทั้งระหว่างโครงกระดูกโบราณกับพฤติกรรมดำรงชีวิตของกลุ่มชาติพันธุ์ในแต่ละพื้นที่ได้ ทั้งนี้ในประเทศไทยก็มีการศึกษาข้อมูลของความหลากหลายของสารพันธุกรรมด้วยเช่นกัน โดยทำการศึกษาในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในส่วนของประชากรกลุ่มต่าง ๆ ในปัจจุบันของประเทศไทย และมีงานวิจัยที่ศึกษากลุ่มประชากรโบราณ โดยมีทั้งแบบจำแนกโดยการที่ใช้ภาษา เช่น กลุ่มประชากรโบราณที่ใช้ภาษาตระกูลไต-กะไต หรือการจำแนกโดยการที่ใช้กลุ่มประชากรโบราณตามภูมิภาคที่ค้นพบ เช่น บ้านเชียง รวมทั้งจากโครงกระดูกโบราณยุคสัมฤทธิ์ และยุคเหล็กที่ขุดค้นในประเทศไทย ด้วยความร่วมมือกับกรมศิลปากร โดยข้อมูลไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ได้จะนำมาศึกษาและเปรียบเทียบทั้งในแง่ของ haplotype diversity, phylogenetic tree และ genetic distance รวมทั้งการจัด haplogroup แล้ว

นำข้อมูลที่ได้มาบูรณาการกับข้อมูลด้านมานุษยวิทยา ประวัติศาสตร์ และโบราณคดี^(11, 15-17)

3.3 การวินิจฉัยโรคไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mtDNA diagnosis)

ในทางการแพทย์ความผิดปกติของยีนในไมโทคอนเดรียทำให้เกิดโรคได้หลายโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งในโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทและระบบกล้ามเนื้อ (neuromuscular system) ซึ่งเป็นระบบที่ต้องใช้พลังงานสูงและหากเกิดความผิดปกติขึ้นจะส่งผลต่อระบบพลังงานในร่างกาย และส่งผลต่อการเกิดโรคร้ายแรงได้ โรคที่เกิดจากความผิดปกติของยีนไมโทคอนเดรียที่พบในปัจจุบันนั้นมีหลายโรค⁽¹⁸⁾ มีการวิจัยและรายงานตำแหน่งการกลายในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ใช้ในการวินิจฉัยโรคหลายตำแหน่ง แต่ละตำแหน่งจะจำเพาะต่อโรคนั้น ๆ และ/หรือเกี่ยวข้องกับหลายระบบในร่างกาย เช่น โรค Leigh syndrome เป็นภาวะผิดปกติของระบบประสาทที่หายาก ซึ่งเกิดจากการกลายของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *ATP6* โรค Mitochondrial Encephalopathy Lactic Acidosis and Stroke-like Episodes (MELAS) เป็นภาวะกรดแลคติกในเลือดสูงร่วมกับภาวะคล้ายสมองขาดเลือด จะพบการกลายของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอาร์เอ็นเอถ่ายโอน (tRNA) นอกจากนี้ยังพบว่า โรค Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fiber (MERRF) เป็นภาวะการเคลื่อนไหวผิดปกติแบบกระตุกหรือลมชักก็พบการกลายของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอาร์เอ็นเอถ่ายโอน (tRNA) เช่นกัน ในรายงานนี้ได้รวบรวมตำแหน่งการกลายที่สำคัญและทำให้เกิดโรคดังแสดงใน Table 1 และ Fig. 1 ซึ่งผู้เขียนได้จัดทำโครงสร้างไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอและแสดงตำแหน่งการกลาย ด้วยโปรแกรม biorender (<https://app.biorender.com/>) โดยใช้ข้อมูลที่รายงานเกี่ยวกับ

ตำแหน่งการกลายจาก Habbane และคณะ⁽³⁾ เพื่อให้เข้าใจได้ง่ายขึ้น

นอกจากนั้นแล้ว ยังพบว่าโรคที่พบได้บ่อยในประชากรทั่วไป ส่วนหนึ่งเกิดจากความผิดปกติของยีนไมโทคอนเดรียได้ เช่น โรคเบาหวาน โรคพาร์กินสัน และโรคอัลไซเมอร์⁽¹⁹⁻²¹⁾ เป็นต้น ซึ่งโรคเหล่านี้เกิดจากการกลายที่อาจจะเป็นการขาดหายไปของยีนไมโทคอนเดรียหรือมีการแทนที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์บางตำแหน่งของยีนไมโทคอนเดรีย จากข้อมูลที่นักวิจัยกลุ่มอื่นรายงานว่า การจำแนกโรคไมโทคอนเดรีย ที่เกิดจากความผิดปกติของยีนไมโทคอนเดรียมีหลายโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งในโรค Leber hereditary optic neuropathy (LHON) ที่ผู้ป่วยมีอาการตามัวอย่างเฉียบพลัน LHON นับได้ว่าเป็นโรคไมโทคอนเดรียที่

พบมากที่สุดในประเทศไทย^(3, 22) ปัจจุบันการตรวจหาตำแหน่งการกลายของโรคนี้ยังใช้การหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธีแซงเกอร์ซึ่งถือว่าเป็นเทคนิคมาตรฐาน (gold standard) แต่ในกลุ่มโรคนี้มีตำแหน่งที่เกิดการกลายพบในหลายยีนของไมโทคอนเดรีย ดังนั้นการใช้วิธีแซงเกอร์อาจจะไม่คุ้มค่าหากต้องการทราบทุกตำแหน่งที่เกี่ยวข้อง ซึ่งในปัจจุบันมีการวิจัยและพัฒนาเทคนิคอื่น ๆ เพื่อช่วยเพิ่มความรวดเร็วและลดค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์ให้เหมาะสม เช่น วิธี multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)⁽²³⁾ และนอกจากนี้ยังมีการพัฒนารูปแบบการหาลำดับเบสให้ได้ปริมาณมากและรวดเร็วขึ้นโดยเทคโนโลยี NGS⁽³⁾ เป็นต้น

Table 1 Mitochondrial genome mutation and disease.^(3, 19-22)

Disease	Organelle	Symptoms	mtDNA mutation region	Gene
Leber's Hereditary Optic Neuropathy (LHON)	eye	- eyesight loss, starting with painless blurriness	m.3460G > A	<i>ND1</i>
		- vision loss occurs because the cells in the optical nerve die	m.11778G > A m.14484T > C m.14459G > A	<i>ND4</i> <i>ND6</i> <i>ND6</i>
Neurogenic Ataxia and Retinitis Pigmentosa (NARP)	nervous system	neuropathy	m.8993T > G/C	<i>ATP6</i>
Leigh syndrome	central nervous system	progressive neurological, seizures, poor sucking ability, loss of head control and motor skills	m.8993T > G/C m.9176T > G/C	<i>ATP6</i> <i>ATP6</i>

Table 1 Mitochondrial genome mutation and disease.^(3, 19-22) (Cont.)

Disease	Organelle	Symptoms	mtDNA mutation region	Gene
Mitochondrial Encephalopathy Lactic Acidosis and Stroke-like Episodes (MELAS)	brain	lactic acidemia, epilepsy, and stroke	m.3243A > G m.3271T > C	tRNA ^{Leu} (UUR)
Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fiber (MERRF)	muscle and nervous system	generalized epilepsy, ataxia, weakness, and dementia	m.8344AG	tRNA ^{Lys}
Mitochondrial Encephalo-cardiomyopathy	heart muscle	heart muscle abnormalities	m.4320C > T m.12530A > G	tRNA ^{Ala} <i>ND5</i>
Mitochondrial Encephalomyopathy			m.6413T > C	<i>CO1</i>

4. วิธีการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

เทคโนโลยีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในปัจจุบันมีหลายวิธี โดยวิธีหลักที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอที่นิยมใช้ มี 2 วิธี ได้แก่

4.1 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้เทคนิคแซงเกอร์ (Sanger sequencing)

ในปัจจุบันยังถือว่าเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) ที่นิยมใช้ อาศัยหลักการ dideoxynucleotide chain termination ด้วยการนำนิวคลีโอไทด์ที่ติดหมู่

hydroxyl บริเวณ carbon ตำแหน่งที่ 3 ออก ซึ่งทำให้หยุดการสร้างดีเอ็นเอ เรียกว่า dideoxynucleotide (ddNTP) ประกอบด้วย ddATP, ddTTP, ddCTP และ ddGTP และนำมาติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent dye) ซึ่งนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดจะมีการติดฉลากสีที่ต่างกัน จากนั้นใช้เอนไซม์ในการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ลำดับนิวคลีโอไทด์ใหม่จะประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์แต่ละตัวที่ติดฉลาก เมื่อเข้าไปต่อกับนิวคลีโอไทด์ก่อนหน้า จะทำให้ปฏิกิริยาหยุดเนื่องจากไม่มีหมู่ hydroxyl group ที่มาสร้างพันธะ phosphodi-

ester กับนิวคลีโอไทด์โมเลกุลใหม่ ทำให้ดีเอ็นเอมีขนาดที่แตกต่างกัน แล้วจึงนำมาแยกขนาดด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรม ได้ข้อมูลอิเล็กทรอนิกส์โรแกรม (electropherogram) มาวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอต่อไป⁽²⁴⁾

4.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้เทคโนโลยี Next Generation Sequencing (NGS)

เป็นวิธีที่สามารถวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอจำนวนมากได้พร้อมกัน (massively parallel sequencing) การทำปฏิกิริยาแต่ละครั้งสามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ถึงประมาณ 6 แสนล้านเบส (600 Gb) ในขณะที่วิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบแซงเกอร์จะหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้เพียง 1 พันเบส⁽²⁵⁾ โดยเทคโนโลยีนี้มีหลักการทั่วไปคือ การอ่านลำดับเบสในขณะที่เกิดปฏิกิริยาสังเคราะห์สารพันธุกรรม (sequence by synthesis) สามารถแบ่งประเภทตามความยาวของสารพันธุกรรมที่ถูกสังเคราะห์ได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่

(1) การสังเคราะห์สารพันธุกรรมสายสั้น (short reading) บนเทคโนโลยี second generation sequencing เช่น

- เทคโนโลยีของ Illumina ที่ใช้การอ่านลำดับเบสด้วย fluorescence detection
- เทคโนโลยีของ Ion torrent ใช้หลักการอ่านลำดับเบสด้วย Ion detection
- เทคโนโลยีของ Applied Biosystems สามารถอ่านลำดับเบสจากสารเรืองแสงที่ติดฉลากบนชุดสารพันธุกรรม 10-20 เบส ซึ่งสุ่มปล่อยเข้าสู่ระบบเพื่อเข้าคู่สมกับสารพันธุกรรมต้นฉบับ (เรียกเทคโนโลยี sequence by ligation)

ข้อจำกัดของการสังเคราะห์สารพันธุกรรมสายสั้น ได้แก่ มีโอกาสที่ส่วนของสารพันธุกรรมจะถูกอ่านไม่เท่ากันจากขั้นตอนเตรียม library (enrichment bias) จึงอาจเกิดปัญหาการจัดวางเทียบกับลำดับเบสในกรณีเกิดการสอดแทรกและการขาดหายไปของเบส (insertion-deletion) และกรณีลำดับเบสซ้ำขนาดยาว

(2) การสังเคราะห์สารพันธุกรรมสายยาว (long reading) บนเทคโนโลยี third generation sequencing

- เทคโนโลยีจากบริษัท PacBio ที่อาศัย DNA polymerase สังเคราะห์สารพันธุกรรมสายยาว พร้อมอ่านลำดับเบสจากสารเรืองแสงแต่ละลำดับ

- เทคโนโลยีจากบริษัท Oxford Nanopore ที่อาศัยการสังเคราะห์สารพันธุกรรมบนรูขนาดเล็กลงและทำการบันทึกลำดับเบสจากความต่างศักย์ที่เปลี่ยนแปลงที่ละลำดับ เมื่อเสร็จกระบวนการจะได้ไฟล์รหัสพันธุกรรมพร้อมข้อมูลคุณภาพเช่นเดียวกัน

ข้อจำกัดของการสังเคราะห์สารพันธุกรรมสายยาว ได้แก่ โอกาสเกิดความผิดพลาดในปฏิกิริยา polymerization สูงขึ้นเมื่อสังเคราะห์สายพันธุกรรมที่ยาวขึ้นเนื่องจากเอนไซม์ที่ใช้ไม่ทำงานในการตรวจสอบความถูกต้อง (proof reading)^(3,26)

การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี NGS จะใช้โปรแกรมที่จำเพาะในการวิเคราะห์เพื่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอซึ่งนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงและรายงานตำแหน่งที่เกิดการกลายแล้วนำไปประยุกต์ในงานด้านต่าง ๆ ต่อไป

ในปัจจุบันงานทางนิติพันธุศาสตร์ยังนิยมใช้วิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบแซงเกอร์ ซึ่งยังคงเป็นวิธีมาตรฐาน โดยจะเลือกใช้บริเวณที่มีความหลากหลายบนบริเวณควบคุม (control region) ซึ่งเรียก

ว่า hypervariable region (HVR 1 และ HVR 2) ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งมีขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์เพียง 300-400 คู่เบสเท่านั้น แต่ในงานด้านการวินิจฉัยโรค ที่ยังไม่ทราบโรคที่จำเพาะเจาะจง จะนิยมใช้การหาความผิดปกติของไมโทคอนเดรียลจีโนม โดย NGS เนื่องจากวิธีนี้สามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอทำได้ในปริมาณมาก ครอบคลุมรวดเร็วและราคาค่าใช้จ่ายถือว่ามีความคุ้มค่าเมื่อเทียบกับข้อมูลที่ได้^(3, 10)

5. ฐานข้อมูลจำเพาะของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

ในปัจจุบันข้อมูลทางด้านไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของมนุษย์มีจำนวนมากขึ้น และมีการนำไปประยุกต์ใช้งานอย่างหลากหลาย ทั้งในด้านการศึกษาวिकास การมานุษยวิทยา นิติวิทยาศาสตร์ และการวินิจฉัยโรค ดังนั้นการรวบรวมข้อมูลความหลากหลายของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของมนุษย์จึงมีความสำคัญ ฐานข้อมูลของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของมนุษย์ก็เป็นอีกช่องทางที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้โดยตัวอย่างฐานข้อมูลของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของมนุษย์ที่นิยมใช้และมีความน่าเชื่อถือมีดังนี้

5.1 GenBank

GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) เป็น DNA sequence database ที่เริ่มก่อตั้งเมื่อปี 1992 ซึ่งฐานข้อมูลนี้ประกอบด้วยข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ทั้งมนุษย์ สัตว์ พืช และจุลินทรีย์ และยังเป็นฐานข้อมูลที่สามารถนำผลการวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมมาเปรียบเทียบเพื่อการวิจัยทางด้านประชากร หรือโรคทางพันธุกรรมได้อีกด้วย ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอก็

เป็นข้อมูลหนึ่งที่ถูกรวบรวมในฐานข้อมูลนี้ซึ่งถือว่าเป็นฐานข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมที่มีขนาดใหญ่ที่สุด^(27, 28) แต่เนื่องจากฐานข้อมูล GenBank มีขนาดใหญ่อาจเกิดข้อจำกัดในงานวิจัยที่ต้องการข้อมูลที่จำเพาะจึงทำให้ต้องใช้เวลาในการคัดกรองข้อมูลมากขึ้น

5.2 EMPOP

EMPOP database (www.empop.com)⁽²⁹⁾

เป็นฐานข้อมูลความหลากหลายของตำแหน่งการกลายในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอมนุษย์ ซึ่งรวบรวมข้อมูล haplotype diversity ของประชากรแต่ละประเทศโดยมีรูปแบบการรายงานตำแหน่งการกลายตามแนวทางของ Scientific Working Group on DNA Methods (SWGDM) และมีการจัด haplogroup โดยใช้พื้นฐานจาก phylogenetic tree⁽³⁰⁾ ที่ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต โดยใช้องค์ความรู้พื้นฐานด้านพันธุกรรมเป็นตัวบ่งชี้ความสัมพันธ์ของแต่ละประชากร ซึ่งเป็นประโยชน์มากทั้งทางด้านนิติพันธุศาสตร์ที่ต้องการทราบความจำเพาะของประชากรแต่ละประเทศเพื่อใช้ในการตามหาบุคคลสูญหาย หรือใช้อธิบายการอพยพย้ายถิ่น (migration) ของแต่ละกลุ่มประชากรในงานทางด้านมานุษยวิทยาได้อีกด้วย อย่างไรก็ตามฐานข้อมูลของ EMPOP ก่อนข้างจำเพาะกับงานด้านการศึกษาประชากร จึงไม่เหมาะกับงานวิจัยด้านการแพทย์

5.3 MITOMAP

MITOMAP (A human mitochondrial genome database) (<https://www.mitomap.org>) เป็นฐานข้อมูลที่รวบรวมงานวิจัยที่รายงานความหลากหลายของการกลายในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของมนุษย์ โดยจะรายงานในรูปแบบความถี่ของแต่ละตำแหน่งที่มีการกลายในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอพร้อมทั้งบอกแหล่งที่มาของข้อมูลอย่างชัดเจน ซึ่งมีประโยชน์ใน

ด้านการแพทย์ในการรายงานตำแหน่งที่ก่อให้เกิดโรค นอกจากนี้ยังรายงานความหลากหลายในแต่ละกลุ่มประชากรทำให้สามารถนำมาศึกษาความจำเพาะของแต่ละกลุ่มประชากรได้⁽³¹⁾ จากการศึกษาข้อมูลที่มีความครอบคลุมมาก ผู้ใช้ข้อมูลต้องมีความรู้พื้นฐานทางด้านความหลากหลายของตำแหน่งการกลายในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอเพื่อที่จะเลือกใช้ข้อมูลได้อย่างเหมาะสมและรวดเร็วขึ้น

จากที่กล่าวมาทั้งหมด ฐานข้อมูลไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอแต่ละฐานข้อมูล มีข้อดีและข้อจำกัดที่แตกต่างกัน ดังแสดงใน Table 2 ดังนั้นการเลือกใช้

ฐานข้อมูลได้อย่างจำเพาะเจาะจงจึงเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการศึกษาวิจัยต่าง ๆ ได้รวดเร็วขึ้น อีกทั้งยังเป็นตัวชี้วัดการค้นพบตำแหน่งการกลายชนิดใหม่ในแต่ละประชากร หรือในงานที่ศึกษาได้เนื่องจากในฐานข้อมูลได้รวบรวมงานวิจัยที่เคยพบตำแหน่งการกลายต่าง ๆ ไว้เป็นจำนวนมาก

หากมีเป้าหมายในการศึกษาข้อมูลการกลายพันธุ์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอจีโนมที่เจาะจงแล้ว การเลือกใช้ข้อมูลที่จำเพาะในแต่ละงานจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพ และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างถูกต้อง และรวดเร็ว

Table 2 Comparison of human mitochondrial DNA database utilization (Data collecting date: March, 2023).

No.	Database	Number of uploaded sequences	Input data	Output data	Advantage	Limitation
1.	GenBank	Real-time updated data	- Fasta file - Bam file	- nucleotide sequence - annotation of mtDNA	- vast information on mitochondrial DNA sequences available - raw sequence data from 2 sequencing methods (Sanger sequencing and NGS) available	too huge amount of genomic DNA information including mitogenome resulted in difficulty to get specific data

Table 2 Comparison of human mitochondrial DNA database utilization (Data collecting date: March, 2023). (Cont.)

No.	Database	Number of uploaded sequences	Input data	Output data	Advantage	Limitation
2.	EMPOP database	- 46,963 HVR 1 and HVR 2 region (16024-16365 and 73-340) - 38,361 control region (16024-576) - 4,289 full-length mitogenome	SNP haplotype e.g. 16093C	- haplogroup information - frequency of haplotype and haplogroup from each population was previously reported	- the database available for haplogroup construction - haplogroup frequency data from worldwide population	- the entered data of the database is specific - specific information on population demographic diversity
3.	MITOMAP	- 78,884 control region (16024-576) - 59,389 full-length mitogenome	updated data of GenBank sequences every 4-6 months	- published data on human mitochondrial DNA variation - reference source data - frequency of mutation position data based on each population	- large amount of data collection - reference source of the information - point mutation data based on position - link to connect to the relevant database effectively - frequency of mitochondrial DNA mutation position of each population available	- hard to obtain data, prior basic sequence information required

บทสรุป

ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของมนุษย์เป็นข้อมูลทางด้านพันธุกรรมที่มีประโยชน์และนำไปประยุกต์ใช้ได้หลายด้าน การกลายของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในแต่ละตำแหน่ง สามารถนำไปใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล ทำนายการเกิดโรค รวมทั้งการศึกษาเกี่ยวกับต้นกำเนิดและการอพยพของกลุ่มประชากรที่สนใจ และในปัจจุบันเทคโนโลยีด้านอนุพันธุศาสตร์ได้พัฒนาไปอย่างรวดเร็ว การได้มาซึ่งข้อมูลพันธุกรรมของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอจึงทำได้ง่ายและราคาค่าคุ้มค้ำกับข้อมูลที่ได้รับ จึงเป็นผลดีและมีประโยชน์ในการประยุกต์ใช้ในงานทางด้านต่าง ๆ เพิ่มมากยิ่งขึ้น อีกทั้งปัจจุบันได้มีระบบฐานข้อมูลที่ได้รวบรวมข้อมูลสารพันธุกรรมของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของมนุษย์ในด้านต่าง ๆ ไว้อย่างหลากหลายและนำเชื่อถือให้นำมาประยุกต์ใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นไมโทคอนเดรียลจีโนม จึงเป็นอีกหนึ่งเครื่องหมายพันธุกรรมที่น่าสนใจศึกษาและมีประโยชน์ต่อการปฏิบัติงานด้านนิติวิทยาศาสตร์เป็นอย่างมาก

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการมนุษยพันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ที่สนับสนุนประสบการณ์และองค์ความรู้งานวิจัยเกี่ยวกับไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

เอกสารอ้างอิง

1. Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet* 2005; 389-402.
2. Amorim A, Fernandes T, Taveira N. Mitochondrial DNA in human identification: a review. *PeerJ* 2019; 7: e7314.
3. Habbane M, Montoya J, Rhouda T, Sbaoui Y, Radallah D, Emperador S. Human Mitochondrial DNA: Particularities and Diseases. *Biomedicine*. 2021; 9: 1364.
4. Sato M, Sato K. Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1833: 1979-84.
5. Basu S, Repository S. Mitochondrial Inheritance | Maternal Inheritance of Mitochondrial DNA. 2021 [cited 2023 Mar 31]; Available from: <https://www.sciencerepository.org/mitochondrial-inheritance>
6. Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge Reference Sequence for Human Mitochondrial DNA. *Nat Genet* 1999; 23: 147.
7. Budowle B, Polanskey D, Fisher CL, Den Hartog BK, Kepler RB, Elling JW. Automated alignment and nomenclature for consistent treatment of polymorphisms in the human mitochondrial DNA control region. *J Forensic Sci* 2010; 55: 1190-5.
8. Goodwin WH. The use of forensic DNA analysis in humanitarian forensic action: The development of a set of international standards. *Forensic Sci Int* 2017; 278: 221-7.
9. Sinha M, Rana M, Kushwaha P. Applications of Mitochondrial DNA in Forensic Science. In 2020. p. 329-43.

10. Parson W, Strobl C, Huber G, Zimmermann B, Gomes SM, Souto L, *et al.* Evaluation of next generation mtGenome sequencing using the Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM). *Forensic Sci Int Genet* 2013; 7: 543-9.
11. Kutanan W, Kampuansai J, Srikummool M, Kangwanpong D, Ghirotto S, Brunelli A, *et al.* Complete mitochondrial genomes of Thai and Lao populations indicate an ancient origin of Austroasiatic groups and demic diffusion in the spread of Tai-Kadai languages. *Hum Genet* 2017; 136: 85-98.
12. Areesirisuk P, Srikulnath K, Onsod P, Jaroensuk J, Rerkamnuaychoke B. Haplogroup Distribution of 309 Thais from Admixed Populations across the Country by HVI and HVII Sanger-Type Sequencing. *Diversity* 2021; 13: 496.
13. Wallace DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* 2005; 39: 359-407.
14. Nesheva D. Aspects of Ancient Mitochondrial DNA Analysis in Different Populations for Understanding Human Evolution. *Balkan J Med Genet* 2014; 17: 5-14.
15. Samehsalari S, Reddy KR. Application control region of human mitochondrial DNA in forensic anthropology. *Int J Anthropol* 2018; 2: 233-48.
16. Kampuansai J, Bertorelle G, Castri L, Nakbunlung S, Kangwanpong D. Mitochondrial DNA Variation of Tai Speaking Peoples in Northern Thailand. *Sci Asia* 2007; 33: 443-8
17. Kampuansai J, Kutanan W, Phuphanitcharoenkul S, Kangwanpong D. A suggested Khmuic origin of the hunter-gatherer Mlabri in northern Thailand: evidence from maternal DNA lineages. *Thai J Genet* 2012; 5: 203-15.
18. Ng YS, Turnbull DM. Mitochondrial disease: genetics and management. *J Neurol* 2016; 263: 179-91.
19. Alharbi MA, Al-Kafaji G, Khalaf NB, Messaoudi SA, Taha S, Daif A, *et al.* Four novel mutations in the mitochondrial ND4 gene of complex I in patients with multiple sclerosis. *Biomed Rep* 2019; 11: 257-68.
20. Buneeva O, Fedchenko V, Kopylov A, Medvedev A. Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease: Focus on Mitochondrial DNA. *Biomedicines* 2020; 8: 591.
21. Al-Ghamdi BA, Al-Shamrani JM, El-Shehawi AM, Al-Johani I, Al-Otaibi BG. Role of mitochondrial DNA in diabetes Mellitus Type I and Type II. *Saudi J Biol Sci* 2022; 29: 103434.

22. Phasukkijwatana N, Chuenkongkaew WL, Suphavitai R, Luangtrakool K, Kunhapan B, Lertrit P. Transmission of heteroplasmic G11778A in extensive pedigrees of Thai Leber hereditary optic neuropathy. *J Hum Genet* 2006; 51: 1110-7.
23. Dokrungkoon T, Onsod P, Areesirisuk P, Rerkamnuaychoke B, Vanikieti K, Chareonsirisuthigul T. Performance of the MLPA technique for detecting common mutations in Leber hereditary optic neuropathy. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal* 2019; 30: 819-24.
24. Ballard D. Analysis of Mitochondrial Control Region Using Sanger Sequencing. *Methods Mol Biol* 2016; 1420: 143-55.
25. Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol* 2018; 122: e59.
26. Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods. *Ann Rev Genomics Hum Genet* 2008; 9: 387-402.
27. Benson DA, Boguski MS, Lipman DJ, Ostell J, Ouellette BFF. *GenBank. Nucleic Acids Research* 1998; 26: 1-7.
28. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, *et al.* *GenBank. Nucleic Acids Res* 2013; 41(Database issue): D36-42.
29. Parson W, Gusmão L, Hares DR, Irwin JA, Mayr WR, Morling N, *et al.* DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: revised and extended guidelines for mitochondrial DNA typing. *Forensic Sci Int Genet* 2014; 13: 134-42.
30. Röck AW, Dür A, van Oven M, Parson W. Concept for estimating mitochondrial DNA haplogroups using a maximum likelihood approach (EMMA). *Forensic Sci Int Genet* 2013; 7: 601-9.
31. Ruiz-Pesini E, Lott MT, Procaccio V, Poole JC, Brandon MC, Mishmar D, *et al.* An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. *Nucleic Acids Res* 2007; 35(Database issue): D823-828.

ปรากฏการณ์วิทยาต่อประสบการณ์ของอาจารย์เทคนิคการแพทย์ ในห้องเรียนกลับด้านโดยใช้บทเรียนออนไลน์แบบ Small Private Online Course (SPOC)

พัชรินทร์ ปัญญบุรี¹ เกียรติยศ กุลเดชชัยชาญ² และ สมหญิง โลหะรังสิกุล^{3*}

¹ คณะศึกษาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น

² ศูนย์ความเป็นเลิศด้านการศึกษาวิทยาศาสตร์สุขภาพ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร

³ ภาควิชาชีววิทยาลินคและเทคโนโลยีประยุกต์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร

บทคัดย่อ

ปัจจุบันการจัดการศึกษาระดับอุดมศึกษานิยมใช้ห้องเรียนกลับด้านโดยใช้บทเรียนออนไลน์แบบ small private online course (SPOC) อย่างแพร่หลาย แม้ว่านักเรียนจะชื่นชอบรูปแบบของการเรียนการสอนแบบปฏิรูปนี้แต่ข้อมูลเกี่ยวกับการรับรู้ของอาจารย์ในการเรียนการสอนรูปแบบใหม่นี้ยังมีจำกัด การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจประสบการณ์ของอาจารย์เทคนิคการแพทย์เมื่อนำห้องเรียนกลับด้านโดยใช้บทเรียนออนไลน์แบบ SPOC มาใช้ในการเรียนการสอนหัวข้อ “การตรวจจับปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันและการประยุกต์ใช้” ของรายวิชาภูมิคุ้มกันวิทยาพื้นฐาน สำหรับนักศึกษาเทคนิคการแพทย์ระดับปริญญาตรี คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ด้วยวิธีการทางปรากฏการณ์วิทยา โดยอาจารย์เทคนิคการแพทย์ที่สอนในรายวิชาภูมิคุ้มกันวิทยาพื้นฐาน จำนวน 10 คน ตอบรับเข้าร่วมในการสัมภาษณ์เชิงลึกเป็นรายบุคคล นำบทสัมภาษณ์อาจารย์มาวิเคราะห์โดยผู้ตรวจสอบที่เป็นอิสระต่อกันโดยใช้แนวทางการวิเคราะห์ข้อมูลเชิงคุณภาพด้วยเทคนิคการวิเคราะห์แก่นสาร (thematic analysis) ซึ่งสามารถรายงานปัจจัยหลัก 6 ประการที่เกี่ยวข้องกับประสบการณ์ของอาจารย์เทคนิคการแพทย์ในกระบวนการปฏิรูปการสอนนี้ ได้แก่ 1) แรงจูงใจของการสอน 2) การทำกิจกรรมในชั้นเรียน 3) การประเมินการเรียนรู้แบบรายทางของนักศึกษา 4) การประเมินการเรียนรู้แบบปลายทางของนักศึกษา 5) ผลการเรียนรู้ และ 6) ความยากของการดำเนินการสอน การจัดหมวดหมู่ประสบการณ์ของอาจารย์เทคนิคการแพทย์ที่ชัดเจนนี้อาจช่วยดึงดูดความสนใจในการนำห้องเรียนกลับด้านโดยใช้บทเรียนออนไลน์แบบ SPOC มาประยุกต์ใช้เพิ่มขึ้น และกระตุ้นการสนับสนุนของสถาบันเพื่อปรับปรุงการเรียนการสอนในเทคนิคการแพทย์ศาสตร์ศึกษา

คำสำคัญ: เทคนิคการแพทย์ศาสตร์ศึกษา การรับรู้ของอาจารย์ การเรียนรู้แบบผสมผสาน ห้องเรียนกลับด้าน
โดยใช้บทเรียนออนไลน์แบบ SPOC

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: somying.loh@mahidol.ac.th, somying.loh@mahidol.edu

รับบทความ: 10 พฤษภาคม 2566

แก้ไขบทความ: 1 กรกฎาคม 2566

รับตีพิมพ์บทความ: 17 กรกฎาคม 2566

Phenomenological Approach on Experiences of Medical Technology Teachers in Small Private Online Course (SPOC)-based Flipped Classroom

Patcharin Panjaburee¹, Kaittiyos Kuldejchaichan² and Somying Loharungsikul^{3*}

¹*Faculty of Education, Khon Kaen University, Khon Kaen Province, Thailand*

²*Siriraj Health Science Education Excellence Center, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand*

³*Department of Clinical Microbiology and Applied Technology, Faculty of Medical Technology, Mahidol University, Bangkok, Thailand*

Abstract

Small private online course (SPOC)-based flipped classroom mode has been widely used in higher education. Although students appreciated the reformed teaching curriculum, the information on teachers' perceptions is limited. This study aimed to explore the experiences of Medical Technology (MT) teachers when SPOC-based flipped classroom was first implemented in the topic of detection of immunological reactions and applications in basic immunology course for undergraduate students. Through a phenomenological approach, ten immunological teachers agreed to participate in individual in-depth interviews. The transcriptions of the interviews, as qualitative data, were analyzed by independent reviewers using a thematic analysis approach. Six main factors related to the experiences of MT teachers in the process of reformed teaching were reported, including 1) Motivation, 2) In-class activities, 3) Formative assessment, 4) Summative assessment, 5) Learning outcomes, and 6) Difficulty of teaching. These elucidating categories might draw more attention to further SPOC-based flipped classroom applications and stimulate institutional support to improve teaching and learning in Medical Technology education.

Keywords: Medical technology education, Teacher perception, Blended learning, SPOC-based flipped classroom

*Corresponding author E-mail address: somying.loh@mahidol.ac.th, somying.loh@mahidol.edu

Received: 10 May 2023

Revised: 1 July 2023

Accepted: 17 July 2023

Introduction

Traditional classrooms in healthcare education have progressively shifted towards a blended learning model.⁽¹⁻²⁾ The most famous type is flipped classroom, in which pre-class learning materials such as videos, e-learning, and lecture notes are provided for self-learning. Students must complete their knowledge before connecting to face-to-face classes for more active learning strategies using reflection, problem-based discussion, or case-solving.⁽³⁻⁴⁾ Medical students had high satisfaction and gained an increase in academic achievement when flipped classrooms were implemented in the studies of gynaecologic oncology, ophthalmology, endocrinology, radiology, and physiology.^(1,2,5-7) Most students strongly agreed that this learning method leads to pleasure in learning and flexibility to motivate their education, enhance communication skills, and improve clinical thinking compared to conventional classroom teaching.⁽⁶⁻⁸⁾ Additionally, some students perceived that the flipped classroom approach could enhance their lifelong self-directed learning skills compared to traditional lectures.⁽⁹⁾

Since a small private online course (SPOC) is well-established as an online educational platform, the SPOC teaching mode is designed in a particular scope for a specific audience and therefore has a greater capacity to adapt to the interested needs.⁽¹⁰⁻¹¹⁾ Normally, students access online videos or learning

materials within the SPOCs under the guidance of teachers and then participate in classroom discussions and problem-solving activities. This specific characteristic allows SPOC to be a widely accessible tool for autonomous learning, which can reduce students' high drop-off rate within the first week of the course.⁽¹²⁾ In medical education, SPOC is commonly used to support the blended learning model of the flipped classroom. Medical students access online videos and reading materials in the SPOC and contribute effectively to in-class activities.^(10,13) Post-graduate medical educators largely give positive feedback when using SPOC video technology and web conferencing software for integrated case conferences and in-depth neuroscience discussions across diverse locations in psychiatry training programs.⁽¹⁴⁾ Additionally, the SPOC-based flipped classroom mode implemented in the physiology course demonstrated learning efficiency and fostered a deep understanding of knowledge for clinical undergraduate students. This was reflected in higher examination scores compared to students engaged in lecture-based learning. The significant difference in their scores can be attributed to the SPOC model's video-based preview.⁽¹⁵⁾ Notably, the powerful application of SPOC-based flipped classrooms was seen in such enhancements of learning outcomes among undergraduate medical students in oral histopathology learning during the COVID-19 pandemic. Both students and

teachers expressed a positive reception towards this reform class and perceived it as improving self-directed learning while fostering an active atmosphere with deep participation.⁽¹⁶⁾

In medical technology education, technology-enhanced education has been recently reported. Medical technology students who participated in blended medical laboratory courses could improve their self-learning capacity and understanding of the underlying theories and problem-solving rather than traditional classroom teaching. The achievement of their knowledge goals was significantly seen in the average scores on laboratory quizzes.⁽¹⁷⁾ The flipped classroom strategy also encouraged the learning capacity of medical technology students and provided positive interaction for students to have high-order thinking in evidence-based medicine training compared to traditional classrooms.⁽¹⁸⁾ Furthermore, SPOC-based flipped classroom modules showed good effectiveness in clinical hematology laboratory teaching, as they enhanced medical technology students' confidence in their professional theories and practical skills. Most medical technology students showed positive attitudes and views on the reform class.⁽¹⁹⁾ SPOC based flipped classroom method also improved students' knowledge of immunology reactions and applications by significantly increasing the overall scores on both the mid- and post-conceptual tests among undergraduate medical technology students. The results revealed that

a greater interest and enjoyment, coupled with reduced anxiety in this reform course, could encourage students to connect the topic with their future careers.⁽²⁰⁾

Although medical students have a strongly positive perception of the SPOC-based flipped classroom pedagogy^(15, 21), investigating teachers' perception and understanding of this reform teaching process is also important. Evidence shows that the role of teachers must be transformed into that of facilitators, mentors and designers of students' learning, which is always a challenge for educators.^(8, 22) Most teachers recognize that reform teaching has the potential to contribute to classroom interactions, leading to more active learning, higher order thinking, and improved student performance.⁽²³⁻²⁴⁾ This phenomenon is further supported by teachers' perspective on their effective position in educational reform teaching, which has a positive impact on students' learning objectives.⁽²⁵⁾ The consolidated view from teachers is to utilize classroom time effectively for problem-solving activities, discussions, and engaging lesson delivery.⁽²⁶⁾ Collectively, teachers' experience indicates that modern practices such as teamwork and class discussions are strongly associated with better students' learning achievements, as compared to a traditional practices like rote learning and individual work.⁽²³⁻²⁶⁾ Even though teachers have a positive attitude towards the flipped classroom, they still express concerns about

their competency in designing flipped learning, difficulties in pre-class and in-class activities, and technology-supported education.⁽²⁷⁻²⁸⁾ Therefore, it is important to conduct in-depth interviews to investigate the exact factors influencing teachers' experiences and perceptions during reform teaching.

Due to the benefits of SPOC, it is widely combined with flipped classrooms. As a result, there has been a growing interest in the application of SPOC-based flipped classrooms in Thailand. Unfortunately, there is no information focused on the experience and perspective of medical technology teachers in SPOC-based flipped classroom pedagogy practice. To understand the lived experiences of teachers in the potential of this particular reform setting, a phenomenological approach as one of the qualitative research methods is often used based on in-depth interviews.⁽²⁹⁻³⁰⁾ Hence, this study aimed to explore the experiences of medical technology teachers in adapting SPOC-based flipped classroom modules in immunology studies through a phenomenological approach. The results of this study can provide valuable information for medical technology teachers interested in designing reform pedagogy.

Materials and Methods

1. Study design

Descriptive phenomenological research was conducted in this study to understand the

experiences and perspectives of medical technology teachers who were the first to participate in the SPOC-based flipped classroom teaching method on the topic of immunological reactions and applications in a basic immunology course at the Faculty of Medical Technology, Mahidol University in Thailand. A semi-structured interview guide, predominantly consisting of open-ended questions, was created and utilized to conduct interviews with medical technology teachers. The interviews aimed to investigate the benefits and obstacles associated with this pedagogical approach.

2. Participants and settings

The instructional design of the SPOC-based flipped classroom was developed from May to June 2020. It involved self-directed learning on the SPOC platform and face-to-face teaching activities in the classroom (Fig. 1). The SPOC platform was created within the online university settings, accessible via <https://mux.mahidol.ac.th/courses/course-v1:MU-MT+MTMI307+2019/course/>. To organize the pre-class tasks, medical technology students enrolled in the SPOC course using their individual MU login and were required to complete a pre-test. Students could structure their learning process in the SPOC course by watching infographic videos, reading teaching documents, and completing post-tests related to the learning content in each topic. During

SPOC learning, teachers would release the teaching plan one week in advance to communicate the learning objectives and facilitate effective self-learning. In classroom teaching time, all students were randomly divided into groups and engaged in face-to-face laboratory activities with teachers (student-to-teacher ratio = 10:1 in each group). Each group was assigned a question for discussion. The teachers acted as organizers and facilitators of learning, guiding students to find answers to problems on their own and inspiring their enthusiasm for information. The post-test in SPOC course and the in-class observation by teachers served as representative formative assessments. The extension of students' abilities after the SPOC-based flipped classroom module was evaluated using the course examination, which represented

a summative assessment. After the reformed teaching was completed, ten medical technology teachers responsible for the basic immunology courses were invited to participate in an in-depth interview. All participants had no previous training experience and practice in the SPOC-based flipped classroom method, and their individual characteristics are shown in Table 1. The participants were informed about the purpose of the interview, and measures were taken to ensure their anonymity and confidentiality. Subsequently, each participant signed the informed consent form and willingly participated in collecting data without compensation. The study was approved by the Central Institutional Review Board Ethics Committee of Mahidol University (MU-CIRB 2019/158.0710).

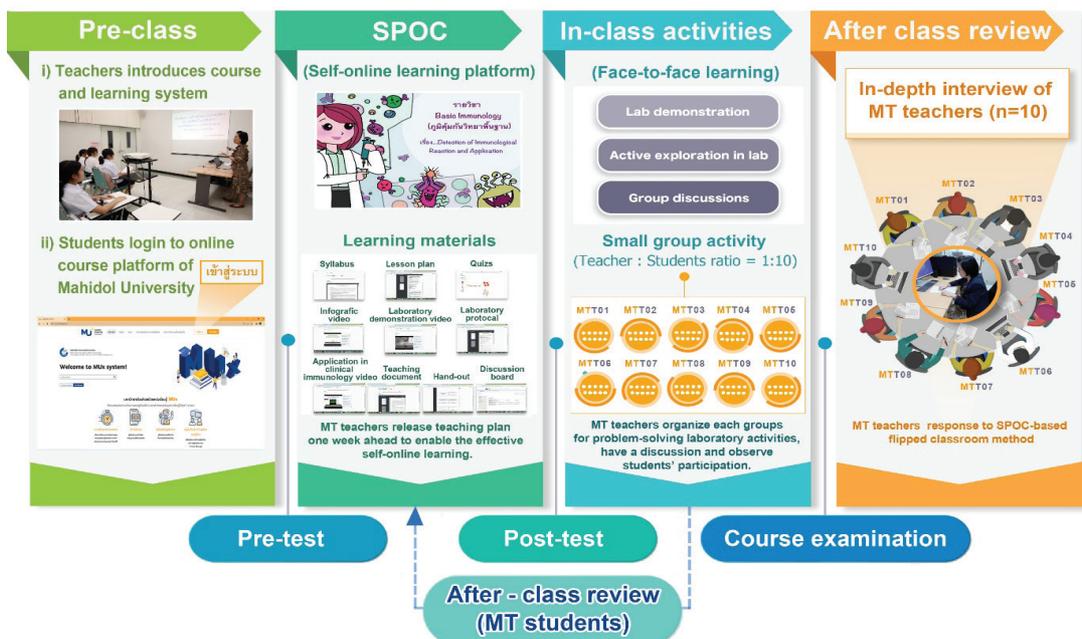


Fig. 1 Instructional design of SPOC-based flipped classroom.

Table 1 Characteristics of participants.

Participants	Sex	Age (Year)	Position	Educational Background	Teaching Experience (Year)
A	F	48	Assistant professor	Medicine	16
B	F	35	Lecturer	Biomedical Science	5
C	M	40	Associate professor	Medical Technology	11
D	F	40	Associate professor	Medical Technology	10
E	M	39	Lecturer	Biomedical Science	3
F	F	30	Lecturer	Immunology	1
G	F	44	Assistant professor	Medical Technology	22
H	F	38	Lecturer	Health Biology	2
I	M	33	Lecturer	Medical Technology	1
J	F	34	Lecturer	Immunology	2

M; Male, F; Female

3. Data collection and analysis

Qualitative data were collected through a semi-structured interview guide with a preponderance of open-ended questions. The designed questions were guided by Park *et al.*⁽²⁷⁾, as provided in Table 2. During the interviews, individual participants shared their experiences and perceptions regarding the implementation of the SPOC-based flipped classroom. Each interview lasted approximately 60 minutes. All interviews were transcribed and assigned a sequential number. When additional data were needed, it was collected by phone. For data analysis, the transcribed interviews were analyzed using a thematic

analysis approach.⁽³¹⁾ Firstly, the authors (SL and KK) individually read the data several times to better understand it and generated their own initial codes. Next, the authors searched for patterns and themes emerging from the codes and data. The codes were compared together, and any code that did not match was eliminated. Then, the themes were independently reviewed by each author (SL, KK, and PP) to reach investigator triangulation. The authors engaged in discussions to define and label the themes, aiming to reach a consensus agreement. Finally, all data and initial themes were revisited to ensure that they provided an authentic experience of the current teaching.

Table 2 Example of medical technology teachers interview questions.

1) What were motivations for SPOC based flipped classroom?
2) What did you learn from SPOC based flipped classroom including prerequisite learning, class activities, and formative and summative assessment?
3) Please explain what you experienced with SPOC based flipped classroom?
4) Please explain what were the difficulties in SPOC based flipped classroom?

Results

After completing the interviews and thematic analysis, six overarching themes of the participants' experiences in SPOC-based flipped classroom emerged: Motivation,

In-class activities, Formative assessment, Summative assessment, Learning outcomes, and Difficulties of teaching. The categories and codes in each theme are elaborated in Fig. 2.

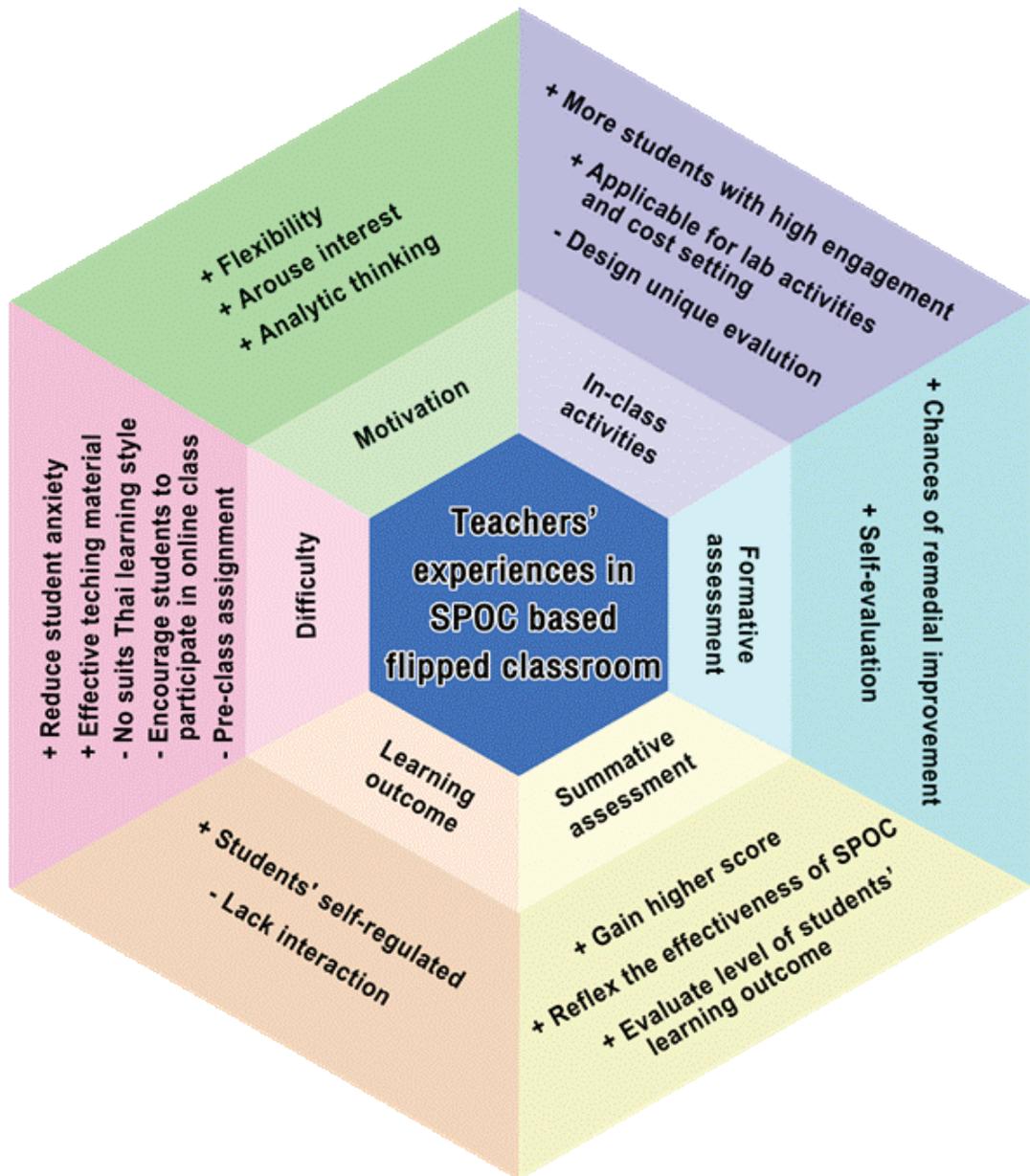


Fig. 2 Categories and themes of medical technology teachers' experiences in SPOC-based flipped classroom.

Motivation to use the SPOC based flipped classroom approach for supporting students' learning

All participants perceived that the SPOC-based flipped classroom approach created an effective learning environment for understanding and applying immunological reactions in a basic immunology course. This approach allowed students to organize their learning pace flexibly, anytime and anywhere, using the SPOC platform. Additionally, the well-prepared content on the SPOC, particularly the online videos, enhanced students' learning abilities and performance. After their self-active learning and having the fundamental knowledge, students could develop their analytical thinking skills and enjoy the in-class laboratory session. One of the interviewed Medical Technology Teachers (MTT) stated:

“Our intention was to design the SPOC online lessons following the “simple and practical” principle. This approach allowed our MT students to attentively acquire knowledge step-by-step, starting from the basic principles and progressing to test procedures, results, interpretations, and clinical applications in immunology. They had no restrictions to access the SPOC lesson until they reached their understanding” (MTT 06).

Another MTT stated that *“the SPOC-based flipped classroom helped my students learn by themselves; students were more*

enthusiastic and gained better analytical thinking processes” (MTT 04).

In-class activities after implementing the SPOC-based flipped classroom

All participants described the benefits of SPOC-based flipped classroom in terms of high performance of in-class laboratory activities. Well-prepared students have the basic knowledge to grasp concrete information, increase their learning efficacy, and are more engaged in activities or laboratory demonstrations. This approach enables more students to enjoy in-class learning and application. As one of the Medical Technology Teachers (MTT) mentioned,

“Since all of them are aware of their participation in the class, they possess a deep understanding of the topic being studied here. They learn how to solve the question and make a discussion. When students enjoyed the face-to-face activities, my class was easy to organize and went so fast. I thought that it is impossible if they do not succeed in their understanding of the contents before” (MTT 08).

In addition, one participant mentioned about the cost of laboratory setting that could be substituted by this reform andragogy. Adults have problem-centered approach for mastery that could be immediately reflected in the application of learning in real life. By engaging in SPOC VDO learning beforehand, students can gain a better understanding of essential

knowledge and minimize errors in the use of reagents and procedures during in-class laboratory activities.

“I agreed with implementing the SPOC-based flipped classroom model because it could encourage students’ learning in special immunological testing that needs particular preparations such as procedures, reagents, and special equipments. Having online videos on the SPOC platform, students would catch up on the essential contents and procedure of special technique, and then achieve it in the in-class activities” (MTT 09).

However, one participant suggested that well-organized in-class activities enhanced students’ learning. MT teachers should develop a unique learning assessment for in-class activities to achieve the course learning outcomes for laboratory sessions.

“I felt that I am able to organize my classroom activities to enhance students’ learning effectively. However, we should have a special evaluation emphasizing students’ learning assessment for in-class laboratory activities to effectively meet the course learning outcomes for laboratory sessions” (MTT 05).

Formative assessment in the SPOC

The SPOC platform was designed to cater to undergraduate medical technology students, providing them with essential knowledge and conceptual tests related to the detection of

immunological reactions and their applications. All participants perceived that having formative assessments freed students for their self-evaluation and provided opportunities for remedial self-improvement. If comprehensive sessions were missed, students could correct their confusion before taking the course examination. As one Medical Technology Teacher (MTT) mentioned,

“When individual students have self-active learning by watching online videos and reading documents via the SPOC platform, they gain fundamental knowledge and can evaluate themselves via pre- and post-tests provided in each topic. This self-assessment may reflect their learning performance and outcomes before having the actual course examination” (MTT 03).

Summative assessment after implementing the SPOC-based flipped classroom

Summative assessment is still necessary for evaluating the effectiveness of the SPOC-based flipped classroom approach. The effectiveness of SPOC is evident in medical technology students who possess a solid knowledge base, as they are able to achieve higher scores in examinations and demonstrate higher-order thinking skills in this specific topic. Likewise, teachers have the ability to assess the increase in student learning outcomes and analyze the success of their reformed teaching pedagogy. As Medical Technology

Teacher (MTT) described it,

“I realized that summative assessments, such as post-test, allow teachers to assess students’ learning outcomes. If students are able to meet the criteria of these assessments, it indicates the effectiveness of the learning materials in SPOC. However, if students do not meet the criteria, teachers should further improve and develop the lessons to assist students in achieving the course learning outcomes” (MTT 09).

“Summative assessment allows us to evaluate that our students have a better understanding and knowledge of certain topics, reflected by higher scores in the course examinations” (MTT 04).

Perceptions toward students’ learning outcomes

Almost all participants (8 of 10) recognized that the initial implementation of the SPOC-based flipped classroom enhanced students’ performance in the knowledge of immunological laboratory testing. Having the SPOC platform as a self-paced online learning tool can help students practice self-regulated learning. Students who prepare themselves before joining in-class activities as active learners can build their competence, learn more quickly, and synchronize their knowledge with tasks related to medical technology careers.

As Medical Technology Teacher (MTT) mentioned,

“I noticed that some students watched the SPOC videos in advance, while others did not. Those who agreed to watch the videos beforehand had questions that could be used as an assessment to determine their level of preparation before attending the face-to-face laboratory sessions. A well-prepared student has relevant knowledge that I can build upon during in-class learning” (MTT 04).

“If students manage their time effectively, they can learn the SPOC online lessons by themselves. After gaining knowledge, they have more time to complete the in-class activities” (MTT 05).

However, other participants (2 of 10) expressed concerns about the passive interaction of the SPOC online learning platform, as students had to engage in self-study. They noticed that students with different backgrounds require active participation in discussions and asking questions. As one Medical Technology Teacher (MTT) pointed out,

“Some students in my groups were not successful in actively learning via the SPOC platform. They forgot their knowledge, and I had to repeat the explanation before continuing the in-class activities” (MTT 02).

Another MTT noted that *“Some students were not familiar with online learning. While studying online, they still needed a teacher to answer their questions or have real-time active participation. This lack of*

understanding made it difficult to lead the in-class activities. Thus, I had to review the material again” (MTT 10).

Difficulties in using the SPOC-based flipped classroom

Although medical technology teachers accepted the benefit of SPOC-based flipped classroom in immunology learning environments, difficulties had been found. Almost all participants (8 of 10) mentioned that it is hard to encourage students to complete the pre-class assignment or participate in all SPOC online sessions. Active students, who had self-learning via SPOC’s online videos, effectively participated in the in-class activities and showed stellar performance. However, students, who did not engage in pre-class preparation, might remain passive during the in-class activities. The complexity of the immunology contents and management of their self-learning time are also challenges for MT students. As one participant expressed concern,

“The most challenging aspect of implementing the SPOC-based flipped classrooms is fostering students’ interest in self-learning platforms like SPOC. They have the potential to gain more knowledge and understanding if they engage in pre-tests, learn the video contents, and complete post-tests for each lesson. In our group, I rely on their cooperation and responsibility. However, I observed that some students

struggled with the critical questions, while others excelled in interactive questions. The main issue was that some students did not study the lesson beforehand, resulting in a lack of basic knowledge required to discuss the questions effectively. Some students also expressed frustration with the complexity of immunological content, which hindered their progress in self-study” (MTT 07).

Likewise, the teachers’ role was changed as an accelerator or guide to stimulate classroom participation in this particular mode. However, one participant complained that this reform teaching is not suitable for Thai student behavior. The teacher realized that motivating passive students to turn into an active mode in classroom participation could make their learning more enjoyable.

“When I posed questions during my class activities, there would be moments of silence before someone answered. I tried to motivate them to engage in the class. It can be challenging to sustain active learning when Thai students tend to be shy in their nature. After their participation in the class, it was difficult for me to gauge their level of knowledge” (MTT 01).

Additionally, one participant noted that the SPOC-based flipped classroom was technologically transformative. The provision of high-quality learning material could potentially alleviate student anxiety in immunology learning. Preparation of effective online teach-

ing materials is difficult because it requires the necessary skills and is time-consuming to produce all the content. However, our teachers' team was less proficient in educational technology or video content production.

“Among our team teachers, I am the youngest lecturer. I have less experience teaching and creating powerful online videos that are qualified in basic knowledge and easy for students to follow their immunology contents” (MTT 09).

Discussions

Since the combination of SPOC and flipped classrooms are setting off a trend in teaching reform of medical education, recently, Mahidol University has supported the development and implementation of SPOC across multiple learning settings via <https://mux.mahidol.ac.th>. Hence, we have initially introduced a SPOC-based flipped classroom curriculum for the detection of immunological reactions and their applications in the basic immunology course. This is because having a strong foundational knowledge of this topic is crucial for students to perform effectively in clinical laboratory testing. Although medical technology teachers who participated in this study had various educational backgrounds and durations of teaching experience, no significant differences were found in their perspectives when implementing the SPOC-based flipped classroom method. This lack of difference may

be attributed to their lack of previous training and practice in this particular approach. Despite the limitation of a small number of medical technology teachers participating in this study (n = 10), we were able to gain initial insights into the experiences of medical technology teachers when applying the SPOC-based flipped classroom pedagogy to undergraduate students in the study of immunology. Factors identified here, including motivation, in-class activities, learning evaluation (formative and summative assessment), learning outcome, and difficulties of teaching, could be helpful for further SPOC-based flipped classroom implementation in medical technology education.

In this study, all medical technology teachers agreed on one point: that this reformed teaching mode motivated students' learning in the topic of detection of immunological reactions and applications, in terms of flexibility, interest, and analytical thinking. It may be due to the fact that SPOC platform eliminates the time and space limitations of the traditional teaching model, providing rich learning materials for students to communicate and collaborate anytime and anywhere, creating an open educational environment, and combining the advantages of online courses and face-to-face teaching, which also provides a strong guarantee of flipped classroom knowledge acquisition.⁽¹⁶⁾ In addition, our SPOC platform included pre- and post-test that served as formative assessments to foster individual

learning capacity. Students were required to apply the essential knowledge acquired from the SPOC learning materials in order to complete tasks during in-class learning activities. This approach demonstrated a large effect size and allowed students to actively engage in the flipped classroom perspective.⁽³²⁾ This phenomenon is also supported by recent findings on the SPOC-based flipped classroom approach in clinical hematology courses for undergraduate clinical laboratory technology students⁽¹⁹⁾ and medical immunology studies for medical students.⁽³³⁾ Interestingly, adopting the SPOC-based flipped classroom for immunology courses could reduce the cost of laboratory settings for special tests and was more applicable for laboratory teaching by increasing students knowledge with high engagement in the in-class activities. These findings confirm the underlying theory of blended learning, which combines technological innovation with face-to-face teaching to enhance students' learning processes and outcomes. This suggests that the implementation of SPOC followed by face-to-face learning may facilitate a deeper exploration of course content.⁽³³⁾ Previous research has indicated that the theoretical foundation of blended learning in higher education involves online lessons followed by active learning activities in the classroom, which can encourage Thai students to develop self-regulation behaviors in their learning.⁽³⁴⁾

Although a positive effect on learning

outcomes was found during the reform teaching mode, self-regulated students during active learning via SPOC online, while lacking interaction or communication with the teacher, was observed in this study. It might be due to the promotion of intrinsic regulation and self-determination levels of the students to complete their online sessions before having in-class activities. The self-determination theory supports this observation and explains that the learning environment influences the autonomy motivation to satisfy basic education needs.⁽³⁵⁾ Previously, high autonomy motivation of students was promoted by SPOC-based flipped classroom teaching in physical education by improving the need for competence, autonomy, and relatedness of individuals.⁽³⁶⁾

Assessment is an important tool for monitoring progress toward achieving learning objectives for both teachers and students.⁽³⁷⁾ This study employed formative assessment to evaluate student comprehension during SPOC lessons in immunology studies. Self-evaluation with low stakes allows students to improve their learning efficacy and develop their fundamental knowledge and understanding before attempting the in-class activities. Summative assessment, on the other hand, evaluates students' learning performance and outcomes before the actual course examination or the conclusion of the instructional period. The SPOC platform with related learning materials, particularly simple and practical online videos, likely augmented

students learning, as reflected in the use of formative assessment in this study. In addition, the face-to-face in-class learning activities emphasized laboratory demonstrations, active exploration in the laboratory, and group discussions. These activities strengthened the foundation built by the SPOC and facilitated the completion of tasks in the laboratory. The improvement in students' knowledge of the course content was significant, as seen in the summative assessment in this study. This knowledge of the detection of immunological reactions and applications from the learning materials provided in SPOC to complete in-class tasks was thus introduced in the SPOC-based flipped classroom process. This result aligns with previous findings on the flipped classroom perspective.⁽³⁸⁾ Additionally, since this was the first implementation of SPOC-based flipped classroom module in our faculty and we were not familiar with this reform teaching approach, we designed the SPOC platform specifically for medical technology students to cater to their individual interests and needs. The in-class learning activities placed a strong emphasis on active laboratory investigations, requiring students to apply the foundational knowledge gained from the SPOC materials in order to successfully perform and complete tasks in the laboratory environment. It is worth considering the generation of specific laboratory assessments tailored for in-class activities to further enhance the effectiveness of their application.

Interestingly, inspiring students to participate in online classes or complete the pre-class assignment was identified as a challenge in the teaching reform discussed in this study. One possible explanation is the complexity of delivering immunology content to students with varying backgrounds, making it difficult for individual students to master the subject. Analyzing students' learning performance and their study workload prior to the course would be even more beneficial in improving learning outcomes and fostering student motivation to enjoy the study of immunology. Consequently, teachers need to have a real-time understanding of students' difficulties with SPOC videos in order to better address the challenges and key points of the course. Recent findings suggest an approach to cluster SPOC videos based on their difficulty using video-watching data in a SPOC.⁽³⁹⁾ However, the current study did not perform a difficulty-based clustering analysis of SPOC online videos. Further research could involve real-time data analysis based on existing video-watching data of students, data from different course lessons, and data from various published periods when SPOC-based flipped classrooms will be continuously implemented. It is important to note that this study only assessed the results of a university immunology course.

There are some concerns about the application of SPOC-based flipped classrooms.

Firstly, most Thai students are not familiar with self-online learning and tend to be shy about asking questions in class. To address this issue, we conducted an orientation session for this specific reform teaching approach prior to starting the topic of detection of immunological reactions and applications in the basic immunology course. During this orientation, students were instructed on how to access the SPOC platform, prepare themselves, manage their time for self-directed online learning, and retain the core knowledge for face-to-face classroom activities. The study also provided various learning materials on the SPOC platform appropriate for active learning and divided students into small groups during the face-to-face learning portion to encourage their active exploration of laboratory demonstrations (students: lecturer ratio = 10:1). This character could motivate them to participate in the discussion and problem-solving in the in-class learning activity, as successfully demonstrated in the application of SPOC and team-based learning for dermatology and venereology studies.⁽⁴⁰⁾ Secondly, the MT teachers in this study had different ideas on how SPOC-based flipped classrooms should be conducted and implemented. They were all unsure about how to teach and verify the validity of the reform teaching model. For a more effective implementation, it would have been beneficial for the teacher team to have introduced and prepared themselves with a concrete agreement

on the teaching approach. To address this issue, teacher orientation sessions were conducted, and a unique evaluation form was generated for both online and in-class sessions. These measures were important for assessing the usefulness of the reform pedagogy and establishing a foundation for further study. Despite these challenges, implementing a SPOC-based flipped classroom in this study provided an opportunity to produce effective learning materials that could complete the course learning outcomes and reduce students' anxiety. The results of this study may draw more attention to SPOC-based flipped classrooms and stimulate educational and institutional support for sustainable improvements in teaching and learning for medical technology schools.

Conclusion

Using a phenomenological approach, this study aimed to explore the experiences of medical technology teachers during the implementation of SPOC-based flipped classrooms in the basic immunology course for undergraduate medical technology students, focusing on the detection of immunological reactions and their applications. The results of this study revealed several categories of experience perceived by the medical technology teachers, including 1) motivation of students' learning, 2) enhanced learning outcomes, 3) increased engagement in in-class activities,

4) suitability for laboratory activities and cost reduction, 5) active self-evaluation through knowledge assessment, 6) the opportunity to produce effective learning materials. However, difficulties were also identified in inspiring students to participate in online classes or complete pre-class assignments. The findings of this study may draw attention to the potential benefits of SPOC-based flipped classrooms and encourage educational and institutional support to improve teaching and learning in medical technology schools.

Acknowledgements

The authors thank the medical technology students who participated in this study and the immunology team lecturers for their support. Special thanks goes to Asst. Prof. Chaniya Leepiyasakulchai for providing guidance and support during the course-related implementation. The authors also thank Assoc. Prof. Khajornsak Buaraphan for his valuable advice on data analysis.

References

1. Morgan H, McLean K, Chapman C, Fitzgerald J, Yousuf A, Hammoud M. The flipped classroom for medical students. *Clin Teach* 2015; 12: 155-60.
2. Chowdhury TA, Khan H, Druce MR, *et al.* Flipped learning: turning medical education upside down. *Future Healthc J* 2019; 6: 192-5.
3. Fatima SS, Arain FM, Enam SA. Flipped classroom instructional approach in undergraduate medical education. *Pak J Med Sci* 2017; 33: 1424-8.
4. French H, Arias-Shah A, Gisondo C, Gray MM. Perspectives: the flipped classroom in graduate medical education. *Neoreviews* 2020; 21: e150-6.
5. Tang F, Chen C, Zhu Y, *et al.* Comparison between flipped classroom and lecture-based classroom in ophthalmology clerkship. *Med Educ Online* 2017; 22: 1395679.
6. Vavasseur A, Muscari F, Meyrignac O, *et al.* Blended learning of radiology improves medical students' performance, satisfaction, and engagement. *Insights Imaging* 2020; 11: 61.
7. Suryawanshi MK, Raut SE. Use of flipped classroom as teaching learning method in physiology. *J Med Allied Sci* 2021; 11: 40-4.
8. Hurtubise L, Hall E, Sheridan L, Han H. The flipped classroom in medical education: engaging students to build competency. *J Med Educ Curric* 2015; 2: 35-43.
9. Ramnanan CJ, Pound LD. Advances in medical education and practice: student perceptions of the flipped classroom. *Adv Med Educ Pract* 2017; 8: 63-73.

10. Wang XH, Wang JP, Wen FJ, Wang Jun, Tao JQ. Exploration and practice of blended teaching model based flipped classroom and SPOC in higher university. *J Educ Pract* 2016; 7: 99-104.
11. Ruiz-Palmero J, Fernández-Lacorte JM, Sánchez-Rivas E, Colomo-Magaña E. The implementation of small private online courses (SPOC) as a new approach to education. *Int J Educ Technol High Educ* 2020; 17: 27.
12. Lei C, Hou X, Kwok T, *et al.* Advancing MOOC and SPOC development via a learner decision journey analytic framework [monograph on the Internet]. IEEE publisher; 2015 [cited 2023 Jan 10]. Available from: <https://ieeexplore.ieee.org/document/7386034>.
13. Zhou J, Yu H, Chen B, Mai C, Yu L. The construction of teaching interaction platform and teaching practice based on SPOC mode [monograph on the Internet]. IEEE Publisher; 2016 [cited 2023 Dec 25]. Available from: <https://ieeexplore.ieee.org/document/7581596>.
14. Lockhart BJ, Capurso NA, Chase I, *et al.* The use of a small private online course to allow educators to share teaching resources across diverse sites: the future of psychiatric case conferences?. *Acad Psychiatry* 2017; 41: 81-5.
15. Zhang XM, Yu JY, Yang Y, Feng CP, Lyu J, Xu SL. A flipped classroom method based on a small private online course in physiology. *Adv Physiol Educ* 2019; 43: 345-9.
16. Wang S, Xu X, Li F, Fan H, Zhao E, Bai J. Effects of modified BOPPPS-based SPOC and flipped class on 5th-year undergraduate oral histopathology learning in china during COVID-19. *BMC Med Educ* 2021; 21: 540.
17. Chen J, Zhou J, Wang Y, *et al.* Blended learning in basic medical laboratory courses improves medical students' abilities in self-learning, understanding, and problem solving. *Adv Physiol Educ* 2020; 44: 9-14.
18. Huang HL, Chou CP, Leu S, You HL, Tiao MM, Chen CH. Effects of a quasi-experimental study of using flipped classroom approach to teach evidence-based medicine to medical technology students. *BMC Med Educ* 2020; 20: 31.
19. Cong D, Xiaoyan D, Meishuang L, Qiang Z. Application of the flipped classroom teaching mode based on small private online course on laboratory test of clinical hematology. *Chin J Med Edu* 2021; 41: 407-11.

20. Loharungsikul S, Eumbunnapong K, Nilsook P, Panjaburee P. Small private online course based flipped classroom approach for supporting undergraduate medical technology students on immunology study. Research square [serial on the Internet]. 2022 Jan [cited 2023 Jun 16]. Available from: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1210422/v1>.
21. Kastrati Z, Kurti A, Hagelback J. The effect of a flipped classroom in a SPOC: students' perceptions and attitudes. ICETC [serial on the Internet]. 2019 Oct [cited 2023 Jan 10]. Available from: <https://doi.org/10.1145/3369255.336930>.
22. Abuhmaid AM. Teachers' perceptions on the impact of flipped learning on student learning and teacher's role in jordanian schools. *Univers J Educ Res* 2020; 8: 1007-16.
23. Gough E, DeJong D, Grundmeyer T, Baron M. K-12 teacher perceptions regarding the flipped classroom model for teaching and learning. *J Educ Technol Syst* 2017; 45: 390-423.
24. Alam A, Khurshid F, Alam T. Students' and teachers' perceptions about the flipped classroom instructional strategy in pakistan. *Int J Manag* 2020; 11: 1908-21.
25. Fan X. Teachers' perspectives on the evaluation of teacher effectiveness: a focus on student learning objectives. *Teach Teach Educ* 2022; 110: 103604.
26. Bibi H, Kader A. Teacher perception on the potential of flipped classroom pedagogical practice in enhancing classroom interactions in Singapore primary classrooms. *Learn Res Pract* 2020; 6: 137-49.
27. Park KH, Park KH, Chae SJ. Experiences of medical teaches in flipped learning of medical students: a phenomenological study. *Korean J Med Educ* 2018; 30: 91-100.
28. Yadav A, Sankhla M, Yadav K. Teachers' perception about flipped classroom in era of COVID-19 pandemic. *Stud Learn Teach* 2021; 2: 26-34.
29. Lombard M, Poropat A, Alldridge L, Rogers GD. How can the perceptions and experiences of medical educator stakeholders inform selection into medicine? an interpretative phenomenological pilot study [monograph on the Internet]. Medical Education Publish; 2018 [cited 2023 Feb 1]. Available from: <https://mededpublish.org/articles/7-282>.
30. Reeson MG. Phenomenological research in health professions education: methods, data collection and analysis. *Ann Dent Oral Health* 2020; 3: 1013.
31. Kiger ME, Varpio L. Thematic analysis of qualitative data: AMEE guide no. 131. *Med Teach* 2020; 42: 846-54.

32. Lai CL, Hwang GJ. A self-regulated flipped classroom approach to improving students' learning performance in a mathematics course. *Comput Educ* 2016; 100: 126-40.
33. Pang H, Li S, Wang J, Zhang Y, Li L. Relying on the SPOC platform to flipping medical immunology classroom teaching. *Chin J Med Edu* 2018; 17: 1219-23.
34. Lerdpornkulrat T. Analyzing Student Learning Behavior in a blended-learning environment in Thai higher education. *J New Horizon in Higher Edu* 2023; 1: 38-46.
35. Cate OT, Kusurkar RA, Williams GC. How self-determination theory can assist our understanding of the teaching and learning processes in medical education. *AMEE Guide No. 59. Med Teach* 2011; 33: 961-73.
36. Hu T, Zhang M, Liu H, *et al.* The influence of "small private online course + flipped classroom" teaching on physical education students' learning motivation from the perspective of self-determination theory. *Front Psychol* 2022; 13: 938426.
37. Wing TJ, Koster MS, Haan LH. Formative assessment in health care education. *IJESS* 2014; 1: 32-7.
38. Srisuwan C, Panjaburee P. Implementation of flipped classroom with personalized ubiquitous learning support system to promote the university student performance of information literacy. *Int J Mob Learn Organ* 2020; 14: 398-424.
39. Feng Z, Liu C. Difficulty-based SPOC video clustering using video-watching data. *IEICE Trans Inf Syst* 2021; E104D: 430-40.
40. Zeng J, Liu L, Tong X, *et al.* Application of blended teaching model based on SPOC and TBL in dermatology and venereology. *BMC Med Educ* 2021; 21: 606.

การพัฒนาและตรวจสอบคุณภาพเชิงจิตวิทยาของแบบสอบถาม ความรู้และทัศนคติที่มีต่อภาวะลงโควิด

ปวเรศ อ่อนทอง^{1*} อรวรรณ บุญมาเกิด¹ และ สุธินันท์ จันทร์²

¹ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ชุมชน คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล จังหวัดนครปฐม

²สาขากิจกรรมบำบัด คณะกายภาพบำบัด มหาวิทยาลัยมหิดล จังหวัดนครปฐม

บทคัดย่อ

ปัจจุบันผลกระทบของภาวะลงโควิดเพิ่มขึ้นทั่วโลก อาการของลงโควิดมีความหลากหลาย และกลไกทางพยาธิวิทยายังไม่เป็นที่เข้าใจดีนัก ดังนั้นการประเมินความรู้ และทัศนคติของบุคคลที่มีต่อภาวะลงโควิดจึงเป็นสิ่งสำคัญ จุดมุ่งหมายของงานวิจัยนี้คือการสร้างและตรวจสอบแบบสอบถามประเมินความรู้ และทัศนคติที่มีต่อภาวะลงโควิด ประกอบด้วย ส่วนความรู้ 14 ข้อ และทัศนคติ 6 ข้อ ซึ่งได้รับการตรวจสอบความตรงเชิงเนื้อหาของแบบสอบถามโดยผู้เชี่ยวชาญ จากนั้นคัดเลือกผู้เข้าร่วมวิจัยที่มีสุขภาพดี อายุระหว่าง 18-60 ปี จำนวน 30 คน เพื่อประเมินความสอดคล้องภายใน และความเที่ยงภายในผู้ประเมิน ผลการวิจัยพบว่าดัชนีความตรงเชิงเนื้อหารายข้อ (I-CVI) และดัชนีความตรงเชิงเนื้อหาทั้งฉบับ (S-CVI) เป็นที่ยอมรับ (≥ 0.8 และ 0.91 ตามลำดับ) ความสอดคล้องภายในส่วนทัศนคติของแบบสอบถามอยู่ในระดับดี (Cronbach's alpha = 0.82) และความเที่ยงภายในผู้ประเมินส่วนความรู้อยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ (percent agreement ≥ 66.7) เช่นเดียวกับส่วนทัศนคติที่แสดงด้วยสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ซึ่งมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยสรุปแล้วแบบประเมินความรู้ และทัศนคติที่มีต่อภาวะลงโควิดเป็นเครื่องมือที่มีความเป็นมาตรฐาน ซึ่งจะสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางแก่บุคลากรทางการแพทย์ นักเทคนิคการแพทย์ชุมชน ในการประเมินความรอบรู้ด้านสุขภาพ รวมถึงใช้เป็นแนวทางสำหรับส่งเสริมสุขภาพในชุมชน

คำสำคัญ: ลงโควิด แบบสอบถาม ความรอบรู้ด้านสุขภาพ นักเทคนิคการแพทย์ชุมชน

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: pawared.ont@mahidol.ac.th

รับบทความ: 10 พฤษภาคม 2566

แก้ไขบทความ: 19 กรกฎาคม 2566

รับตีพิมพ์บทความ: 3 สิงหาคม 2566

Development and Psychometric Validation of the Knowledge and Attitudes Questionnaire toward Long COVID (KA-long COVID)

Pawared Ontong^{1*} Orawan Boonmakerd¹ and Sutinun Juntorn²

¹*Department of Community Medical Technology, Faculty of Medical Technology, Mahidol University, Nakhon Pathom Province, Thailand*

²*Division of Occupational Therapy, Faculty of Physical Therapy, Mahidol University, Nakhon Pathom Province, Thailand*

Abstract

The impact of long COVID has been increasing globally, however, the symptoms and pathophysiological mechanisms are still not well understood. Therefore, evaluating individuals knowledge and attitudes (KA) towards long COVID is crucial. This study aimed to create and validate the KA-long COVID questionnaire, which consists of 14 items for knowledge and 6 items for attitude. The questionnaire's content validity was established through expert agreement, and its internal consistency and intra-rater reliability were assessed using 30 healthy participants, aged 18-60 years old. Results showed acceptable item level-content validity index (I-CVI) and scale level-content validity index (S-CVI) (≥ 0.8 and 0.91 , respectively). The attitude section's internal consistency was reliable (Cronbach's alpha = 0.82). The knowledge section's intra-rater reliability was acceptable (percent agreement ≥ 66.7), and the attitude section's Spearman rank correlation coefficient was significant ($p < 0.05$). In conclusion, the KA-long COVID questionnaire is a reliable and valid instrument for measuring knowledge and attitudes toward long COVID. This questionnaire could guide healthcare professionals, including community medical technologists, in measuring health literacy and improving health outcomes.

Keywords: Long COVID, Questionnaire, Health literacy, Community medical technologists

*Corresponding author E-mail address: pawared.ont@mahidol.ac.th

Introduction

The coronavirus disease 2019 (COVID-19) is an emerging disease caused by the coronavirus (SARS-CoV-2). The first case was detected in December 2019 in Wuhan and spread rapidly due to its dense population.⁽¹⁾ Consequently, China had to announce the country's lockdown in order to control the situation. Approximately 80 percent of patients recovered without hospitalization, whereas 20 percent of those infected showed symptoms and were admitted to the hospital. Five percent of patients had severe symptoms and high mortality rate.⁽²⁾ These patients with underlying diseases or elderly tended to have more severe illnesses than ordinary people. In the current global epidemic situation, many countries have been able to control the epidemic and prevent new infections. In contrast, new infections in many countries, including Thailand, are still high.

Recently, new virus mutations confer higher infectivity and low virulence. Most infected people, especially with vaccination, show mild symptoms and recover within a few days. However, some people still face prolonged symptoms after recovering from the illness. The condition is known as "Long COVID" which usually occurs with pathological sequelae.⁽³⁾ The cause of long COVID remains unclear. It has been hypothesized that the antibodies produced during the infection to eliminate the virus can

also affect the cells in the body. Another reason is that the body is unable to eliminate the infection completely,⁽⁴⁾ resulting in inflammation and other pathologies.⁽⁵⁻⁷⁾ The condition has a variety of names, including Long COVID-19, Post-COVID conditions, Long-haul COVID, post-acute COVID-19, post-COVID-19 syndrome or chronic COVID, etc. Symptoms of long COVID exhibit substantial heterogeneity, encompassing more than 200 symptoms including fatigue, shortness of breath, brain fog, musculoskeletal pain, chest pain, headaches, loss of taste and smell, sleep disturbances, heart-related symptoms, gastrointestinal illnesses and mental health issues.^(8, 9) The prevalence of long COVID is still being studied, and estimates vary. Recent research indicates that approximately 45% of individuals who have survived COVID-19 have been observed to exhibit a variety of unresolved symptoms after approximately four months.⁽¹⁰⁾ Patients suffering from long COVID have documented persisting and protracted symptoms affecting multiple physiological systems, resulting in substantial reductions in quality of life, occupational capabilities, and considerable disability.^(11,12) The symptoms can be debilitating and cause difficulties in daily activities, work, and social interactions. In addition, the experience of long COVID can lead to psychological distress as patients contend with persistent symptoms and the uncertainty surrounding their recovery.

The condition can occur in people with severe or mild symptoms after the infection is not detected in the patients. There is currently no definitive determination of the diagnostic criteria and the principles of diagnosis are constantly being improved and developed. In this case, the knowledge of long COVID is an inevitable component for healthcare professionals in order to assess, treat and monitor an infected patient. Therefore, long COVID awareness and understanding, along with guidelines for post-infection self-care, are essential for the general population to maintain good quality of life. In addition, measuring knowledge and attitudes toward long COVID is essential for developing targeted interventions. By addressing knowledge gaps and shaping positive attitudes, interventions can be tailored to meet the specific needs of individuals with long COVID, ultimately leading to improved patient outcomes and better overall management of the condition.

Medical technologists play an important role in the healthcare team by performing a variety of laboratory tests and procedures to help diagnose and monitor medical conditions. They have to communicate with patients, physicians, and other healthcare professionals to provide information about laboratory testing and results. In addition, health promotion is a crucial responsibility of medical technologists, particularly those in community settings, due to their advantageous position in reaching

individuals compared to hospital settings. However, prior to initiating any health promotion activities, it is imperative to assess an individual's personal health literacy. Therefore, questionnaires can be an effective tool for health promotion because they can help individuals to identify their health-related behaviors and attitudes, and provide them with tailored feedback and recommendations for improvement.

Currently, COVID-19-related health literacy can be widely accessed from various kinds of media. Many studies demonstrated a relationship between health literacy and COVID-19-related beliefs and behaviors.⁽¹³⁻¹⁶⁾ They focused on strategies for increasing awareness and prevention behaviors. Nevertheless, a number of people infected with COVID-19 still suffer from long COVID. Moreover, it is a complex issue and the information may be diverse and inconstant. In this sense, health literacy on long COVID is critical during the COVID-19 pandemic in order to take care of themselves, make informed decisions, and access appropriate healthcare services.⁽¹⁷⁾ To assess this, the conceptual model by Nutbeam was used in this study. It identified three levels of health literacy: functional, interactive and critical health literacy.⁽¹⁸⁾ Given the ongoing uncertainty surrounding long COVID, we focused on accessing functional health literacy with regard to public awareness of health conditions. This study aimed to evaluate the validity and reliability of the questionnaire on

knowledge and attitudes towards long COVID (KA-long COVID). The accurate assessment can be used to develop a guideline for patients at risk of long COVID to increase their understanding and participation in self-care and clinical treatment.

Methodology

The development and validation of the knowledge and attitudes questionnaire involve a systematic process to ensure its reliability and validity as a research instrument. The process typically begins with an extensive review of existing literature on long COVID. Then, a pool of potential questionnaire items is generated. A group of healthcare professionals specialized in COVID-19 management evaluate the initial items as a panel of experts in the field. The questionnaire is then administered to a small sample of individuals who are representative of the target population. Lastly, psychometric evaluation techniques are used to assess its reliability and validity. This includes assessing internal consistency and intra-rater reliability.

Item generation

In this phase, the researchers identified the key questions related to knowledge and attitudes towards long COVID by gathering data from various databases such as PubMed, Scopus and TCI. The search keywords used included Long COVID, Post-COVID condition, Long-haul COVID, Post-acute COVID-19,

Post-COVID-19 syndrome or chronic COVID. Furthermore, guidelines from local and national health organizations, including the WHO, CDC and Ministry of Public Health (Thailand), were complied to develop the questionnaire.

To ensure the accuracy of the initial questionnaire's content, content validity indices (CVIs) were calculated for both individual items (I-CVI) and the overall scale (S-CVI). The first draft was provided to five experts who were carefully selected based on their expertise in academia and healthcare. The expert panel consisted of two medical doctors, one medical technologist, one pharmacist, and one occupational therapist. One medical doctor was an active epidemiological investigator, who had experiences in proactive screening of COVID-19 patients, and the other was specialized in cognitive neurology. The medical technologist was specialized in virology and had expertise on biosafety requirement for SARS-CoV-2 while the pharmacist was working full-time at drugstore and had a research background in herbal medicine and the occupational therapist was specialized in physical, mental and cognitive impairment. These experts were asked to evaluate each question's clarity and alignment with the questionnaire's objectives. They rated each item on a four-point Likert scale, with scores ranging from 1 (not relevant) to 4 (highly relevant). Experts were also encouraged to provide feedback and suggest revisions to

improve the wording and phrasing. The I-CVI value for each item and the S-CVI value for the overall scale were assessed. It was necessary for the I-CVI and the S-CVI to be equal to or greater than 0.78 and 0.9, respectively. Any question with a low CVI value was revised based on the feedback provided by the experts.^(19, 20) To gather feedback from the target population, a pilot test was conducted to assess the face validity. Participants who met the inclusion criteria were invited to respond to all items in order to evaluate comprehension, question clarity, and scoring criteria. Additionally, any ambiguous words or phrases were also identified and revised based on the participant's feedback.

Psychometric properties study

The psychometric properties of the tool were assessed, including internal consistency and intra-rater reliability. A total of thirty participants were included in the study, following specific inclusion criteria: (a) being a healthy individual residing in Bangkok and surrounding areas (b) aged between 18-60 years (c) having good proficiency in the Thai language for effective communication, and (d) never get COVID-19 or recovered from COVID-19 more than 3 months. The exclusion criteria involved individuals who were diagnosed with COVID-19 during the intra-rater reliability process. All participants were provided with detailed information about the research study in

accordance with ethical principles, and their consent to participate was obtained. This study received ethical approval from the Mahidol University Central Institutional Review Board (COA No. MU-CIRB 2022/224.1608).

Measurement

The authors collected data using an online survey titled "Questionnaire on Knowledge and Attitude towards long COVID (KA-long COVID)". The questionnaire comprised two parts with a total of 12 questions. In the knowledge section, participants were required to select their response from "Agree", "Disagree" or "Not sure". In the attitudes section, participants rated their agreement on a scale of 0 to 3, where 0 indicated disagreement and 3 indicated strong agreement. To assess intra-rater reliability, participants were asked to complete the survey twice, with a one-week interval between responses. For internal consistency analysis, the authors used the participant's first response for calculation.

Statistical Analysis

All statistical analyses in this study were performed using SPSS for Windows (Version 18.0; SPSS Inc., Chicago, IL). Descriptive statistics were used to calculate the demographic characteristics. The internal consistency of the attitude section, which was scored using a Likert scale, was assessed using Cronbach alpha coefficient. For the knowledge

section, intra-rater reliability was determined using percent agreement, while Spearman's rank correlation was used for the attitude section.

Result

In the preliminary phase of the study, relevant literature and guidelines were reviewed to extract questions, which were then organized into two sections with sub-domains. The first draft of KA-long COVID consisted of 21 items (15 on knowledge and 6 on attitudes), but after removing repetitive items and receiving feedback from an expert panel, one item with an I-CVI value of 0.60 was excluded, leaving 20 items for construct validation (Table 1). The S-CVI/Ave was 0.91, indicating acceptable content validity. Only minor issues were reported

regarding the wording of the questionnaire during the pilot study. The participants suggested adding more explanation about patient group 608, which was included in the footnote.

The final version of the 20-item KA-long COVID questionnaire was distributed to 30 participants in the main study to test its psychometric properties. The characteristics of the participants are presented in Table 2, which shows that the sample group consisted of 30 participants, including 14 males (46.7%) and 16 females (53.3%). The mean age of the participants was 33.07 (SD = 12.95, range = 18-59). Most of the participants held a Bachelor's degree (66.7%), and 43.3% of them were university students.

Table 1 Content validity index (CVI) rating of the individual KA-long COVID items.

Item		I-CVI
Knowledge section		
K0	Symptoms that persist after recovering from COVID-19 within the first month are not considered as long COVID.	0.6
K1	Long COVID can be prevented once infected with the virus.	1
K2	Long COVID symptoms may be the same or different in each person.	1
K3	Long COVID symptoms can last from a few months to years.	1
K4	Patients in group 608 who are \geq 60 years old, or have any of the 7 underlying diseases including chronic respiratory disease, cardiovascular disease, chronic renal failure, stroke, obesity, cancer and diabetes or being pregnant, have a higher chance of developing long COVID than other groups.	1

Table 1 Content validity index (CVI) rating of the individual KA-long COVID items. (Cont.)

Item		I-CVI
Knowledge section		
K5	Long COVID infection can occur in healthy infected people or have mild symptoms or never had any underlying diseases before.	1
K6	Following long COVID symptoms can be found in infected people more often than in those who have never been infected:	
K6.1	Fatigue, muscle weakness	1
K6.2	Shortness of breath	1
K6.3	Joint pain, muscle pain	0.8
K6.4	Brain fatigue, short memory	0.8
K6.5	Hair loss	1
K6.6	Headache, dizziness	0.8
K6.7	Stress, anxiety, insomnia, depression	0.8
K6.8	Coronary artery blockage, myocardial infarction	0.8
K6.9	Indigestion, diarrhea, Gerd	0.8
Attitude section		
A1	A person who is infected with COVID-19 and received antiviral drugs such as Favipiravir, Molnupiravir, Remdesivir and Paxlovid is less likely to develop long COVID-19 condition compared to those who do not receive such drugs.	0.8
A2	<i>Andrographis paniculata</i> or Andrographolide can prevent long COVID.	1
A3	Full-dose vaccination and a booster can prevent long COVID.	1
A4	People who exercise regularly and have adequate rest are less likely to develop a long COVID condition compared to those who rarely exercise and rest	1
A5	Consumption of foods with high vitamins, minerals and fiber helps promote faster recovery and reduces the incidence of long COVID.	0.8
A6	Consumption of probiotics such as yogurt and fermented milk helps the body to recover faster and reduces the incidence of long COVID.	0.8

Table 2 Demographic characteristics of study participants (N = 30).

Characteristics		Participants	Percentage
Sex	Male	14	46.7
	Female	16	53.3
Occupation	University student	13	43.3
	Freelance	4	13.3
	Civil servant	8	26.7
	Business	4	13.3
	State enterprise	1	3.3
Education	Bachelor's Degree	20	66.7
	Master's Degree	7	23.3
	Ph.D.	3	10.0
		Mean (SD)	Range
Age (years)		33.07 (12.95)	18-59

Internal consistency and intra-rater reliability

The attitude section of the KA-long COVID questionnaire showed high and acceptable internal consistency (Cronbach's alpha = 0.82). In terms of intra-rater reliability, the results were consistently good, as shown in Table 3. The knowledge section demonstrated satisfactory reliability with percent agreement

ranging from 66.7 to 93.3. The attitude section exhibited moderate to strong correlations according to Spearman's rank correlation coefficient (0.43-0.70).^(21, 22) The item with the strongest correlation was A3 ($r_s = 0.70$, $p < 0.003$), while other items showed moderate correlation.

Table 3 Intra-rater reliability of KA-long COVID (N = 30).

Knowledge section	% Agreement	
K1	70.0	
K2	93.3	
K3	66.7	
K4	80.0	
K5	70.0	
K6.1	66.7	
K6.2	86.7	
K6.3	73.3	
K6.4	66.7	
K6.5	83.3	
K6.6	76.7	
K6.7	80.0	
K6.8	70.0	
K6.9	76.7	
Attitude section	Spearman rank correlation coefficient (r_s)	p
A1	0.67	0.000
A2	0.61	0.000
A3	0.70	0.003
A4	0.62	0.000
A5	0.62	0.000
A6	0.43	0.018

Knowledge and Attitude results

Opinion on KA-long COVID items in knowledge section are presented in Table 4. The highest percent agreement was shown in item K2 (Long COVID symptoms may be the same or different in each person) with 96.7% agreement whereas, the lowest percent agreement was observed in item K6.8 (Coronary artery blockage, myocardial infarction), with only 33.3% agreement among participants. In the attitude section, the highest agreement score was 2.4 out of 3.0 for item A4 (people who

exercise regularly and have adequate rest are less likely to develop a long COVID compared to those who rarely exercise and rest) and item A5 (consumption of foods with high vitamins, minerals and fiber helps promote faster recovery and reduce the incidence of long COVID), as shown in Table 5. However, the agreement scores for other questions were low, indicating contradictions regarding anti-viral drugs, the use of *Andrographis paniculate* extract, vaccination, and probiotics.

Table 4 Opinion on KA-long COVID items in knowledge section (N = 30).

Items	Answers (%)	Agree	Disagree	Not sure
K1		16 (53.3)	6 (20.0)	8 (26.7)
K2		29 (96.7)	0	1 (3.3)
K3		18 (60.0)	3 (10.0)	9 (30.0)
K4		22 (73.3)	2 (6.7)	6 (20.0)
K5		23 (76.7)	3 (10.0)	4 (13.3)
K6.1		18 (60.0)	2 (6.7)	10 (33.3)
K6.2		23 (76.7)	2 (6.7)	5 (16.7)
K6.3		17 (56.7)	4 (13.3)	9 (30.0)
K6.4		16 (53.3)	2 (6.7)	12 (40.0)
K6.5		16 (53.3)	5 (16.7)	9 (30.0)
K6.6		20 (66.7)	2 (6.7)	8 (26.7)
K6.7		14 (46.7)	5 (16.7)	11 (36.7)
K6.8		10 (33.3)	6 (20.0)	14 (46.7)
K6.9		13 (43.3)	8 (26.7)	9 (30.0)

Table 5 Participant’s score in attitude section of KA-long COVID (N = 30).

Attitude section	Mean	SD
A1	1.60	1.037
A2	1.33	0.844
A3	1.73	0.980
A4	2.40	0.770
A5	2.40	0.814
A6	1.93	0.907

Discussion

In this study, we developed a tool using literature review and expert suggestions and showed that it has good psychometric properties. We followed guidelines from reputable organizations to create the questionnaire. However, the prevalence and definition of long COVID are still uncertain and controversial, and more evidence is needed.

From our preliminary result, we found that almost all participants understood that long COVID symptoms might be the same or different in each person, in accordance with the current media reports. However, there was a diversity in other areas of knowledge. More than half of the participants did not know about the consequence of long COVID in terms of phycological and digestive problems. Only one-third of participants were aware that long COVID could cause blood vessel blockage and heart issues despite several studies suggesting a strong association.^(23, 24) In term of attitudes, most believed that regular exercise, adequate rest and a healthy diet could reduce their

chances of developing long COVID, which has been suggested as an effective multisystemic therapy for long COVID.⁽²⁵⁾ Conversely, some believed that vaccines, commercial drugs, herbal medicine (such as *Andrographis paniculata*), and probiotics could not prevent the long COVID. The evidence supporting this belief is not concrete; thus, it may be useful to trace the roots of these beliefs through qualitative processes.

Medical technologists have played a crucial role in identifying and monitoring COVID-19 cases during the pandemic. They could continue to utilize their expertise to promote health, prevent disease, and educate the public on health-related issues. By doing so, they could assist healthcare providers in implementing effective preventative measures and developing strategies to improve public health outcomes. Research enables healthcare providers to tailor their approach to care, ensuring that patients receive personalized, high-quality care. A proactive approach to healthcare can have significant benefits,

including improved patient outcomes, reduced healthcare costs, increased patient satisfaction, improved population health, and more efficient use of healthcare resources.

There are some limitations of this study. Firstly, it was based on a small sample size, and given that a large proportion of the participants were university students, it may not be representative of the entire population. Therefore, further studies are recommended to verify the stability of KA-long COVID in a larger population. Secondly, the study included participants both with and without previous COVID-19 infection, which might have affected the results due to differences in their experiences.

Conclusion

The KA-long COVID tool was found to be valid for assessing the knowledge and attitude towards long COVID. The study showed good results in terms of content validity, internal consistency, and intra-rater reliability. Although there are some limitations to the tool, the findings from a large population can guide health educators, professionals, researchers, and policymakers in developing suitable management plans for long COVID treatment and education.

Acknowledgements

This research project was supported by Faculty of Medical Technology, Mahidol

University. The authors would like to express our gratitude to the research participants and experts who were involved in this study for their valuable participation and contribution. Additionally, the authors extend our thanks to Prof. Virapong Prachayasittikul and Asst. Prof. Likit Preeyanon from the Faculty of Medical Technology, Mahidol University for their kind advice and proofreading assistance.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Liu YC, Kuo RL, Shih SR. COVID-19: The first documented coronavirus pandemic in history. *Biomed J* 2020; 43: 328-33.
2. Tay MZ, Poh CM, Renia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol* 2020; 20: 363-74.
3. Mehandru S, Merad M. Pathological sequelae of long-haul COVID. *Nat Immunol* 2022; 23: 194-202.
4. Silva Andrade B, Siqueira S, de Assis Soares WR, *et al.* Long-COVID and Post-COVID Health Complications: An up-to-date review on clinical conditions and their possible molecular mechanisms. *Viruses* 2021; 13.

5. Nalbandian A, Sehgal K, Gupta A, *et al.* Post-acute COVID-19 syndrome. *Nat Med* 2021; 27: 601-15.
6. Castanares-Zapatero D, Chalon P, Kohn L, *et al.* Pathophysiology and mechanism of long COVID: a comprehensive review. *Ann Med* 2022; 54: 1473-87.
7. Lopez-Leon S, Wegman-Ostrosky T, Perelman C, *et al.* More than 50 long-term effects of COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 2021; 11: 16144.
8. Aiyegbusi OL, Hughes SE, Turner G, *et al.* Symptoms, complications and management of long COVID: a review. *J R Soc Med* 2021; 114: 428-42.
9. Davis HE, McCorkell L, Vogel JM, Topol EJ. Long COVID: major findings, mechanisms and recommendations. *Nat Rev Microbiol* 2023; 21: 133-46.
10. O'Mahoney LL, Routen A, Gillies C, *et al.* The prevalence and long-term health effects of Long Covid among hospitalised and non-hospitalised populations: A systematic review and meta-analysis. *EclinicalMedicine* 2023; 55: 101762.
11. L OM, Buwalda T, Blair M, *et al.* Impact of Long COVID on health and quality of life. *HRB Open Res* 2022; 5: 31.
12. Malik P, Patel K, Pinto C, *et al.* Post-acute COVID-19 syndrome (PCS) and health-related quality of life (HRQoL)-A systematic review and meta-analysis. *J Med Virol* 2022; 94: 253-62.
13. Ishikawa H, Kato M. Health literacy and COVID-19-related beliefs and behaviors: a longitudinal study of the Japanese general population. *Health Promot Int* 2023; 38.
14. Siri Y, Arthan A, Nirachon C. Health literacy and preventive behaviors on COVID-19 among undergraduate students in a University of Southern Thailand. *Dis Control J* 2022; 48: 493-504.
15. Danpradit P, Jermtienchai K. Relationship between health literacy and COVID-19 prevention behaviors of COVID-19 infected people during the pandemic in 2021 and the First trimester of 2022. *Vajira Nursing Journal* 2022; 24: 70-84.
16. Naveed MA, Shaukat R. Health literacy predicts Covid-19 awareness and protective behaviours of university students. *Health Info Libr J* 2022; 39: 46-58.
17. Nutbeam D. Health literacy as a public health goal: a challenge for contemporary health education and communication strategies into the 21st century. *Health Promotion International*. 2000. p. 259-67.
18. Nutbeam D. The evolving concept of health literacy. *Soc Sci Med* 2008; 67: 2072-8.
19. Polit DF, Beck CT. The content validity index: are you sure you know what's being reported? Critique and recommendations. *Res Nurs Health* 2006; 29: 489-97.

20. Polit DF, Beck CT, Owen SV. Is the CVI an acceptable indicator of content validity? Appraisal and recommendations. *Res Nurs Health* 2007; 30: 459-67.
21. Mukaka MM. Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi Med J* 2012; 24: 69-71.
22. Schober P, Boer C, Schwarte LA. Correlation coefficients: Appropriate use and interpretation. *Anesth Analg* 2018; 126: 1763-8.
23. Raman B, Bluemke DA, Luscher TF, Neubauer S. Long COVID: post-acute sequelae of COVID-19 with a cardiovascular focus. *Eur Heart J* 2022; 43: 1157-72.
24. Bucciarelli V, Nasi M, Bianco F, *et al.* Depression pandemic and cardiovascular risk in the COVID-19 era and long COVID syndrome: Gender makes a difference. *Trends Cardiovasc Med* 2022; 32: 12-7.
25. Jimeno-Almazan A, Pallares JG, Buendia-Romero A, *et al.* Post-COVID-19 syndrome and the potential benefits of exercise. *Int J Environ Res Public Health* 2021; 18.

Incidence of Carbapenemase Production in *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Patients of Bamrasnaradura Infectious Diseases Institute

Kannikar Khummasorn^{1,2*}, Worada Samosornsuk³, Chollanant Khattiyawech³
and Seksun Samosornsuk³

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

²Clinical Microbiology Laboratory, Bamrasnaradura Infectious Disease Institute,
Nonthaburi Province, Thailand

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

Abstract

Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* (CPPA) is one of the important causative agents of nosocomial infections and is associated with increased severity of the disease and prolonged of hospitalization. The aim of this study was to study the incidence of Carbapenemase-production in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients of Bamrasnaradura Infectious Diseases Institute during 2015-2020. A total of 157 non-duplicated clinical *P. aeruginosa* isolates composed of 82 carbapenem-resistant *P. aeruginosa* (CRPA) and 75 carbapenem-sensitive *P. aeruginosa* (CSPA) isolates. Carbapenem (imipenem and meropenem) resistance was determined in all isolates by using modified Kirby-Bauer disk diffusion method with imipenem and meropenem and CPPA was tested by the Carba NP test. All 82 CRPA isolates were investigated for carbapenemase genes bla_{IMP} , bla_{VIM} and bla_{NDM} by using PCR technique. The results showed that all CSPA isolates were susceptible to imipenem and meropenem, whereas CRPA isolates were resistant to imipenem (95.1%) and meropenem (97.6%). Forty two of 82 CRPA isolates (51.2%) had carbapenemase genes, and 39 (47.6%) isolates produce carbapenemase enzyme, detected by the Carba NP test. Most CPPA isolates could be detected within 5 minutes. However, one isolate encoding bla_{NDM} gene gave a negative result by the Carba NP test within 2 hours. The sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of the Carba NP test were 88.1%, 95.0%, 94.9% and 88.4% respectively. In this study, forty four (53.6%) CRPA

*Corresponding author E-mail address: kannikar.khu@allied.tu.ac.th

isolates were CPPA. The Carba NP test was a rapid and reliable method to distinguishing carbapenemase production in *P. aeruginosa* from non-producing strains.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Carbapenemase genes, Carba NP

อุบัติการณ์ของการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีนีเมสใน *Pseudomonas aeruginosa* ที่แยกได้จากผู้ป่วยของสถาบันบำราศนราดูร

กรรณิการ์ คำมะสอน^{1,2*} วรดา สโมสรรสุ³ ชลนันทน์ ขัตติยเวช³
และ เสกสรรค์ สโมสรรสุ³

¹บัณฑิตศึกษา สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี

²ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา สถาบันบำราศนราดูร กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี

³ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี

บทคัดย่อ

เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่สร้างเอนไซม์คาร์บาพีนีเมส (CPPA) และดื้อต่อยากลุ่มคาร์บาพีเนม เป็นหนึ่งในสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาล การดื้อต่อยากลุ่มคาร์บาพีเนมมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคที่เพิ่มขึ้น และระยะเวลาการพักรักษาตัวในโรงพยาบาลที่นานขึ้น จุดมุ่งหมายของการศึกษานี้คือเพื่อศึกษาอุบัติการณ์ของการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีนีเมสใน *Pseudomonas aeruginosa* ที่แยกได้จากผู้ป่วยของสถาบันบำราศนราดูร ระหว่างปี พ.ศ. 2558-2563 ตัวอย่างเชื้อ *P. aeruginosa* ที่เก็บได้มีจำนวน 157 ไอโซเลตที่ไม่ซ้ำราย ประกอบด้วยเชื้อที่ดื้อต่อยากลุ่มคาร์บาพีเนม (CRPA) จำนวน 82 ไอโซเลต และเชื้อที่ไวต่อยากลุ่มคาร์บาพีเนม (CSPA) จำนวน 75 ไอโซเลต เชื้อทุกไอโซเลตผ่านการตรวจการดื้อต่อยากลุ่มคาร์บาพีเนมชนิด imipenem และ meropenem ด้วยวิธี disk diffusion method และการตรวจการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีนีเมสของเชื้อด้วยการทดสอบ Carba NP อนึ่งเชื้อ CRPA จำนวน 82 ไอโซเลต ได้รับการตรวจสอบยีนคาร์บาพีนีเมส bla_{IMP} bla_{VIM} และ bla_{NDM} โดยเทคนิค PCR ผลการวิจัยพบว่าเชื้อ CSPA จำนวน 75 ไอโซเลต ไวต่อ imipenem และ meropenem ร้อยละ 100 ขณะที่เชื้อ CRPA ดื้อต่อ imipenem และ meropenem ร้อยละ 95.1 และ 97.6 ตามลำดับ เชื้อ CRPA 82 ไอโซเลต ตรวจพบยีนคาร์บาพีนีเมสในเชื้อ 42 ไอโซเลต (ร้อยละ 51.2) และการทดสอบ Carba NP ตรวจพบเชื้อสร้างเอนไซม์คาร์บาพีนีเมสในเชื้อ 39 ไอโซเลต (ร้อยละ 47.6) และเชื้อ CPPA ที่แยกได้เกือบทั้งหมดสามารถตรวจจับได้ภายใน 5 นาที โดยการทดสอบ Carba NP มีความไวและความจำเพาะร้อยละ 88.1 และ 95.0 และค่าทำนายผลบวกและค่าทำนายผลลบตรงเท่ากับร้อยละ 94.9 และ 88.4 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม มีเชื้อตรวจพบยีน bla_{NDM} แต่ให้ผล Carba NP เป็นลบ ภายใน 2 ชั่วโมง จำนวน 1 ไอโซเลต การวิจัยนี้พบว่า เชื้อ CRPA 44 ไอโซเลต (ร้อยละ 53.6) เป็นเชื้อที่สร้างเอนไซม์คาร์บาพีนีเมส ทั้งนี้ การทดสอบ Carba NP เป็นวิธีที่รวดเร็วและเชื่อถือได้

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: kannikar.khu@allied.tu.ac.th

ในการแยกเชื้อดื้อยาในกลุ่มคาร์บาพีเนมที่สร้างเอนไซม์ CPPA ออกจากเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ดื้อต่อยากลุ่มคาร์บาพีเนมโดยไม่ใช้กลไกการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีนีเมส

คำสำคัญ: *Pseudomonas aeruginosa*, ยีนคาร์บาพีนีเมส, Carba NP

บทนำ

เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่ติดต่อจากกลุ่มคาร์บาพีเนม ได้แก่ imipenem, meropenem และ doripenem เป็นเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) ที่ก่อให้เกิดการเจ็บป่วยและอัตราการตายสูง⁽¹⁾ อุบัติการณ์ในการติดเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ติดต่อจากกลุ่มคาร์บาพีเนมในสถาบันบำราศนราดูร ปี พ.ศ. 2562 คิดเป็นร้อยละ 18 และปี พ.ศ. 2563 คิดเป็นร้อยละ 15 โดยกลไกการดื้อยาของกลุ่มนี้ส่วนหนึ่งเกิดจากยีนที่สร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมที่ทำให้การใช้ยาในกลุ่มนี้ไม่ได้ผล และเริ่มมีรายงานความสามารถในการส่งต่อยีนที่ควบคุมการดื้อยาด้านจุลชีพข้ามสายพันธุ์ (horizontal gene transfer) ได้⁽²⁾ หากไม่สามารถควบคุมเชื้อดื้อยาก็จะส่งผลกระทบต่อปัญหาสุขภาพ เศรษฐกิจ และระบบการควบคุมป้องกันการติดเชื้อในโรงพยาบาล ปัจจุบันห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิกส่วนใหญ่ยังใช้วิธีการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียและการทดสอบความไวต่อยาด้านจุลชีพด้วยวิธีดั้งเดิม (conventional method) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน แต่มีข้อจำกัดในด้านของวิธีการที่ยังใช้เวลาในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อและการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพ ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ การเตรียมอุปกรณ์ที่มีหลายขั้นตอน ความแม่นยำและความน่าเชื่อถือที่ต้องอาศัยความชำนาญหรือประสบการณ์ของเจ้าหน้าที่ที่ตรวจวิเคราะห์⁽³⁾ ดังนั้นห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิกจึงมีบทบาทสำคัญที่ทำหน้าที่ในการจำแนกชนิดเชื้อให้ถูกต้อง รวดเร็ว เพื่อให้แพทย์เลือกใช้ยาต้านจุลชีพที่เหมาะสม เพื่อให้การรักษามีประสิทธิภาพสูงสุด ในปัจจุบัน Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ได้แนะนำให้ใช้เทคนิค Carba NP ในการตรวจเชื้อ *Enterobacterales* และ *P. aeruginosa* ที่ติดต่อ

จากกลุ่มคาร์บาพีเนม ซึ่งจะให้ผลการตรวจที่รวดเร็วภายใน 2 ชั่วโมง ดังนั้น ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาอุบัติการณ์ของการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมใน *Pseudomonas aeruginosa* ที่แยกได้จากผู้ป่วยของสถาบันบำราศนราดูร

วิธีการศึกษา

1. เชื้อที่ใช้ในการศึกษา

เชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 157 ไอโซเลตที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจต่าง ๆ ได้แก่ เลือด ปัสสาวะหนอง และเสมหะ ของผู้ป่วย โดยเก็บไม่ซ้ำรายกัน และเป็นเชื้อที่เก็บครั้งแรกที่เพาะเชื้อขึ้นของผู้ป่วย เชื้อตัวอย่างที่จะนำไปใช้ในการวิจัยจะเพาะเลี้ยงบนอาหาร tryptic soy agar เพื่อให้ได้โคโลนีของเชื้อบริสุทธิ์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียสในบรรยากาศปกติ นาน 18 ชั่วโมง จากนั้นพิสูจน์เชื้อโดยชุดทดสอบชีวเคมีและการตรวจวินิจฉัยสายพันธุ์ของเชื้อด้วยวิธี Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากทั้งผู้ป่วยในและผู้ป่วยนอกที่เข้ามารับการรักษาที่สถาบันบำราศนราดูร กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ระหว่างเดือนเมษายน พ.ศ. 2558 ถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2563 การศึกษาครั้งนี้ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยของมนุษย์ สาขาวิทยาศาสตร์ ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (COE No.012/2563)

2. การทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพด้วยวิธี disk diffusion method

การทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพในการศึกษาครั้งนี้ ใช้วิธี Modified Kirby-Bauer ซึ่งเป็นวิธีตามมาตรฐาน CLSI M02 2018⁽⁴⁾ โดยแปลผล

การทดสอบยาแต่ละชนิดตามมาตรฐาน CLSI M100 2022⁽⁵⁾ ซึ่งสารต้านจุลชีพที่ใช้ในการทดสอบประกอบด้วย amikacin, gentamicin, netilmicin, ciprofloxacin, ceftazidime, piperacillin, piperacillin/tazobactam, imipenem และ meropenem

3. การตรวจหายีน *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} และ *bla*_{NDM} ด้วยวิธี PCR

เชื้อ *P. aeruginosa* 82 ไอโซเลต ที่ตรวจพบการให้ผลการทดสอบความไวเป็น intermediate และ/หรือ resistant ต่อ imipenem และ/หรือ meropenem ในวิธี disk diffusion จะนำมาตรวจหายีนที่สร้างเอนไซม์คาร์บาพีนีเมส (CPPA) สำหรับการตรวจหายีน *bla*_{IMP} *bla*_{VIM} ทำการสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี boiled template ใน 1xTE buffer และนำส่วนใสปริมาณ 10 ไมโครลิตร มาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ สำหรับ PCR ด้วยชุด primers IMP-F (5' GGAATAGAGTGGCTTAAAYTCTC3') IMP-R (5' CCAAACYACTASGTTATCT3')⁽⁶⁾ VIM-F (5' GATGGTGTGGTTCGCATA3') VIM-R (5' CGAATGCGCAGCACCAG3')⁽⁷⁾ โดยเตรียม PCR mixture และ PCR condition ตามที่อธิบายในงานวิจัยก่อนหน้า^(6,7) และทำการตรวจสอบ PCR product ของยีน *bla*_{IMP} ขนาด 188 bp และยีน *bla*_{VIM} ขนาด 390 bp ใน agarose gel electrophoresis (ร้อยละ 2) สำหรับยีน *bla*_{NDM} ทำการทดสอบด้วยเทคนิค Real-Time PCR โดยใช้เครื่องอัตโนมัติ BD MAX System (BD Diagnostics, Sparks, MD) ตามคู่มือบริษัทผู้ผลิต

4. วิธีทดสอบ modified Carba NP

เชื้อ *P. aeruginosa* ทั้งหมด 157 ไอโซเลต จะถูกทำการทดสอบการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีนีเมส

(CPPA) ด้วยวิธี modified Carba NP โดยดัดแปลงจากการทดสอบ Carba NP ตามมาตรฐาน CLSI⁽⁵⁾ ดังนี้ เตรียมหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร 2 หลอด กำหนดให้หลอดที่ 1 เป็นหลอดควบคุม (control) หลอดที่ 2 เป็นหลอดทดสอบ (test) ใส่ Tris HCl buffer (pH 7.4) 100 มิลลิลิตร ลงในหลอดทั้งสอง นำ sterile loop ขนาด 1 ไมโครลิตร เชื้อเชื้อ *P. aeruginosa* ที่เพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller-Hinton Agar นาน 18-24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ใส่ในหลอด ทั้ง 2 หลอด หลังจากนั้น vortex ให้เชื้อผสมเป็นเนื้อเดียวกัน หลังจากนั้นใส่น้ำยา A (เตรียมโดยใส่ phenol red ร้อยละ 0.5 (Sigma-Aldrich) 2 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 16.6 มิลลิลิตร และเติม ZnSO₄ 0.1 mmol/L ปรับ pH 7.8) ลงในหลอดควบคุม 100 ไมโครลิตร และใส่น้ำยา B (เตรียมโดยใส่ Imipenem monohydrate (Sigma-Aldrich) 1 มิลลิกรัม ในน้ำยา A 1 มิลลิลิตร) ลงในหลอดทดสอบ 100 ไมโครลิตร นำส่วนผสมทั้งสองหลอดไป vortex และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และตรวจสอบการเปลี่ยนสีของเชื้อเมื่อครบเวลา 5 นาที และ 2 ชั่วโมง โดยหลอดควบคุมต้องให้สีแดง และหากหลอดทดสอบให้สีแดงหรือสีส้มแดง แสดงว่าผลเป็นลบ (no carbapenemase detected) แต่หากหลอดทดสอบเปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองหรือสีส้มเหลือง แสดงว่าผลเป็นบวก (carbapenemase producer) กรณีหลอดควบคุมให้สีแดงหรือสีส้มแดงหรือสีเหลือง และหลอดทดสอบให้สีส้มหรือสีอื่น ๆ ให้รายงานผล invalid และทำการทดสอบซ้ำอีกครั้ง ในการทดสอบนี้มีเชื้อ *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 (carbapenemase positive) และ *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706 (carbapenemase negative) เป็นเชื้อควบคุมการคำนวณค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก

และค่าทำนายผลลบของวิธีการทดสอบด้วย Carba NP ทำด้วยโปรแกรม IBM SPSS for windows version 28.0.0.0 (190) โดยใช้การตรวจหาขึ้นที่สร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมด้วยวิธี PCR เป็นวิธี gold standard

ผลการวิจัย

1. ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *P. aeruginosa*

จากการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 75 ไอโซเลต ที่ไวต่อยากลุ่มคาร์บาพีเนม (CSPA, Table 1) พบเชื้อมีความไวต่อยากลุ่ม aminoglycosides ได้แก่ amikacin gentamicin netilmicin ร้อยละ 100 มีความไวต่อยา ยากลุ่ม fluoroquinolones ได้แก่ ยา ciprofloxacin ร้อยละ 97.3 มีความไวต่อยากลุ่ม cephalosporins ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม β -Lactam ได้แก่ ยา ceftazidime piperacillin ร้อยละ 88.0 และ 85.3 และมีความไวต่อยาในกลุ่ม β -Lactam/ β -Lactamase inhibitor ซึ่งเป็นยากลุ่ม β -Lactam ที่เพิ่มสารยับยั้งเอนไซม์ β -Lactamase เข้าไปเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพในการรักษาที่ดีขึ้น ได้แก่ ยา piperacillin/tazobactam ร้อยละ 90.7

จากการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 82 ไอโซเลตที่ติดต่อยากลุ่มคาร์บาพีเนม (CRPA, Table 1) พบว่าเชื้อกลุ่มนี้มีความไวต่อยาทุกชนิดลดลง และพบการดื้อยาหลายขนาน (multi-drug resistance) เชื้อ CRPA นี้มีความไวต่อยากลุ่ม aminoglycosides ได้แก่ amikacin gentamicin netilmicin ร้อยละ 53.6 23.2 และ 29.6 ตามลำดับ และมีผลการดื้อยาคิดเป็นร้อยละ 42.7 74.4 และ 67.9 มีความไวต่อยาในกลุ่ม fluoroquinolones คือยา ciprofloxacin เท่ากับ

ร้อยละ 12.7 และมีผลการดื้อยาคิดเป็นร้อยละ 79.7 มีความไวต่อยาในกลุ่ม cephalosporins ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม β -Lactam ประกอบด้วยยา ceftazidime และ piperacillin เท่ากับร้อยละ 17.1 ทั้งสองชนิด และมีผลการดื้อยาคิดเป็นร้อยละ 80.5 และ 64.6 ตามลำดับ มีความไวต่อยากลุ่ม β -Lactam/ β -Lactamase inhibitor ซึ่งเป็นยากลุ่ม β -Lactam ที่เพิ่มสารยับยั้งเอนไซม์ β -Lactamase เข้าไปเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพในการรักษาที่ดีขึ้น ได้แก่ ยา piperacillin/tazobactam เท่ากับ ร้อยละ 16.0 และมีผลการดื้อยาคิดเป็นร้อยละ 66.7 และมีความไวต่อยากลุ่มคาร์บาพีเนม ประกอบด้วยยา imipenem และ meropenem เท่ากับ ร้อยละ 1.2 และ 0 และมีผลการดื้อยาคิดเป็นร้อยละ 95.1 และ 97.6 ตามลำดับ

2. ผลการทดสอบการตรวจหาขึ้น bla_{IMP} bla_{VIM} และ bla_{NDM} ด้วยวิธี PCR

เชื้อที่นำมาทดสอบหาขึ้นที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์เป็นเชื้อกลุ่มที่ติดต่อยาคาร์บาพีเนมจำนวน 82 ไอโซเลต การศึกษานี้พบว่ามีเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ตรวจพบขึ้นคาร์บาพีเนม ทั้งหมด 42 (ร้อยละ 51.2) ไอโซเลต โดยตรวจพบขึ้น bla_{IMP} เพียงยีนเดียวจำนวน 27 ไอโซเลต (ร้อยละ 32.9) ยีน bla_{VIM} เพียงยีนเดียวจำนวน 8 ไอโซเลต (ร้อยละ 9.8) ยีน bla_{NDM} เพียงยีนเดียว จำนวน 4 ไอโซเลต (ร้อยละ 4.9) และตรวจพบยีน 2 ชนิด ได้แก่ ยีน bla_{IMP} และ bla_{VIM} จำนวน 3 ไอโซเลต (ร้อยละ 3.6) เชื้อ *P. aeruginosa* ที่ติดต่อยาคาร์บาพีเนม อีก 40 ไอโซเลต (ร้อยละ 48.8) ตรวจไม่พบยีน bla_{IMP} bla_{VIM} และ bla_{NDM} (Table 2)

Table 1 Results of the antimicrobial susceptibility testing of carbapenems susceptible (CSPA) and carbapenems resistant *P. aeruginosa* (CRPA).

Antimicrobial agents (n)	Number of Susceptible (%)	Number of Intermediate (%)	Number of Resistant (%)
CSPA (n = 75)			
Amikacin (75)	75 (100.0)	0 (0)	0 (0)
Gentamicin (75)	75 (100.0)	0 (0)	0 (0)
Netilmicin (75)	75 (100.0)	0 (0)	0 (0)
Ciprofloxacin (75)	73 (97.3)	0 (0)	2 (2.7)
Ceftazidime (75)	66 (88.0)	2 (2.7)	7 (9.3)
Piperacillin (75)	64 (85.3)	2 (2.7)	9 (12.0)
Piperacillin/tazobactam (75)	68 (90.7)	0 (0)	7 (9.3)
Imipenem (75)	75 (100.0)	0 (0)	0 (0)
Meropenem (75)	75 (100.0)	0 (0)	0 (0)
CRPA (n = 85)			
Amikacin (82)	44 (53.6)	3 (3.7)	35 (42.7)
Gentamicin (82)	19 (23.2)	2 (2.4)	61 (74.4)
*Netilmicin (81)	24 (29.6)	2 (2.5)	55 (67.9)
*Ciprofloxacin (79)	10 (12.7)	6 (7.6)	63 (79.7)
Ceftazidime (82)	14 (17.1)	2 (2.4)	66 (80.5)
Piperacillin (82)	14 (17.1)	15 (18.3)	53 (64.6)
*Piperacillin/tazobactam (75)	12 (16.0)	13 (17.3)	50 (66.7)
Imipenem (82)	1 (1.2)	3 (3.7)	78 (95.1)
Meropenem (82)	0 (0)	2 (2.4)	80 (97.6)

* Some isolates of CRPA have not been tested with netilmicin, ciprofloxacin, and piperacillin/tazobactam.

Table 2 Results of *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, and *bla*_{NDM} genes using PCR method compared to the results of modified Carba NP in 82 isolates of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* (CRPA).

Carbapenemase genes (n)	No. Isolates tested by modified Carba NP	
	Positive	Negative
- <i>bla</i> _{IMP} (27)	26	1
- <i>bla</i> _{VIM} (8)	6	2
- <i>bla</i> _{NDM} (4)	3	1
- <i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{VIM} (3)	2	1
- Negative (40)	2	38
Total (82)	39	43

3. ผลการทดสอบ Carba NP

เชื้อ CSPA ให้ผลลบกับ Carba NP ทุกไอโซเลต ขณะที่เชื้อ CRPA 82 ไอโซเลตให้ผลบวกกับ Carba NP 39 ไอโซเลต (ร้อยละ 47.6) ดังนี้ เชื้อ CRPA 42 ไอโซเลตที่ตรวจพบยีนคาร์บาพินีเมสให้ผลบวกกับ Carba NP ทั้งหมด 37 ไอโซเลต (ร้อยละ 88.1) โดย 34 ไอโซเลต (ร้อยละ 80.9) ให้ผลบวกภายใน 5 นาที ขณะที่ 3 ไอโซเลต ได้แก่ สายพันธุ์ที่ตรวจพบยีน *bla*_{VIM} 2 ไอโซเลต และตรวจพบยีน 2 ชนิด คือ *bla*_{IMP} และ *bla*_{VIM} 1 ไอโซเลต ให้ผล Carba NP เป็นบวก เมื่อบ่มเพาะเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นอกจากนี้พบว่า มี 1 ไอโซเลต ที่ตรวจพบยีน *bla*_{NDM} 2 ไอโซเลต ตรวจพบยีน *bla*_{VIM} 1 ไอโซเลต ตรวจพบยีน *bla*_{IMP} และ 1 ไอโซเลต ตรวจพบยีน *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} ยังคงให้ผลลบกับ Carba NP เมื่อบ่มเพาะเชื้อเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบเชื้อ CRPA อีก 2 ไอโซเลต ที่ให้ผล Carba NP เป็นบวก ภายใน 5 นาที แต่ตรวจไม่พบยีน *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} และ *bla*_{NDM} จากผลการศึกษาพบเชื้อที่ต้องแยกกลุ่มคาร์บาพินีเมส 82 ไอโซเลต เป็นเชื้อที่สร้าง

เอนไซม์คาร์บาพินีเมส (CPPA) จากการตรวจพบยีนคาร์บาพินีเมสด้วยวิธี PCR และ/หรือให้ผลบวกด้วยวิธี Carba NP จำนวน 44 (ร้อยละ 53.6) ไอโซเลต โดยตรวจพบยีนคาร์บาพินีเมส หรือให้ผลบวกด้วยวิธี Carba NP อย่างเดียว จำนวน 42 และ 39 ไอโซเลต ตามลำดับ (Table 2) การสร้างเอนไซม์ CPPA จากไอโซเลตที่แยกได้เกือบทั้งหมดสามารถตรวจจับได้ภายใน 5 นาที โดยการทดสอบ Carba NP

เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจด้วยวิธี PCR และ modified Carba NP พบว่า เชื้อ CRPA จำนวน 82 ไอโซเลต ให้ผลบวกด้วยวิธี PCR หรือตรวจพบยีนคาร์บาพินีเมส (*bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}) จำนวน 42 ไอโซเลต และให้ผลลบด้วยวิธี PCR จำนวน 40 ไอโซเลต โดยเชื้อ CRPA ที่มียีนคาร์บาพินีเมส พบให้ผลบวกด้วยวิธี modified Carba NP จำนวน 37 ไอโซเลต และพบผลลบปลอมหรือให้ผลลบด้วยวิธี modified Carba NP จำนวน 5 ไอโซเลต ส่วนเชื้อ CRPA ที่ไม่พบยีนคาร์บาพินีเมส และให้ผลลบด้วยวิธี modified Carba NP มีจำนวน 38 ไอโซเลต โดยพบผลบวกปลอมหรือให้ผลบวก

ด้วยวิธี modified Carba NP จำนวน 2 ไอโซเลต เมื่อนำมาคำนวณค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ ของวิธี modified Carba NP โดยใช้วิธี PCR เป็นวิธี gold standard พบว่ามีความไวและความจำเพาะร้อยละ 88.1 และ 95.0 ตามลำดับ และค่าทำนายผลบวกและค่าทำนายผลลบเท่ากับร้อยละ 94.9 และ 88.4 ตามลำดับ

วิจารณ์ผล

ผลการศึกษาไอโซเลตเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ดื้อต่อยากลุ่มคาร์บาพีเนม พบว่าเชื้อไวต่อยาทุกชนิดลดลง เชื้อสามารถพัฒนาการดื้อยาหลายขนานในระหว่างการรักษาได้⁽⁸⁾ เนื่องจาก *P. aeruginosa* เป็นหนึ่งในสมาชิกของเชื้อก่อโรค ESKAPE (*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa* และ *Enterobacter* species) เชื้อกลุ่มนี้มีความสามารถในการก่อโรค การแพร่กระจายเชื้อ และการพัฒนาดื้อยา ซึ่งเป็นเหตุให้สารต้านจุลชีพหลายขนานสูญเสียคุณสมบัติในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อกลุ่มนี้ได้⁽⁹⁾ ยากลุ่ม aminoglycosides เป็นยาที่แพทย์ใช้ในการรักษาผู้ป่วยติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบรวมถึง *P. aeruginosa* อย่างไรก็ตาม เมื่อเชื้อดื้อต่อยากลุ่มคาร์บาพีเนม จะพบการดื้อยากลุ่มนี้สูงขึ้นมาก กลไกการดื้อยาของกลุ่ม aminoglycoside อาจเกิดจากการพัฒนาขึ้นดื้อยา ได้แก่ ยีน methyltransferase *rmtB* ที่พบมากถึงร้อยละ 51.5 จากการศึกษาของ El-Far และคณะ⁽¹⁰⁾ ซึ่งพบเชื้อกลุ่มนี้ยังดื้อยา ciprofloxacin สูงถึงร้อยละ 79.7 และยา ceftazidime ร้อยละ 80.5 และยา piperacillin/tazobactam ร้อยละ 66.7 นอกจากนี้มีรายงานการดื้อยาหลายขนานของเชื้อนี้เนื่องจากยีน efflux pump และ

outer membrane (*mexAB-oprM, mexEF-oprN, oprJ, opmB, opmH*) ทุกไอโซเลต⁽¹¹⁾ และยังตรวจพบยีนที่จำเพาะเจาะจงต่อการดื้อยาแต่ละชนิด เช่น ดื้อต่อยาคาร์บาพีเนม ตรวจพบยีน IMP48 จาก 72 ไอโซเลต (ร้อยละ 66.7) และตรวจพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา fluoroquinolones คือ *qnrVC1* (ร้อยละ 51.4)⁽¹¹⁾ จากการศึกษาใน *P. aeruginosa* ที่ดื้อต่อยากลุ่มคาร์บาพีเนม มียีนเกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีนิเมส ร้อยละ 51.2 โดยพบยีน *bla_{IMP}* สูงที่สุด (ร้อยละ 36.6) รองลงมาคือ *bla_{VIM}* (ร้อยละ 13.4) และยีน *bla_{NDM}* (ร้อยละ 4.9) ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาความชุกของยีนคาร์บาพีนิเมสในเชื้อ *P. aeruginosa* ในโรงพยาบาล 2 แห่งที่จังหวัดสงขลา ซึ่งพบยีน *bla_{VIM}* สูงสุด ร้อยละ 27.7 ตามด้วยยีน *bla_{IMP}* ร้อยละ 23.9 และ *bla_{OXA-48}* ร้อยละ 4.8⁽¹²⁾ ในงานวิจัยนี้ การดื้อต่อยากลุ่มคาร์บาพีเนมที่ตรวจไม่พบยีนคาร์บาพีนิเมสนี้อาจเกิดจากยีนคาร์บาพีนิเมสชนิดอื่น ได้แก่ GES⁽¹³⁾ OXA-48⁽¹²⁾ OXA-50⁽¹¹⁾ หรือเกิดจากกลไกการดื้อยาอื่น ๆ ได้แก่ efflux pump⁽¹¹⁾ เชื้อ CPPA ที่แยกได้เกือบทั้งหมดสามารถตรวจจับได้ภายใน 5 นาที โดยการทดสอบ modified Carba NP ที่มีความไวร้อยละ 90.7 ซึ่งสอดคล้องกับการรวบรวมงานวิจัยของวิธี Carba NP ในการตรวจหา *P. aeruginosa* ที่สร้างเอนไซม์คาร์บาพีนิเมสของ Bouslah (2020)⁽¹⁴⁾ ที่รายงานว่า original Carba NP test, the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Carba NP test และ the RAPIDEC[®] CARBA NP ให้ผลที่มีความไวร้อยละ 92, 95, และ 96 ตามลำดับ เนื่องจากระดับของการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีนิเมส ของเชื้อมีหลายระดับ ส่งผลให้การตรวจหาการสร้างเอนไซม์แบบ phenotypic หรือการทดสอบทางชีวเคมีรวมถึง

การทดสอบ Carba NP อาจทำให้เกิดผลลบได้ ซึ่งจากการศึกษาเชื้อที่สร้างเอนไซม์คาร์บาพีนีเมส ชนิด OXA มี OXA-48 variants บางชนิด ได้แก่ OXA-163, OXA-198, OXA-247 และ OXA-405 ขาด carbapenemase activity⁽¹⁵⁾ เช่นเดียวกับเชื้อที่สร้างเอนไซม์ New Delhi metallo- β -lactamase (NDM) จากยีน *bla*_{NDM-4}, *bla*_{NDM-5}, *bla*_{NDM-7} และ *bla*_{NDM-7}⁽¹⁶⁾ ยีน *bla*_{NDM} variants ก็อาจทำให้การทดสอบการสร้างเอนไซม์ด้วยการทดสอบ Carba NP ให้ผลเป็นลบได้ นอกจากนี้อายุของเชื้อมีผลต่อการทดสอบ Carba NP ด้วย จากงานวิจัยของ Lee และคณะ พบว่าการนำเชื้อที่บ่มเพาะเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง มาทดสอบ Carba NP จะให้ผลลบ กับเชื้อ *K. pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ NDM ได้ 2 ไอโซเลต และถ้าใช้เชื้อที่บ่มเพาะเพียง 5 ชั่วโมง จะทำให้ผลการทดสอบ Carba NP เป็นบวก⁽¹⁷⁾ การตรวจพบว่าการทดสอบ Carba NP ให้ผลบวก 2 ไอโซเลต แต่ไม่พบยีนทั้ง 3 ชนิดนี้อาจเป็นไปได้ว่าเชื้ออาจสร้างเอนไซม์คาร์บาพีนีเมสชนิดอื่น เช่น GES^(13, 18) งานวิจัยนี้สรุปได้ว่าเชื้อ CRPA ที่แยกได้จากทั้งผู้ป่วยในและผู้ป่วยนอกที่เข้ามารับการรักษาตัวที่สถาบันบำราศนราดูร เป็นเชื้อสร้างเอนไซม์คาร์บาพีนีเมส ร้อยละ 53.6 นอกจากนี้งานวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่าการทดสอบ Carba NP นี้เป็นวิธีการที่รวดเร็วและเชื่อถือได้ในการแยกเชื้อที่ CPPA จากเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ดื้อต่อยากลุ่มคาร์บาพีเนมโดยไม่ใช้กลไกการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีนีเมส (non-carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa*; NCPPA) ภายใน 5 นาที สามารถไปประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการเพื่อการรายงานผลการดื้อคาร์บาพีเนมของเชื้อ CPPA ภายในวันที่เพาะเชื้อชนิดนี้ขึ้นได้ เพื่อให้แพทย์เลือกใช้ยาในการรักษาได้อย่างเหมาะสมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Phumart P, Phodha P, Thamlikitkul V, Riewpaiboon A, Prakongsai P, Limwattananon S. Health and economic impacts of antimicrobial resistant infections in Thailand: a preliminary study. *J Health Syst Res* 2012; 6: 352-60.
2. Bocharova Y, Savinova T, Lazareva A, *et al.* Genotypes, carbapenemase carriage, integron diversity and *oprD* alterations among carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from Russia. *Int J Antimicrob Agents* 2020; 55: 105899. doi:10.1016/j.ijantimicag.2020.105899
3. Feucherolles M, Cauchie HM, Penny C. MALDI-TOF mass spectrometry and specific biomarkers: potential new key for swift identification of antimicrobial resistance in foodborne pathogens. *Microorganisms*. 2019; 7: 593. doi:10.3390/microorganisms7120593
4. Wayne PA, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. CLSI M02, 13th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute 2018.
5. Wayne PA, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI M100, 32th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute 2022.

6. Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, Woodford N. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 321-2.
7. Wang TH, Leu YS, Wang NY, Liu CP, Yan TR. Prevalence of different carbapenemase genes among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* blood isolates in Taiwan. *Antimicrob Resist Infect Control* 2018; 7: 123. doi:10.1186/s13756-018-0410-5
8. Bassetti M, Vena A, Croxatto A, Righi E, Guery B. How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs Context* 2018; 7: 1-18.
9. Biondo C. Bacterial antibiotic resistance: the most critical pathogens. *Pathogens* 2023; 12: 116. doi:10.3390/pathogens 12010116
10. El-Far A, Samir S, El-Gebaly E, *et al.* High rates of aminoglycoside methyltransferases associated with metallo-beta-lactamases in multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a tertiary Care hospital in Egypt. *Infect Drug Resist* 2021; 14: 4849-58.
11. Tran HA, Vu TNB, Trinh ST, *et al.* Resistance mechanisms and genetic relatedness among carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from three major hospitals in Hanoi, Vietnam (2011-15). *JAC Antimicrob Resist* 2021; 3: dlab103. doi:10.1093/jacamr/dlab103
12. Saengsuwan P, Kositpantawong N, Kawila S, Patugkaro W, Romyasamit C. Prevalence of carbapenemase genes among multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from tertiary care centers in Southern Thailand. *Saudi Med J* 2022 Sep; 43: 991-9.
13. Chong PM, McCorrister SJ, Unger MS, Boyd DA, Mulvey MR, Westmacott GR. MALDI-TOF MS detection of carbapenemase activity in clinical isolates of Enterobacteriaceae spp., *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* compared against the Carba-NP assay. *J Microbiol Methods* 2015; 111: 21-3.
14. Bouslah Z. Carba NP test for the detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Med Mal Infect* 2020; 50: 466-79.
15. Bernabeu S, Dortet L, Naas Thierry. Evaluation of the β -CARBA™ test, a colorimetric test for the rapid detection of carbapenemase activity in Gram-negative bacilli, *J Antimicrobial Chemotherapy* 2017; 72: 1646-58.
16. Ahmad N, Ali SM, Khan AU. Detection of New Delhi Metallo- β -Lactamase Variants NDM-4, NDM-5, and NDM-7 in *Enterobacter aerogenes* Isolated from a Neonatal Intensive Care Unit of a North India Hospital: A First Report. *Microb Drug Resist* 2018; 24: 161-5.

17. Lee LY, Korman TM, Graham M. Rapid time to results and high sensitivity of the CarbaNP test on early cultures. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 4023-6.
18. Osei Sekyere J, Govinden U, Essack S. Comparison of existing phenotypic and genotypic tests for the detection of NDM and GES carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Pure Appl Microbiol* 2016; 10: 2585-91.

A Study of Consistencies between HbA1c and the Incidence of Eye and Kidney Complication in Diabetic Patients from Promkiri Hospital Nakhon Si Thammarat Province

Jeerasak Yartrak¹, Duangnate Pipatsatitpong² and Kanyanath Piumngam^{2*}

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

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

Abstract

Thailand's Diabetes Care Guidelines recommend HbA1c testing at least once a year in type 2 diabetic patients (T2DM); however, this may not be sufficient to prevent microvascular complications especially diabetic retinopathy (DR) and diabetic nephropathy (DN). This research aimed to study consistence between the average estimated HbA1c (calculated by converting from blood glucose monitoring) and laboratory measured HbA1c, the cumulative incidence of DR and DN in good and poor glycemic control groups, and the incidence density of DR and DN with consistencies and non-consistencies HbA1c values in poor glycemic control group. The medical records of 131 patients of Promkiri's Chronic Disease Clinic registered to T2DM in 2010-2011 were analyzed. The results found consistencies of HbA1c in 1st and 2nd years after registration and decreased in the following years. The cumulative incidence of DR in patients with good and poor glycemic control were 0.188 and 0.365, DN 1.475 and 1.023, and DR+DN 0.142 and 0.342 respectively. The calculated HbA1c was associated with both DR and DR+DN ($p < 0.05$), the incidence density of consistencies and non-consistencies HbA1c of DR were 2.03 and 4.71 per 100 person-year, and of DR+DN were 1.47 and 4.52 per 100 person-year. In conclusion, HbA1c testing once a year may not be sufficient to prevent microvascular complications.

Keywords: Diabetic mellitus, HbA1c, Diabetic retinopathy, Diabetic nephropathy

*Corresponding author E-mail address: mim9_p@yahoo.com

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่า HbA1c กับอัตราการเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตาและไตในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 โรงพยาบาลพรหมคีรี จังหวัดนครศรีธรรมราช

จิรศักดิ์ ญาติริกษ์¹ ดวงเนตร พิพัฒน์สถิตพงศ์² และ กัญญาณัฐ เปี่ยมงาม^{2*}

¹บัณฑิตศึกษา สาขาเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี

²ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี

บทคัดย่อ

แนวทางการตรวจติดตามการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดด้วยการตรวจ HbA1c ในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 อย่างน้อยปีละ 1 ครั้ง อาจไม่เพียงพอและนำไปสู่การเกิดโรคแทรกซ้อน โดยเฉพาะที่ตาและที่ไต งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับ HbA1c ที่ได้จากการคำนวณค่าเฉลี่ยระดับน้ำตาลในเลือดจากปลายนิ้วกับ HbA1c จากการตรวจสุขภาพประจำปี ศึกษาอุบัติการณ์สะสมการเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตาและที่ไตระหว่างกลุ่มที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ดีและไม่ดี และศึกษาอัตราอุบัติการณ์การเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตาและที่ไตของกลุ่มที่ HbA1c สอดคล้องและไม่สอดคล้อง ในผู้ป่วยที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ไม่ดี ในคลินิกโรคเรื้อรัง โรงพยาบาลพรหมคีรี ที่ขึ้นทะเบียนในปี พ.ศ. 2553-2554 จำนวน 131 ราย โดยพบความไม่สอดคล้องของระดับ HbA1c มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตั้งแต่ปีที่ 3 ขึ้นไปของระยะเวลาดำเนินไปของโรคเบาหวาน รวมถึงพบอุบัติการณ์สะสมของการเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตาในผู้ป่วยที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ดีและไม่ดีเท่ากับ 0.188 และ 0.365 ที่ไตเท่ากับ 1.475 และ 1.023 และที่ไตร่วมกับไตเท่ากับ 0.142 และ 0.342 ตามลำดับ และพบว่าค่า HbA1c เฉลี่ยมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตา ($p < 0.05$) และที่ไตร่วมกับไต ($p < 0.05$) โดยมีอัตราอุบัติการณ์การเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตาที่มีระดับ HbA1c เฉลี่ยสอดคล้องและไม่สอดคล้องเท่ากับ 2.03 และ 4.71 รายต่อ 100 ประชากรต่อปี และที่ไตร่วมกับไต เท่ากับ 1.47 และ 4.52 รายต่อ 100 ประชากรต่อปี ดังนั้นสรุปได้ว่าการตรวจ HbA1c เพียงปีละ 1 ครั้ง อาจไม่เพียงพอในการดูแลผู้ป่วยและนำไปสู่การเกิดโรคแทรกซ้อนดังกล่าวได้

คำสำคัญ: โรคเบาหวาน ฮีโมโกลบินเอวันซี โรคแทรกซ้อนที่ตา โรคแทรกซ้อนที่ไต

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: mim9_p@yahoo.com

บทนำ

โรคเบาหวานชนิดที่ 2 (diabetes mellitus type 2 หรือ T2DM) เป็นโรคเรื้อรังที่เกิดจากความผิดปกติของร่างกายที่มีการผลิตฮอร์โมนอินซูลินซึ่งทำหน้าที่ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดไม่เพียงพอหรืออินซูลินมีฤทธิ์น้อยกว่าที่ควร ส่งผลให้ระดับน้ำตาลในเลือดสูงเกินระดับปกติ⁽¹⁾ ปัญหาที่สำคัญของผู้ป่วยโรคเบาหวานคือ การควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดให้อยู่ในเกณฑ์ปกติ โรคเบาหวานเป็นสาเหตุการตายที่สำคัญ 1 ใน 10 อันดับแรก⁽²⁾ สาเหตุหลักเกิดจากโรคแทรกซ้อนเรื้อรัง ซึ่งเป็นภาวะที่เกิดกับหลอดเลือด ได้แก่ โรคแทรกซ้อนที่ตา (diabetic retinopathy; DR) โรคแทรกซ้อนที่ไต (diabetic nephropathy; DN) โรคแทรกซ้อนหลอดเลือดสมอง (stroke) และหลอดเลือดหัวใจ (coronary artery disease)^(3,4) ในการติดตามการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 American Diabetes Association (ADA) กำหนดให้มีการติดตามการควบคุมระดับน้ำตาลด้วยวิธี continuous glucose monitoring (CGM), self-monitoring of blood glucose (SMBG) และการตรวจ HbA1c โดยแนะนำให้มีการตรวจ HbA1c 2 ครั้งต่อปี ในรายที่มีการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้ดี และ 4 ครั้งต่อปี ในผู้ป่วยที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ไม่ดี โดยค่า HbA1c เป้าหมายที่บอกถึงการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้ดีคือมีค่าต่ำกว่าร้อยละ 7 รวมทั้งสามารถใช้ระดับ HbA1c ในการทำนายการเกิดโรคแทรกซ้อนในผู้ป่วยโรคเบาหวานได้⁽⁵⁾ เนื่องจาก HbA1c มีปัจจัยรบกวนน้อยเหมาะสำหรับใช้ในการติดตามการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วย⁽⁶⁾ โดยมีบางคำแนะนำว่าการตรวจ fasting plasma glucose (FPG) เพียงอย่างเดียวอาจไม่สะท้อนถึงการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วย แต่ให้ตรวจ FPG ร่วมกับ

HbA1c เพื่อให้สามารถทราบสถานะการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยได้อย่างเป็นปัจจุบัน และในระยะเวลาที่ผ่านมาย้อนหลังได้ 3 เดือน ทำให้ผู้ป่วยและผู้ดูแลทราบถึงผลกระทบจากการรับประทาน อาหาร การออกกำลังกาย และการได้รับยาในปัจจุบันของผู้ป่วยรายนั้น ๆ⁽⁷⁾ นอกจากนี้การใช้ HbA1c ร่วมกับ FPG เพื่อคัดกรองและติดตามการรักษา มีอัตราการตรวจพบ (detection rate) ที่ร้อยละ 38.46 ซึ่งมากกว่าการใช้เพียงรายการตรวจวิเคราะห์เดียว โดย HbA1c และ FPG มีอัตราการตรวจพบที่ร้อยละ 19.66 และร้อยละ 28.63 ตามลำดับ⁽⁸⁾

สำหรับประเทศไทยมีกำหนดแนวทางเวชปฏิบัติการดูแลผู้ป่วยโรคเบาหวานปี พ.ศ. 2560 ให้มีการติดตามระดับน้ำตาลในเลือดทุก 3 เดือน เพื่อประเมินการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดทั้งก่อนและหลังอาหาร และมีการตรวจ HbA1c ทุก 3-6 เดือน หรืออย่างน้อยปีละ 1 ครั้ง ตรวจระดับไขมันในเลือด ตรวจปัสสาวะ อัลบูมินในปัสสาวะ หรืออัตราส่วนระหว่างอัลบูมินต่อครีเอตินีนในปัสสาวะ และมีการตรวจเพื่อหาความเสี่ยงของการเกิดโรคแทรกซ้อนกับอวัยวะต่าง ๆ ปีละ 1 ครั้ง⁽³⁾ โรงพยาบาลพรหมคีรีได้กำหนดแนวทางในการตรวจติดตามการรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวาน โดยจัดให้มีการตรวจติดตามสุขภาพประจำปีของผู้ป่วยโรคเบาหวานซึ่งประกอบด้วย การตรวจทางห้องปฏิบัติการ (fasting plasma glucose (FPG), lipid profile, blood urea nitrogen (BUN), creatinine (Cr, eGFR), HbA1c และ urine albumin) และการตรวจคัดกรองโรคแทรกซ้อน และมีการนัดติดตามอาการของผู้ป่วยโรคเบาหวานทุก 3 เดือน เพื่อติดตามผลการรักษา โดยแพทย์จะติดตามระดับน้ำตาลในเลือดด้วยการตรวจระดับน้ำตาลปลายนิ้วหลังดอาหารเช้า 8-14 ชั่วโมง (fasting capillary blood glucose; FCBG)

เนื่องจากแนวทางการดูแลผู้ป่วยโรคเบาหวานของโรงพยาบาลพรหมคีรี ที่มีการตรวจติดตามระดับ HbA1c เพียงปีละ 1 ครั้ง ซึ่งไม่สอดคล้องกับแนวทางการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดของ ADA และแนวทางเวชปฏิบัติสำหรับโรคเบาหวาน พ.ศ. 2560 ที่แนะนำให้มีการตรวจ HbA1c 2-4 ครั้งต่อปี จึงทำให้เกิดข้อสังเกตถึงความไม่เหมาะสมในการตรวจ HbA1c เพียงปีละครั้งเดียว เพื่อการติดตามการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด และการทำนายการเกิดโรคแทรกซ้อน โดยเฉพาะโรคแทรกซ้อนที่ตา (DR) และที่ไต (DN) ซึ่งเป็นโรคแทรกซ้อนอันดับที่ 1 และ 2 ที่เกิดกับผู้ป่วยโรคเบาหวาน ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาความสอดคล้องระหว่าง FCBG กับค่า HbA1c โดยใช้ผลตรวจ FCBG ที่ตรวจติดตามทุก 3 เดือน มาคำนวณหาค่า average estimated HbA1c (average eHbA1c) เพื่อใช้ประมาณค่า HbA1c ในช่วงเวลา 3 เดือน เปรียบเทียบกับค่า HbA1c ที่มีการตรวจติดตามสุขภาพประจำปี ปีละ 1 ครั้ง ศึกษาอุบัติการณ์สะสมการเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตา (DR) และที่ไต (DN) และอัตราอุบัติการณ์การเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตา (DR) และที่ไต (DN) ของผู้ป่วยโรคเบาหวานที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ไม่ดี ($HbA1c \geq 7$) ที่เข้ารับการรักษา ณ คลินิกโรคเรื้อรัง โรงพยาบาลพรหมคีรี จังหวัดนครศรีธรรมราช

วัตถุประสงค์และวิธีการ

1. ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ใช้ข้อมูลจากผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ที่มีการขึ้นทะเบียนผู้ป่วยโรคเบาหวานรายใหม่ในปี พ.ศ. 2553 และ 2554 และมีผลการตรวจติดตามสุขภาพประจำปีย้อนหลังครบระยะเวลา 10 ปี จำนวน 131 คน โดยรวบรวมข้อมูลจากระบบสารสนเทศของโรงพยาบาล HosXP (HIS) และระบบสารสนเทศ

ของห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ LABVIEW (LIS) ทั้งนี้โครงการวิจัยได้รับการยกเว้น การพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ เลขที่โครงการ 085/2565

2. ข้อมูลที่ใช้ในการศึกษา

ใช้ข้อมูลผลตรวจทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ FCBG, FPG, BUN, ครีเอตินีน อัลบูมินในปัสสาวะ HbA1c และการตรวจคัดกรองโรคแทรกซ้อน ประกอบด้วย การตรวจคัดกรองโรคแทรกซ้อนที่ตา (DR) และที่ไต (DN) โดยอาศัยระบบสารสนเทศของห้องปฏิบัติการ (LIS) และระบบสารสนเทศของโรงพยาบาล (HIS) ในการเก็บรวบรวมผลการตรวจติดตามสุขภาพประจำปีของผู้ป่วยโรคเบาหวาน เป็นระยะเวลา 10 ปีย้อนหลัง

3. วิธีการศึกษา

3.1 ความสอดคล้องของค่า average eHbA1c ที่คำนวณจากผลตรวจ FCBG กับค่า HbA1c ที่ได้จากการตรวจติดตามสุขภาพประจำปีของผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2

เก็บรวบรวมข้อมูลผลตรวจ FCBG ด้วยหลักการเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนส ของผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ที่มารับการตรวจติดตามการรักษาโรคเบาหวาน ทุก 3 เดือน โดยแพทย์กำหนดให้ผู้ป่วยเจาะเลือดตรวจค่า FCBG เพื่อวางแผนการรักษาและการปรับยาแก่ผู้ป่วย การเก็บข้อมูลใช้ระบบสารสนเทศของห้องปฏิบัติการ (LIS) ในการรวบรวมผลตรวจ FCBG ทุกครั้งที่ผู้ป่วยพบแพทย์ การวิเคราะห์ข้อมูล นำผล FCBG มาคำนวณค่า estimated HbA1c (eHbA1c) โดยใช้สมการที่อ้างอิงตาม The National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) เพื่อเปลี่ยน

จากค่าระดับน้ำตาลปลายนิ้วเป็นค่า eHbA1c⁽⁹⁾
 ดังสมการ

$$eAG(\text{mg/dL}) = (28.7 \times \% \text{HbA1c}) - 46.7$$

$$e\text{HbA1c}(\%) = \frac{\text{FCBG} + 46.7}{28.7}$$

จากนั้นนำค่า eHbA1c ที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย average eHbA1c และนำมาวิเคราะห์ร้อยละความสอดคล้องกับค่า HbA1c ที่ได้จากการตรวจติดตามสุขภาพประจำปีของผู้ป่วยโรคเบาหวาน ที่ตรวจได้จริง ด้วยหลักการทางเอนไซม์ โดยพิจารณาว่ามีความสอดคล้องเมื่อค่า average eHbA1c กับ HbA1c มีผลต่าง \leq ร้อยละ 0.5⁽¹⁰⁻¹²⁾ และไม่สอดคล้องเมื่อมีผลต่าง $>$ ร้อยละ 0.5

อุบัติการณ์สะสม (cumulative incidence) =

3.2 อุตบัติการณ์สะสม (cumulative incidence) การเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตา (DR) ที่ไต (DN) และที่ไตร่วมกับไต (DR+DN) ระหว่างกลุ่มที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ดี (HbA1c < ร้อยละ 7) กับกลุ่มที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ไม่ดี (HbA1c \geq ร้อยละ 7)

เก็บข้อมูลผลตรวจคัดกรองโรคแทรกซ้อนที่ตา และที่ไต จากการตรวจติดตามสุขภาพประจำปีของผู้ป่วยโรคเบาหวานกลุ่มที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ดีและไม่ดี^(3,5) เป็นระยะเวลา 10 ปีย้อนหลังจากระบบสารสนเทศของโรงพยาบาล (Hos XP) นำมาวิเคราะห์อุบัติการณ์สะสมของการเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตา และที่ไตในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 จากสูตร

$$\frac{\text{จำนวนผู้ป่วยรายใหม่ในช่วงเวลาที่กำหนด}}{\text{จำนวนที่เสี่ยงต่อการเกิดโรคทั้งหมด}}$$

เกณฑ์ที่ใช้พิจารณาการเกิดโรคแทรกซ้อนในผู้ป่วยโรคเบาหวานที่ตา และที่ไต ประกอบด้วย

1. ผลจากการตรวจคัดกรองดังนี้

- โรคแทรกซ้อนที่ตา (DR) ต้องมีผลการตรวจคัดกรองเป็น non-proliferative diabetic retinopathy (NPDR) โดยมีการระบุแยกระยะ เป็นระยะเริ่มต้น (mild) ระยะปานกลาง (moderate) ระยะรุนแรง (severe) และ proliferative-diabetic retinopathy (PDR) จึงสามารถระบุได้ว่า เกิดโรคแทรกซ้อนที่ตา

- โรคแทรกซ้อนที่ไต (DN) ต้องมีผลการตรวจคัดกรองโดยมีอัตราการกรองของไตน้อยกว่า 60 มิลลิตรต่อนาทีต่อ 1.73 ตารางเมตร (eGFR < 60 mL/min/1.73m²) และมีการตรวจพบโปรตีนในปัสสาวะ (urine albumin) จึงสามารถระบุได้ว่า เกิดโรคแทรกซ้อนที่ไต

2. การลงความเห็นวินิจฉัยของแพทย์ (ICD 10) ดังนี้

- ผู้ป่วยโรคเบาหวานที่มีโรคแทรกซ้อนที่ตา (DR) แพทย์จะใช้รหัส ICD10 เป็น E.11.2
- ผู้ป่วยโรคเบาหวานที่มีโรคแทรกซ้อนที่ไต (DN) แพทย์จะใช้รหัส ICD10 เป็น E.11.3

3.3 อัตราอุบัติการณ์ (incidence density) การเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตา (DR) และที่ไต (DN) ของกลุ่มที่มีค่า HbA1c จากการตรวจติดตามสุขภาพประจำปี สอดคล้องและไม่สอดคล้องกับค่า average eHbA1c ที่คำนวณจากผลตรวจ FCBG ในกลุ่มที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ไม่ดี (HbA1c \geq ร้อยละ 7)

ศึกษาอัตราอุบัติการณ์ของการเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตา และที่ไต ในระยะเวลา 10 ปี ในกลุ่มที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ไม่ดี โดยแบ่งกลุ่มตัวอย่างเป็น 2 กลุ่ม คือ (1) กลุ่มที่มีค่า average eHbA1c สอดคล้องกับค่า HbA1c ที่ได้จากการตรวจติดตาม

สุขภาพประจำปีของผู้ป่วย และ (2) กลุ่มที่มีค่า average eHbA1c ไม่สอดคล้องกับค่า HbA1c

ที่ได้จากการตรวจติดตามสุขภาพประจำปีของผู้ป่วย โดยคำนวณจากสูตร

$$\text{อัตราอุบัติการณ์ (incidence density)} = \frac{\text{จำนวนผู้ป่วยรายใหม่ในช่วงเวลาที่ศึกษา}}{\text{ผลรวมของระยะเวลาของแต่ละบุคคลที่เสี่ยงต่อการเกิดโรค}}$$

และเปรียบเทียบอัตราอุบัติการณ์ของการเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตา (DR) โรคแทรกซ้อนที่ไต (DN) และโรคแทรกซ้อนที่ตา ร่วมกับไต (DR+DN) ระหว่างกลุ่มที่มีค่า average eHbA1c สอดคล้องและไม่สอดคล้องกับค่า HbA1c ที่ได้จากการตรวจติดตามสุขภาพประจำปี และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของค่า average eHbA1c ที่สอดคล้องและไม่สอดคล้องกับค่า HbA1c กับการเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตา โรคแทรกซ้อนที่ไต และโรคแทรกซ้อนที่ตา ร่วมกับไต วิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้การทดสอบไคสแควร์ (Chi-square Test)

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ค่าร้อยละการวัดทางระบาดวิทยา ประกอบด้วย อุบัติการณ์สะสม (cumulative incidence) อัตราอุบัติการณ์ (incidence density) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยใช้การทดสอบไคสแควร์ โดยค่านัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ $p < 0.05$

ผลการวิจัย

1. ข้อมูลทั่วไป

การวิจัยครั้งนี้ เป็นการศึกษาแบบย้อนหลัง (retrospective cohort study) เป็นระยะเวลา 10 ปี เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับ HbA1c กับการเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตา และที่ไต ในผู้ป่วยโรคเบาหวาน โดยกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา เป็นผู้ป่วยโรคเบาหวาน

ชนิดที่ 2 ที่เข้ารับการรักษา ติดตามอาการอย่างต่อเนื่อง ที่คลินิกโรคเรื้อรัง (NCD Clinic) โรงพยาบาลพรหมคีรี จังหวัดนครศรีธรรมราช จำนวน 131 คน โดยเป็นผู้ป่วยโรคเบาหวานที่มีการขึ้นทะเบียนเป็นผู้ป่วยโรคเบาหวานรายใหม่ในปี พ.ศ. 2553 จำนวน 88 คน และปี พ.ศ. 2554 จำนวน 43 คน แบ่งเป็นเพศหญิง 100 คน เพศชาย 31 คน มีอายุเฉลี่ย 56 ปี และมีค่า BMI เฉลี่ย 25.00 กิโลกรัมต่อตารางเมตร (Table 1)

2. ผลความสัมพันธ์ระหว่างค่า average eHbA1c ที่คำนวณจากผลตรวจ FCBG กับค่า HbA1c ที่ได้จากการตรวจติดตามสุขภาพประจำปี ของผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2

ผลการศึกษาความแตกต่างระหว่างค่า average eHbA1c กับค่า HbA1c ที่ได้จากการตรวจติดตามสุขภาพประจำปีของผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ในระยะเวลา 10 ปี พบว่า ในปีที่ 1 และ ปีที่ 2 มีความสอดคล้องของค่า average eHbA1c กับค่า HbA1c คิดเป็น ร้อยละ 79.39 และร้อยละ 63.36 ตามลำดับ และพบว่ามีการควบคุมระดับน้ำตาลได้ดี สูงที่สุดในปีที่ 1 และปีที่ 2 คิดเป็น ร้อยละ 46.56 และร้อยละ 41.22 ตามลำดับ ตั้งแต่ปีที่ 3 เป็นต้นไป พบแนวโน้มร้อยละความไม่สอดคล้องเพิ่มขึ้น และพบร้อยละของกลุ่มที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ไม่ดีมีสัดส่วนมากกว่ากลุ่มที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ดี (Table 2 และ Fig. 1)

Table 1 Demographic data of T2DM patients at enrollment.

Demographic data	n	(%)
Sex		
- female	100	(76.34%)
- male	31	(23.66%)
Age (years)		
≤ 30	2	(1.52%)
31-40	13	(9.92%)
41-50	31	(23.66%)
51-60	39	(29.77%)
61-70	32	(24.43%)
71-80	14	(10.69%)
Average age	56	(20-78)
BMI (kg/m²)	25.00	(14.84-36.31)
Enrollment year		
2010	88	(67.18%)
2011	43	(32.82%)

Table 2 Percentage of consistency between average eHbA1c and measured HbA1c of T2DM patients in Promkirri Hospital calculated for 10 years in each glycemic control group.

Year	Percentage of T2DM patients			
	Consistency		Non consistency	
	Good glycemic control group	Poor glycemic control group	Good glycemic control group	Poor glycemic control group
1	46.56	32.82	12.98	7.63
2	41.22	22.14	23.66	12.98
3	21.37	12.98	32.06	33.59
4	29.01	18.32	17.56	35.11
5	33.59	19.08	18.32	29.01

Table 2 Percentage of consistency between average eHbA1c and measured HbA1c of T2DM patients in Promkiri Hospital calculated for 10 years in each glycemic control group (Cont.)

Year	Percentage of T2DM patients			
	Consistency		Non consistency	
	Good glycemic control group	Poor glycemic control group	Good glycemic control group	Poor glycemic control group
6	25.19	16.79	25.95	32.06
7	29.77	16.03	21.37	32.82
8	20.61	20.61	33.59	25.19
9	16.97	19.08	21.37	42.75
10	21.37	24.43	10.69	43.51

Note: Good glycemic control group (HbA1c < 7%), Poor glycemic control group (HbA1c ≥ 7%)

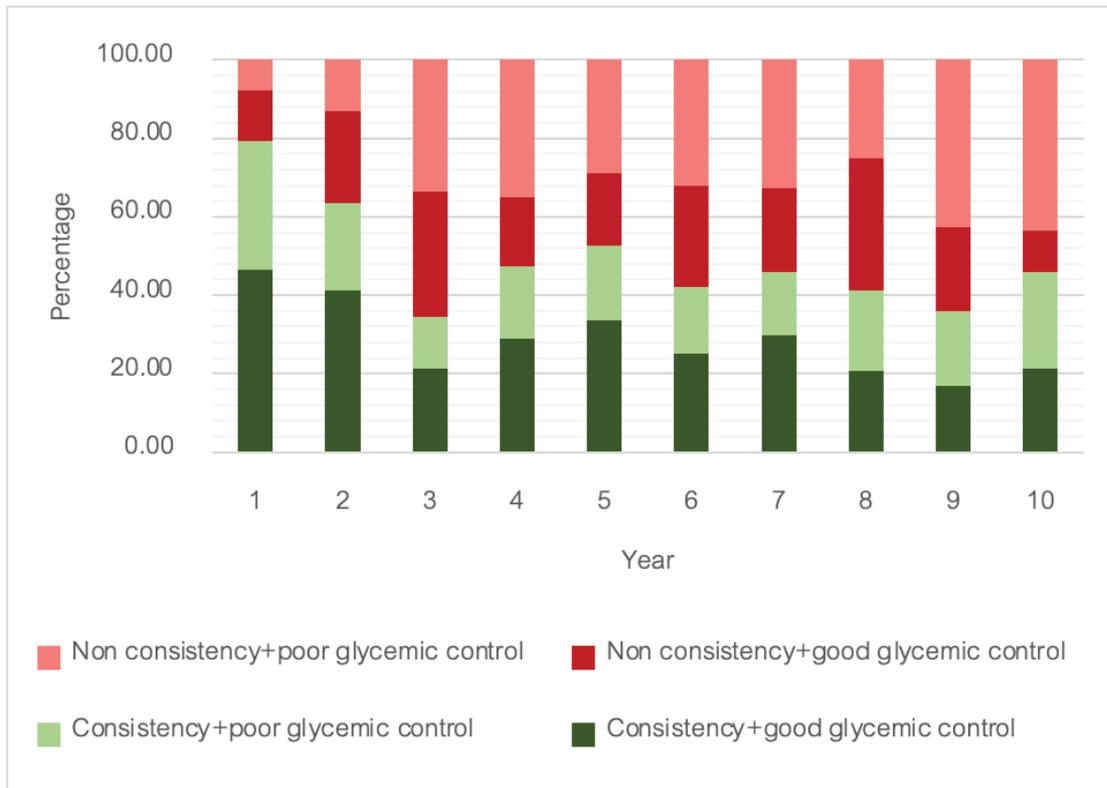


Fig. 1 Percentage of consistency between average eHbA1c and measured HbA1c of T2DM patients in Promkiri Hospital calculated for 10 years in each glycemic control group.

3. **อุบัติการณ์สะสม (cumulative incidence)** การเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตา (DR) และที่ไต (DN) ระหว่างกลุ่มที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ดี (HbA1c < ร้อยละ 7) กับกลุ่มที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ไม่ดี (HbA1c \geq ร้อยละ 7)

3.1 **อุบัติการณ์สะสมการเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตา (DR) รายใหม่**

ผลการตรวจคัดกรองจากการตรวจสุขภาพประจำปีของผู้ป่วยโรคเบาหวานด้วยวิธีตรวจด้วยกล้องถ่ายภาพจอตา (fundus photography) พบอุบัติการณ์สะสมการเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตารายใหม่ตั้งแต่ปีที่ 2 ในกลุ่มที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ดีดังนี้ 0.053, 0.019, 0.021, 0.022, 0.047, 0.013, 0.013 และในปีที่ 9 และ 10 ไม่พบผู้ป่วยโรคแทรกซ้อนที่ตารายใหม่ ส่วนในกลุ่มผู้ที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ไม่ดี ได้ผลดังนี้ 0.130, 0.075, 0.041, 0.044, 0.035, 0.026, 0.00, 0.014 และในปีที่ 10 ไม่พบผู้ป่วยโรคแทรกซ้อนที่ตารายใหม่ (Fig. 2)

3.2 **อุบัติการณ์สะสมการเกิดโรคแทรกซ้อนที่ไต (DN) รายใหม่**

ผลการตรวจคัดกรองจากการตรวจสุขภาพประจำปีของผู้ป่วยโรคเบาหวาน โดยใช้ผลตรวจทางห้องปฏิบัติการซึ่งประกอบด้วย การตรวจ Cr (eGFR), อัลบูมินในปัสสาวะ ไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ ร่วมกับ

ผลการวินิจฉัยของแพทย์ (ICD10) พบอุบัติการณ์สะสมของการเกิดโรคแทรกซ้อนที่ไตรายใหม่ตั้งแต่ปีที่ 2 ในกลุ่มผู้ป่วยที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ดี ดังนี้ 0.0374, 0.400, 0.158, 0.200, 0.143, 0.200 และปีที่ 8 ถึงปีที่ 10 ไม่พบผู้ป่วยโรคแทรกซ้อนที่ไตรายใหม่ ส่วนกลุ่มผู้ป่วยที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ไม่ดี ได้ผลดังนี้ 0.244, 0.220, 0.316, 0.100, 0.143 และในปีที่ 7 ถึงปีที่ 10 ไม่พบผู้ป่วยโรคแทรกซ้อนที่ไตรายใหม่ (Fig. 3)

3.3 **อุบัติการณ์สะสมการเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตาพร้อมกับไต (DR+DN) รายใหม่**

ผลการทดลองพบอุบัติการณ์สะสมการเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตาพร้อมกับไตรายใหม่ตั้งแต่ปีที่ 2 ในกลุ่มที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ดี ดังนี้ 0.031, 0.027, 0.019, 0.021, 0.023 และในปีที่ 7 ถึงปีที่ 10 ไม่พบผู้ป่วยโรคแทรกซ้อนที่ตาพร้อมกับไตรายใหม่ ส่วนในกลุ่มที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ไม่ดี ได้ผลดังนี้ 0.107, 0.053, 0.048, 0.010, 0.064, 0.035, 0.000, 0.025 และในปีที่ 10 ไม่พบผู้ป่วยโรคแทรกซ้อนที่ตาพร้อมกับไตรายใหม่ (Fig. 4)

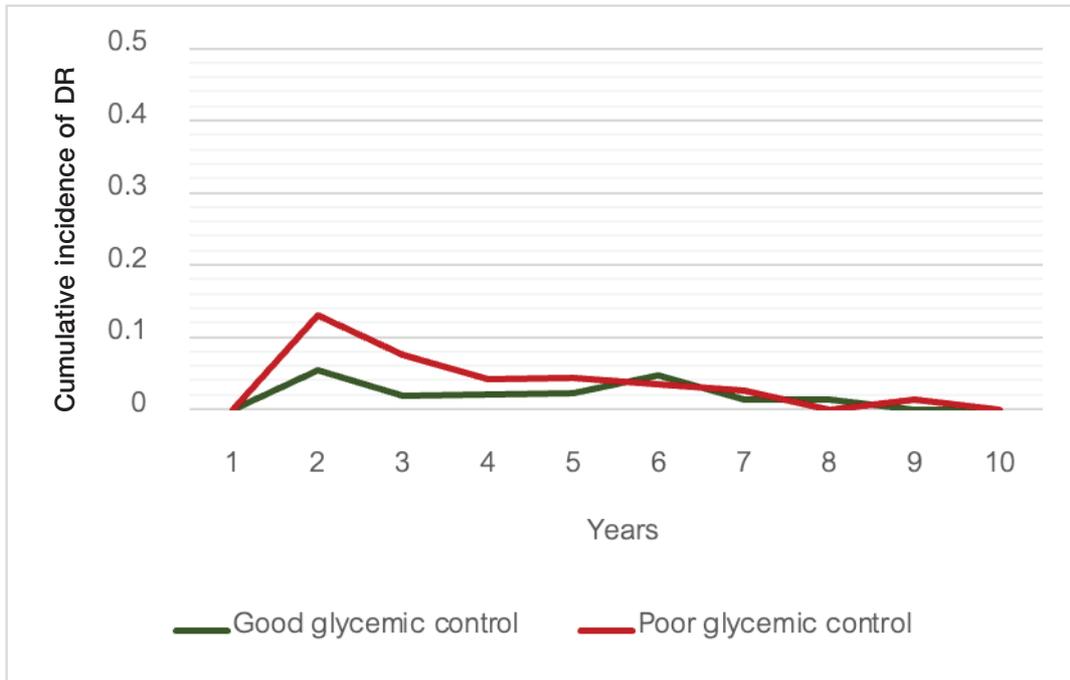


Fig. 2 Cumulative incidence of diabetic retinopathy (DR) in T2DM patients with good and poor glycemic control at Promkiri Hospital calculated for 10 years.

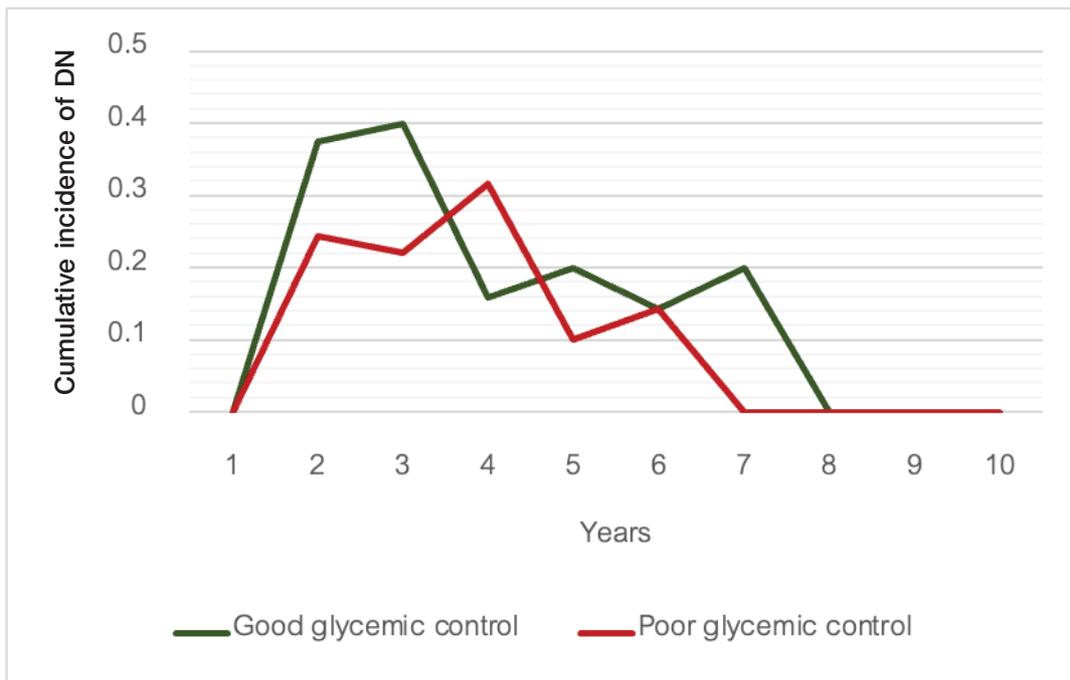


Fig. 3 Cumulative incidence of diabetic nephropathy (DN) in T2DM patients with good and poor glycemic control at Promkiri Hospital calculated for 10 years.

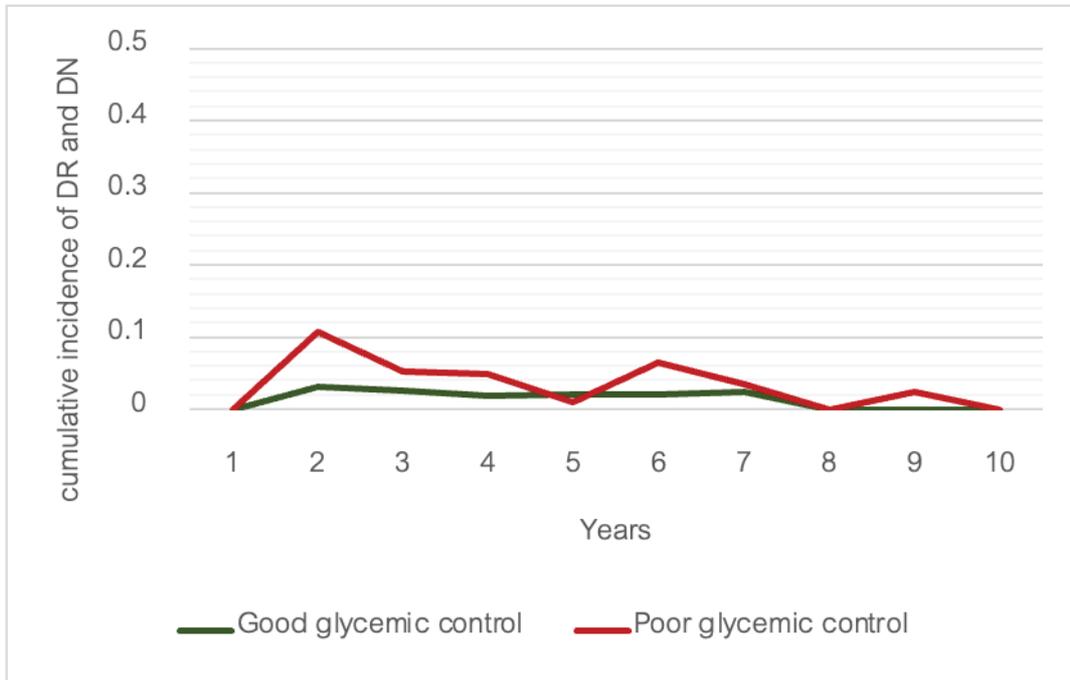


Fig. 4 Cumulative incidence of diabetic retinopathy (DR) and nephropathy (DN) in T2DM patients at Promkiri Hospital calculated for 10 years.

4. อัตราอุบัติการณ์ (incidence density) การเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตา (DR) และที่ไต (DN) ของกลุ่มที่มีค่า HbA1c ที่ได้จากการตรวจติดตามสุขภาพประจำปี สอดคล้องและไม่สอดคล้องกับค่า average eHbA1c ที่คำนวณจากผลตรวจ FCBG ในกลุ่มที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ไม่ดี (HbA1c \geq ร้อยละ 7)

4.1 ความสัมพันธ์การเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตา และที่ไต ในผู้ป่วยโรคเบาหวานที่มีค่า average eHbA1c สอดคล้องและไม่สอดคล้องกับค่า HbA1c ในกลุ่มที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ไม่ดี

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง average eHbA1c ที่สอดคล้อง และไม่สอดคล้องกับค่า HbA1c ที่ได้จากการตรวจติดตามสุขภาพประจำปี กับ การเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตาและที่ไต แบ่งออกเป็น

การเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตา (DR) การเกิดโรคแทรกซ้อนที่ไต (DN) และการเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตาพร้อมกับไต (DR+DN) ในกลุ่มผู้ป่วยที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ไม่ดี วิเคราะห์ด้วยสถิติโคสแควร์ ที่ความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 พบว่า การเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตา และการเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตาพร้อมกับไต มีความสัมพันธ์กับการมีค่า average eHbA1c สอดคล้องและไม่สอดคล้องกับค่า HbA1c ที่ได้จากการตรวจติดตามสุขภาพประจำปี โดยมีค่า *p*-value เท่ากับ 0.036 และ 0.07 ตามลำดับ แต่การเกิดโรคแทรกซ้อนที่ไต ไม่มีความสัมพันธ์กับการที่มีค่า average eHbA1c สอดคล้อง หรือไม่สอดคล้อง กับค่า HbA1c ที่ได้จากการตรวจติดตามสุขภาพประจำปี *p*-value เท่ากับ 0.155 (Table 3)

Table 3 Correlations between diabetes retinopathy (DR) and nephropathy (DN) in consistency and non-consistency between average eHbA1c and measured HbA1c of poor glycemic control T2DM patients in Promkiri Hospital calculated for 10 years.

Complication of T2DM	Number of poor glycemic control patients with complications		P - value
	Consistency (n)	Non consistency (n)	
1. DR	11	28	0.036*
2. DN	27	24	0.155
3. DR and DN	8	29	0.007*

Note: “*” represents *p*-value < 0.05, which resulted from analysis using Chi-square at 95% confident interval

4.2 อัตราอุบัติการณ์ (incidence density) การเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตา (DR) และที่ไต (DN) ในผู้ป่วยโรคเบาหวาน ที่มีค่า average eHbA1c สอดคล้อง และไม่สอดคล้องกับค่า HbA1c ที่ได้จากการตรวจติดตามสุขภาพประจำปี ในกลุ่มผู้ป่วยที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ไม่ดี

ผลการศึกษาพบว่า อัตราอุบัติการณ์การเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตาเท่ากับ 2.03 และ 4.71 รายต่อ

100 ประชากรต่อปี อัตราอุบัติการณ์โรคแทรกซ้อนที่ไต เท่ากับ 6.08 และ 5.36 รายต่อ 100 ประชากรต่อปี และอัตราอุบัติการณ์การเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตา ร่วมกับไต เท่ากับ 1.47 และ 4.52 รายต่อ 100 ประชากรต่อปี ในผู้ป่วยโรคเบาหวานที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ไม่ดี และมีค่า average eHbA1c สอดคล้องและไม่สอดคล้องกับค่า HbA1c ตามลำดับ (Table 4)

Table 4 Incidence density of diabetes retinopathy (DR) and nephropathy (DN) in consistency and non-consistency between average eHbA1c and measured HbA1c of poor glycemic control T2DM patients in Promkiri Hospital calculated for 10 years.

Complication of T2DM	Incidence density of poor glycemic control patients with complication	
	Consistency (100 person-years)	Non Consistency (100 person-years)
1. DR	2.03	4.71
2. DN	6.08	5.36
3. DR and DN	1.47	4.52

วิจารณ์

การศึกษาความสอดคล้องของค่า average eHbA1c จากการคำนวณ กับค่า HbA1c ที่ได้จากการตรวจติดตามสุขภาพประจำปี พบว่ามีร้อยละความสอดคล้องมากที่สุดในปีที่ 1 และ 2 โดยมีแนวโน้มร้อยละความไม่สอดคล้องเพิ่มสูงขึ้นในปีที่ 3 เป็นต้นไป และพบในกลุ่มผู้ป่วยที่ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้ไม่ดีมากกว่าในกลุ่มที่ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้ดี โดยมีการศึกษาที่สนับสนุนการค้นพบนี้ชี้ว่าเมื่อผู้ป่วยเป็นโรคเบาหวานในระยะเวลาสั้นๆ พฤติกรรมการควบคุมระดับน้ำตาลจะลดลง เพราะผู้ป่วยขาดความตระหนักในการดูแลสุขภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้สูงอายุ^(13, 14) แต่ในการนำผลการตรวจ FCBG มาคำนวณเพื่อหา eHbA1c นั้น มีการศึกษาพบว่าผลตรวจ FCBG จะมีค่าสูงกว่าผลตรวจ FPG ร้อยละ 8.3⁽¹⁵⁾ ทำให้มีข้อจำกัดในการคำนวณค่า eHbA1c ด้วยสูตร

$$eHbA1c (\%) = \frac{FCBG (mg/dL) + 46.7}{28.7}$$

ในกรณีที่ผู้ป่วยโรคเบาหวานมีค่า FCBG มากกว่า 217 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ซึ่งจะทำให้ค่า eHbA1c แตกต่างจากค่า HbA1c ที่ได้จากการตรวจติดตามสุขภาพประจำปีมากกว่าร้อยละ 0.5 ซึ่งอยู่ในช่วงไม่สอดคล้อง

การศึกษารูขี้นกการเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตาข่ายใหม่ ในกลุ่มที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ดี (HbA1c < ร้อยละ 7) และกลุ่มที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ไม่ดี (HbA1c ≥ ร้อยละ 7) พบว่า ในปีที่ 2 มีอุบัติการณ์การเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตาข่ายใหม่สูงสุด ทั้งในกลุ่มที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ดี และกลุ่มที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ไม่ดี และยังพบแนวโน้มอุบัติการณ์การเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตาข่ายใหม่ในกลุ่มที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ไม่ดีสูงกว่าในกลุ่มที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ดี สอดคล้องกับผลการศึกษา

ปัจจัยเสี่ยงต่อ diabetic retinopathy ในปี พ.ศ. 2559 ของ Lima และคณะ ซึ่งพบว่าการควบคุมระดับน้ำตาลที่ไม่ดีในระยะเวลาการเป็นโรคเบาหวานในช่วง 11-15 ปี และการมีโรคแทรกซ้อนที่ไตเป็นปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดโรคแทรกซ้อนที่ตา⁽¹⁶⁾ ในปีเดียวกัน Ting และคณะ ได้ศึกษาความชุก ปัจจัยเสี่ยง และการตรวจคัดกรอง diabetic retinopathy และพบว่า ปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตาประกอบด้วยระดับ HbA1c ที่สูง ภาวะไขมันในกระแสเลือดสูง ภาวะความดันโลหิตสูง และค่าดัชนีมวลกายสูง⁽¹⁷⁾ และในปี พ.ศ. 2565 Yau และคณะ ได้ศึกษาอัตราการเกิดโรคแทรกซ้อนและปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตา และพบว่า ระยะเวลาการเป็นโรคเบาหวานและการควบคุมระดับน้ำตาลไม่ดีเป็นปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดโรคแทรกซ้อนของโรคเบาหวานที่ตา⁽¹⁸⁾ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้ที่พบกลุ่มผู้ป่วยที่มีการควบคุมระดับน้ำตาลได้ไม่ดีมีอุบัติการณ์สะสมการเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตาสูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวานที่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลได้ดี

การศึกษารูขี้นกการเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตาข่ายใหม่ ในกลุ่มที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ดี (HbA1c < ร้อยละ 7) และกลุ่มที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ไม่ดี (HbA1c ≥ ร้อยละ 7) พบว่าผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มมีอุบัติการณ์สะสมการเกิดโรคแทรกซ้อนที่ไตไม่แตกต่างกัน สะท้อนให้เห็นว่าการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดไม่ได้เป็นปัจจัยเดียวในการเกิดโรคแทรกซ้อนที่ไต โดยพบว่ากลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษารูขี้นกจำนวน 131 ราย มีโรคความดันโลหิตสูงเป็นโรคร่วม 109 ราย มีค่าเฉลี่ยของ BMI เท่ากับ 25 กิโลกรัมต่อตารางเมตร และมีโรคแทรกซ้อนที่ตา 39 ราย ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Wagnew และคณะ ในปี พ.ศ. 2561 ที่พบว่าผู้ป่วยโรคเบาหวานที่มีความดันโลหิตสูงร่วมด้วยมีค่า Odd ratio = 1.67 (1.31-2.14) เมื่อเทียบกับผู้ป่วยโรคเบาหวาน

ที่ไม่มีภาวะความดันโลหิตสูง⁽¹⁹⁾ และ Lou และคณะ ในปี พ.ศ. 2562 ที่พบว่า การเป็นโรคเบาหวานมากกว่า 15 ปี ร่วมกับมีค่า BMI \geq 24 กิโลกรัมต่อตารางเมตร, HbA1c \geq ร้อยละ 7.5, FBG $>$ 198 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ความดันโลหิตสูง และมีโรคแทรกซ้อนที่ตา เป็นปัจจัยเสี่ยงในการเกิดโรคแทรกซ้อนที่ไต⁽²⁰⁾ และ ในปี พ.ศ. 2563 Tamru และคณะ พบอุบัติการณ์การเกิดโรคแทรกซ้อนของโรคเบาหวานที่ไตในประเทศเอธิโอเปีย เท่ากับ 3.6 คนต่อ 100 ประชากรต่อปี⁽²¹⁾

การศึกษาอุบัติการณ์สะสมการเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตา ร่วมกับไตรายใหม่ในกลุ่มที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ดีและไม่ดี พบว่าในกลุ่มที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ไม่ดีมีแนวโน้มอุบัติการณ์สะสมการเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตา ร่วมกับไตสูงกว่ากลุ่มที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ดี สอดคล้องกับการศึกษาของ van Wijngaarden และคณะ ในปี พ.ศ. 2560 และ Li และคณะ ในปี พ.ศ. 2563 ที่พบว่าผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ที่มีค่า HbA1c สูงจะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคแทรกซ้อนกับหลอดเลือดขนาดเล็ก^(22,23)

การศึกษาอัตราการอุบัติการณ์การเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตา และอัตราการเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตา ร่วมกับไต พบว่า กลุ่มผู้ป่วยที่มีค่า average eHbA1c สอดคล้องกับค่า HbA1c ที่ได้จากการตรวจติดตามสุขภาพประจำปี มีอัตราการอุบัติการณ์การเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตาและที่ตา ร่วมกับไต น้อยกว่ากลุ่มที่มีค่า average eHbA1c ไม่สอดคล้องกับค่า HbA1c จากการตรวจติดตามสุขภาพประจำปี แต่ในกลุ่มที่มีค่า average eHbA1c สอดคล้อง และไม่สอดคล้องกับค่า HbA1c ที่ได้จากการตรวจติดตามสุขภาพประจำปีกลับมีอัตราการอุบัติการณ์การเกิดโรคแทรกซ้อนที่ไตไม่แตกต่างกันและผลการศึกษานี้จำนวนมากยังพบว่า การที่ผู้ป่วยมีภาวะความดันโลหิตสูงร่วมด้วย

ถือเป็นปัจจัยสำคัญในการทำให้เกิดโรคแทรกซ้อนที่ไตของผู้ป่วยโรคเบาหวาน⁽²⁴⁻²⁶⁾ รวมทั้งผลการคำนวณ eHbA1c เป็นค่าเฉลี่ยที่คำนวณมาจากผลการตรวจน้ำตาลปลายนิ้วซึ่งยังมีการศึกษาไม่มากจึงอาจมีผลให้เกิดความคลาดเคลื่อนได้ แต่ปัจจุบันมีการศึกษาความสัมพันธ์ของจำนวนครั้งในการควบคุมระดับน้ำตาลอย่างต่อเนื่อง (time in range; TIR) หรือความกว้างของระดับน้ำตาลในเลือด (glucose variability; GV) กับการเกิดโรคแทรกซ้อนต่าง ๆ ซึ่งเป็นไปในแนวทางเดียวกันกับการศึกษานี้ เช่น ในปี พ.ศ. 2561 Lu และคณะ พบว่าผู้ป่วยที่มีโรคแทรกซ้อนที่ตาอย่างรุนแรงจะมี TIR ต่ำ และ GV สูงกว่าผู้ป่วยรายที่มีความรุนแรงน้อยกว่า ($p < 0.01$)⁽²⁷⁾ ในปี พ.ศ. 2565 Lachin และคณะ พบว่า TIR มีความสัมพันธ์กับโรคแทรกซ้อนที่ตาและโรคแทรกซ้อนร่วมที่ตาและไตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ⁽²⁸⁾ กรณีที่โรคแทรกซ้อนที่ไตไม่พบความสัมพันธ์กับ TIR หรือ GV เนื่องจากมีปัจจัยอื่นร่วมด้วย ได้แก่ ระยะเวลาการเป็นโรคเบาหวาน ภาวะความดันโลหิตสูง ภาวะอ้วนลงพุง และการที่ผู้ป่วยมีไขมันในเลือดสูง ส่งผลให้ภาวะน้ำตาลสูงในเลือดเพียงอย่างเดียวไม่มีความสัมพันธ์โดยตรง⁽²⁹⁾

เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาแบบย้อนหลัง (retrospective cohort study) ในช่วงระยะเวลาเพียง 10 ปี ซึ่งเป็นข้อจำกัดของการศึกษา จึงมีข้อเสนอแนะให้เพิ่มระยะเวลาในการศึกษาเป็น 15-20 ปี เพื่อให้เห็นพัฒนาการของโรคแทรกซ้อนที่ตา ไต และตา ร่วมกับไตได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้นในกลุ่มที่มีการควบคุมระดับน้ำตาลได้ดี และใช้กลุ่มตัวอย่างเป็นผู้ป่วยที่ไม่มีโรคความดันโลหิตสูงร่วมเพื่อให้ได้ผลการศึกษาโรคแทรกซ้อนที่ไต โดยไม่มีโรคความดันโลหิตสูงเป็นปัจจัยรบกวนในการเกิดโรคแทรกซ้อนที่ไต

สรุปผล

การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการตรวจ HbA1c จากการตรวจติดตามสุขภาพประจำปี เพียงปีละ 1 ครั้ง อาจไม่เพียงพอสำหรับการดูแลผู้ป่วยโรคเบาหวาน โดยเฉพาะในกลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวานที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ไม่ดี ซึ่งพบปัญหาความไม่สอดคล้องของค่า HbA1c ที่ได้จากการตรวจติดตามสุขภาพประจำปี กับค่า average eHbA1c มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคแทรกซ้อน ทั้งที่ตา และที่ไต อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นจึงควรให้มีการเพิ่มการตรวจ HbA1c เป็นอย่างน้อยปีละ 2 ครั้ง ในช่วงต้นปีงบประมาณและกลางปีงบประมาณ หรือหลังเปลี่ยนวิธีการรักษา เช่น หลังการปรับสูตรยา หรือเปลี่ยนจากการรับประทานยาเป็นการฉีดอินซูลิน เพื่อป้องกันการเกิดโรคแทรกซ้อนที่ตาและที่ไต ช่วยเพิ่มคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยโรคเบาหวานได้มากขึ้น งานวิจัยนี้สอดคล้องกับนโยบายของสำนักงานประกันสุขภาพแห่งชาติ ที่ได้เริ่มปรับให้มีการชดเชยการจ่ายค่าตรวจติดตามสุขภาพประจำปีของผู้ป่วยโรคเบาหวาน ในรายการตรวจ HbA1c โดยกำหนดให้สามารถเบิกจ่ายได้เพิ่มขึ้นเป็นปีละ 2 ครั้ง ครั้งละไม่เกิน 150 บาท เพื่อติดตามพฤติกรรมควบคุมระดับน้ำตาลของผู้ป่วยโรคเบาหวานได้อย่างใกล้ชิดมากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้อำนวยการโรงพยาบาลที่อนุญาตให้ใช้ข้อมูลในการทำวิจัย และขอบพระคุณเจ้าหน้าที่คลินิกโรคเรื้อรัง ตลอดจนเจ้าหน้าที่กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์โรงพยาบาลพรหมคีรี ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บข้อมูล ในการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Rawaranggoon W. Prevention of Diabetic Retinopathy in Type 2 Diabetic Patients Nunah Hospital Bangkok. Chiangrai Med J 2017; 9: 73-82. (in Thai)
2. Department of Medical Service. Systematic management for diabetic retinopathy screening at the provincial level. Nonthaburi: Srmaung Kan Pim; 2012. (in Thai)
3. Misnisty of Public Health. Preventive and treatment guidelines of diabetes complication (retinopathy, nephropathy, neuropathy): O-Wit Company Limited (Thailand); 2010. (in Thai)
4. Department of Medical Service. Guidelines for screening and treatment for diabetes retinopathy: Printing House of the Agricultural Cooperative Association of Thailand Limited; 2012. (in Thai)
5. American Diabetes Association; Standards of medical care in diabetes-2021 abridged for primary care providers. Clin Diabetes 2021; 39: 14-43.
6. Hirsch IB, Brownlee M. Should minimal blood glucose variability become the gold standard of glycemic control? J Diabetes Complications 2005; 19: 178-81.
7. Renard E. Monitoring glycemic control: the importance of self-monitoring of blood glucose. Am J Med 2005; 118: 12-9.
8. Swamy NA, Mulimani M. Combined detection of prediabetes using HbA1c and fasting blood sugar levels. Int J Health Res 2021; 4: 248-51

9. Nathan DM, Kuenen J, Borg R, *et al.* Translating the A1C assay into estimated average glucose values [published correction appears in *Diabetes Care* 2009; 32: 207]. *Diabetes Care* 2008; 31: 1473-8.
10. Weykamp C. HbA1c: a review of analytical and clinical aspects. *Ann Lab Med* 2013; 33: 393-400.
11. Loh TP, Smith AF, Bell KJ, *et al.* Setting analytical performance specifications using HbA1c as a model measurand. *Clin Chim Acta* 2021; 523: 407-14.
12. Little RR, Rohlfing CL, Sacks DB, Committee ftNGSPS?. Status of Hemoglobin A1c Measurement and Goals for Improvement: From Chaos to Order for Improving Diabetes Care. *Clin Chem* 2011; 57: 205-14.
13. Sompunga W, Pramual P. Development and evaluation of participatory self-management in behavior modification on glycemic control in uncontrolled type 2 diabetes patients, Sisaket Province. *Res and Dev Health Sys J* 2022; 15: 273-87. (in Thai)
14. Duangsanjun W, Sangsuwan T, Poncumhak P. Perceived Behavioral Control and Food Consumption Behaviors Among Older Persons with Uncontrolled Diabetes. *Reg Health Pro Cent* 9 J 2021; 15: 428-42. (in Thai)
15. Harada Y, Harada K, Chin Jr P. Comparing self monitoring blood glucose devices and laboratory tests: over 25 years experience. *Cureus* 2019; 11: e6268.
16. Lima VC, Cavalieri GC, Lima MC, Nazario NO, Lima GC. Risk factors for diabetic retinopathy: a case-control study. *Int J Retin Vitr* 2016; 2: 1-7.
17. Ting DSW, Cheung GCM, Wong TY. Diabetic retinopathy: global prevalence, major risk factors, screening practices and public health challenges: a review. *Clini experiment ophthalmol* 2016; 44: 260-77.
18. Yau JW, Rogers SL, Kawasaki R, *et al.* Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes care* 2012; 35: 556-64.
19. Wagnew F, Eshetie S, Kibret GD, *et al.* Diabetic nephropathy and hypertension in diabetes patients of sub-Saharan countries: a systematic review and meta-analysis. *BMC research notes* 2018; 11: 1-7.
20. Lou J, Jing L, Yang H, Qin F, Long W, Shi R. Risk factors for diabetic nephropathy complications in community patients with type 2 diabetes mellitus in Shanghai: logistic regression and classification tree model analysis. *Int J Health Plan* 2019; 34: 1013-24.
21. Tamru K, Aga F, Berhanie E, Aynalem YA, Shiferaw WS. Incidence of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes mellitus at a tertiary healthcare setting in Ethiopia. *Diabetes Metab Syndr* 2020; 14: 1077-83.

22. van Wijngaarden RP, Overbeek JA, Heintjes EM, *et al.* Relation between different measures of glycemic exposure and microvascular and macrovascular complications in patients with type 2 diabetes mellitus: an observational cohort study. *Diabetes Ther* 2017; 8: 1097-109.
23. Li S, Nemeth I, Donnelly L, Hapca S, Zhou K, Pearson ER. Visit-to-visit HbA1c variability is associated with cardiovascular disease and microvascular complications in patients with newly diagnosed type 2 diabetes. *Diabetes care* 2020; 43: 426-32.
24. Long AN, Dagogo-Jack S. Comorbidities of diabetes and hypertension: mechanisms and approach to target organ protection. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2011; 13: 244-51
25. Wagnew F, Eshetie S, Kibret GD, *et al.* Diabetic nephropathy and hypertension in diabetes patients of sub-Saharan countries: a systematic review and meta-analysis. *BMC Res Notes* 2018; 11: 565.
26. Duan J, Wang C, Liu D, *et al.* Prevalence and risk factors of chronic kidney disease and diabetic kidney disease in Chinese rural residents: a cross-sectional survey. *Sci rep* 2019; 9: 1-11.
27. Lu J, Ma X, Zhou J, *et al.* Association of time in range, as assessed by continuous glucose monitoring, with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2018; 41: 2370-6.
28. Lachin JM, Bebu I, Gao X, *et al.* Association of Estimated Time-in-Range Capillary Glucose Levels Versus HbA1c With Progression of Microvascular Complications in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes care* 2022; 45: 2445-8.
29. Tziomalos K, Athyros VG. Diabetic Nephropathy: New Risk Factors and Improvements in Diagnosis. *Rev Diabet Stud* 2015; 12: 110-8.

Incidence of Dengue Virus Infection and Dengue Serotypes Changed in Ratchaburi Province During 2012-2020

Arisara Posanacharoen^{1,2}, Sumalee Chanama², Pattara Wongjaroen², Sarinee Chumnanruksa², Laddawan Meephaendee², Wararat Jamfa², Pornsiri Somasa², Husneeyah Vateh², Sirirat Naemkhunthot², Naruphong Phunikom², Pongsiri Tanthong², Archawin Rojanawiwat², Worada Samosornsuk³ and Seksun Samosornsuk^{3*}

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

²National Institute of Health, Department of Medical Science, Ministry of Public Health, Nonthaburi Province, Thailand

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

Abstract

Dengue fever, dengue hemorrhagic fever, and dengue shock syndrome are the groups of diseases caused by the dengue virus infection with the mosquito, *Aedes aegypti*, as the major vector. Dengue viruses are classified into four serotypes including dengue-1, dengue-2, dengue-3, and dengue-4. In every year, Ratchaburi is one of the provinces in Thailand where the incidence rates of dengue virus infection are high. This study aims to monitor dengue serotype changes in dengue fever, dengue hemorrhagic fever, and dengue shock syndrome patients in Ratchaburi province during 2012-2020. The 1,027 samples were tested for dengue virus RNA by real time RT-PCR. The results found that real time RT-PCR positive cases ranged from 37.6-74.7%. The prevalence rates of DENV-1, DENV-2, DENV-4 and DENV-3 were detected as 36.5%, 26.3%, 20.6% and 16.4%, respectively, including 0.2% of co-infection between DENV-2 and DENV-3. Notably, all four dengue serotypes were circulated in Ratchaburi province. DENV-1 was found every year, while DENV-3 and DENV-4 decreased in the last 5 years (since 2016). The number of DENV-2 has also decreased and until the year 2018 onwards, it has been increasing continuously. Within 2,106 patient

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

cases, antibodies detection against dengue virus were 48.6-95.9%, with 0-20% of primary infection and 80-100% of secondary infection. The information obtained from this study notifies the epidemiology, outbreak pattern, and dengue serotype data, which will be useful for dengue control and vaccine research and development to cover the strains of the dengue virus.

Keywords: Dengue virus, Dengue fever, Dengue hemorrhagic fever, Serotypes

อุบัติการณ์การติดเชื้อและซีโรทัณฑ์ไวรัสเดงกีในจังหวัดราชบุรี ระหว่างปี พ.ศ. 2555-2563

อริสรา โปษณเจริญ^{1,2} สุมาลี ชะนะมา² ภัทร วงษ์เจริญ² สาริณี ชำนาญรักษา²
ลัดดาวัลย์ มีแผนดี² วรารัตน์ แจ่มฟ้า² พรศิริ โสมาสา² สุสนีย์ยะห์ วาเต๊ะ²
ศิริรัตน์ แนนขุนทด² นฤพงศ์ ภูนิคม² พงศ์ศิริ ตาลทอง² อาชวินทร์ โรจนวิวัฒน์²
วรดา สโมสรรสุข³ และ เสกสรรค์ สโมสรรสุข^{3*}

¹บัณฑิตศึกษา สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี

²สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี

³ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี

บทคัดย่อ

โรคไข้เดงกี ไข้เลือดออกเดงกี และไข้เลือดออกช็อก เป็นกลุ่มโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี ที่มียุงลาย *Aedes aegypti* เป็นพาหะนำโรคที่สำคัญ ไวรัสเดงกีประกอบด้วย 4 ซีโรทัณฑ์ คือ เดงกี-1 เดงกี-2 เดงกี-3 และเดงกี-4 จังหวัดราชบุรีเป็นจังหวัดหนึ่งในพื้นที่ของประเทศไทยที่พบอุบัติการณ์ของไวรัสเดงกีสูงในทุกปี งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงซีโรทัณฑ์ของไวรัสเดงกีจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อ ในจังหวัดราชบุรี ระหว่างปี พ.ศ. 2555-2563 โดยศึกษาสารพันธุกรรมของเชื้อด้วยวิธี real time RT-PCR จำนวน 1,027 ราย พบผลบวกของเชื้อร้อยละ 37.6-74.7 สายพันธุ์ที่พบเรียงตามความชุกคือเชื้อเดงกี-1 เชื้อเดงกี-2 เชื้อเดงกี-4 และเชื้อเดงกี-3 โดยพบร้อยละ 36.5, 26.3, 20.6 และ 16.4 ตามลำดับ รวมทั้งมีการติดเชื้อร่วมกันของเชื้อเดงกี-2 และเดงกี-3 ร้อยละ 0.2 จึงเห็นได้ว่าไวรัสเดงกีที่ตรวจพบในจังหวัดราชบุรีมีการหมุนเวียนครบทั้ง 4 ซีโรทัณฑ์ โดยที่เชื้อเดงกี-1 พบได้ทุก ๆ ปี ในขณะที่เดงกี-3 และเดงกี-4 เริ่มลดลงในช่วง 5 ปีหลัง (ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2559) ส่วนเชื้อเดงกี-2 มีจำนวนลดต่ำลง จนกระทั่งในปี พ.ศ. 2561 เป็นต้นไป พบจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง นอกจากนี้ยังศึกษาการติดเชื้อเดงกีจาก Antibody ด้วยวิธี Ab capture ELISA จำนวน 2,106 ราย พบผลบวกร้อยละ 48.6-95.9 ซึ่งเป็นการติดเชื้อครั้งแรกร้อยละ 0-20 และติดเชื้อเดงกีซ้ำร้อยละ 80-100 ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้ทำให้ทราบสถานการณ์ รูปแบบการระบาด และข้อมูลซีโรทัณฑ์ของไวรัสเดงกี ซึ่งจะช่วยให้เป็นประโยชน์ต่อหน่วยงานที่เกี่ยวข้องในการควบคุมโรคไข้เลือดออกเดงกี รวมไปถึงการวิจัยพัฒนาวัคซีนให้ครอบคลุมสายพันธุ์ของไวรัสเดงกีต่อไป

คำสำคัญ: เชื้อไวรัสเดงกี ไข้เดงกี ไข้เลือดออกเดงกี ซีโรทัณฑ์

บทนำ

ไข้เลือดออกเดงกี (Dengue hemorrhagic fever; DHF) เป็นโรคที่พบแพร่กระจายในประเทศเขตร้อนมานานกว่า 200 ปี ต่อมาหลังสงครามโลกครั้งที่ 2 เริ่มมีการระบาดเพิ่มขึ้น และพบกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการโรคที่รุนแรง มีภาวะเลือดออกและภาวะช็อกโดยมีอัตราตายสูง และในปัจจุบันโรคไข้เลือดออกเดงกียังเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญในหลายประเทศทั่วโลก เนื่องจากโรคนี้สามารถแพร่กระจายอย่างกว้างขวางและพบรายงานจำนวนผู้ป่วยที่เพิ่มขึ้นอย่างมากในระยะเวลา 40 ปีที่ผ่านมา ประเทศไทยเริ่มพบโรคไข้เลือดออกตั้งแต่ปี พ.ศ. 2492 การระบาดครั้งใหญ่ที่สุดเกิดขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2530 มีผู้ป่วยทั้งสิ้น 174,285 ราย อัตราป่วย 325.13 ต่อแสนประชากร เสียชีวิต 1,008 ราย อัตราป่วยตายร้อยละ 0.58 และยังคงพบการระบาดครั้งใหญ่ ที่มีอัตราป่วยสูงในปีต่อมาอีกหลายครั้ง⁽¹⁾

ไวรัสเดงกี จัดเป็น RNA virus ใน Family *Flaviviridae* Genus *Flavivirus*⁽²⁾ ไวรัสเดงกีแบ่งออกเป็น 4 ซีโรทัยป์ คือ เดงกี-1 เดงกี-2 เดงกี-3 และเดงกี-4 ประเทศในเขตร้อนส่วนใหญ่เป็นพื้นที่ที่มีไวรัสเดงกีทั้ง 4 ซีโรทัยป์แพร่กระจายอยู่ จึงทำให้ผู้ที่อยู่ในพื้นที่ดังกล่าวมีโอกาสเกิดโรคไข้เลือดออกมากขึ้น ไวรัสเดงกีแต่ละซีโรทัยป์มีแอนติเจนบางส่วนที่แสดงลักษณะเฉพาะและแอนติเจนบางส่วนเป็นแอนติเจนร่วมของกลุ่ม *Flavivirus* แอนติบอดีที่เกิดขึ้นหลังการติดเชื้อไวรัสเดงกีจะทำปฏิกิริยาจับกับแอนติเจนของซีโรทัยป์นั้น และสามารถทำปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับแอนติเจนของ *Flavivirus* ตัวอื่น ๆ ในระดับสูง^(3,4) เมื่อมีการติดเชื้อไวรัสเดงกีซีโรทัยป์ใดซีโรทัยป์หนึ่งแล้วจะมีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสเดงกีซีโรทัยป์นั้นอย่างถาวรตลอดชีวิต แต่มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสเดงกีอีก 3

ซีโรทัยป์ในช่วงระยะเวลาสั้น ๆ เพียง 2-3 เดือน หรืออาจนานถึง 6-12 เดือน การติดเชื้อไวรัสเดงกีในคนส่วนใหญ่ (ประมาณร้อยละ 90) มักไม่แสดงอาการ มีเพียงร้อยละ 3 เท่านั้นที่แสดงอาการอย่างรุนแรง ลักษณะอาการทางคลินิกของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีแบ่งเป็น 4 แบบคือ 1) ไข้ไม่ทราบสาเหตุ (Undifferentiated fever; UF); 2) ไข้เดงกี (Dengue fever; DF); 3) ไข้เลือดออกเดงกี (Dengue hemorrhagic fever; DHF) และ 4) ถ้ามีการรั่วของพลาสมาออกนอกหลอดเลือดมาก ผู้ป่วยจะมีภาวะช็อกเกิดขึ้นที่เรียกว่าไข้เลือดออกช็อก (Dengue shock syndrome; DSS)⁽⁵⁻⁷⁾

การจำแนกซีโรทัยป์ของไวรัสเดงกีในผู้ป่วยมีความสำคัญต่อการรักษาทางระบาดวิทยา ทำให้เข้าใจสถานการณ์และปัจจัยเสี่ยงของการระบาดมากขึ้น รวมทั้งประโยชน์ต่อการพยากรณ์การระบาดและความรุนแรงของโรค การตรวจพบซีโรทัยป์ของไวรัสเดงกีที่เปลี่ยนไปในระยะ 3 เดือน สามารถพยากรณ์สถานการณ์ของการระบาดที่จะเกิดขึ้นต่อเนื่องได้⁽⁸⁾ นอกจากนี้การติดเชื้อซ้ำด้วยไวรัสเดงกีซีโรทัยป์ที่ต่างจากการติดเชื้อซีโรทัยป์แรกเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญต่อการเกิดอาการที่รุนแรง การติดเชื้อซ้ำด้วยเดงกี-2 และเดงกี-3 มีอัตราเสี่ยงสูงที่จะเกิดโรคไข้เลือดออกชนิดที่รุนแรงมากกว่าการติดเชื้อซ้ำด้วยซีโรทัยป์อื่น⁽⁹⁾ การตรวจซีโรทัยป์ของไวรัสเดงกีนิยมตรวจ 2 วิธี คือ การแยกเชื้อไวรัสด้วยเซลล์เพาะเลี้ยงหรือฉีดเชื้อไวรัสเข้าตัวงูโดยตรง แล้วตรวจหาเชื้อไวรัส ซึ่งจะพบเฉพาะเชื้อไวรัสที่ยังมีชีวิตเท่านั้น ส่วนการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อโดยวิธี real time reverse transcription polymerase chain reaction (real time RT-PCR) เป็นวิธีที่นิยมแพร่หลายในปัจจุบัน ใช้ตรวจหาเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อหลายชนิดพร้อม ๆ กันได้ รวมทั้งโรคไข้เลือดออกด้วย ทำให้

สะดวกและง่ายขึ้น⁽¹⁰⁾

เนื่องจากจังหวัดราชบุรีเป็นจังหวัดที่มีการระบาดของไวรัสเดงกีอย่างต่อเนื่อง มีอุบัติการณ์ของโรคไข้เลือดออกสูงทุกปี มีการหมุนเวียนของเชื้อไวรัสเดงกีในพื้นที่ในระดับที่สูง เนื่องจากเป็นเขตชายแดนประเทศไทย ซึ่งมีลักษณะทางภูมิศาสตร์ที่มีทั้งป่าและสังคมเมือง ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงซีโรทัยป์ของไวรัสเดงกีจากการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเดงกีโดยวิธี real time RT-PCR และการตรวจหาสถานภาพของการติดเชื้อครั้งแรกหรือติดเชื้อซ้ำจากแอนติบอดีชนิด IgM และ IgG ต่อเชื้อโดยวิธี ELISA ในผู้ป่วยไข้เดงกีและไข้เลือดออกเดงกี และไข้เลือดออกช็อกในจังหวัดราชบุรี

วัตถุประสงค์และวิธีการ

1. ตัวอย่างใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างเลือดผู้ป่วยซึ่งได้รับการวินิจฉัยจากอาการทางคลินิกด้วยโรคไข้เดงกี (Dengue fever, DF) ไข้เลือดออกเดงกี (Dengue hemorrhagic fever, DHF) หรือไข้เลือดออกช็อก (Dengue shock syndrome, DSS) ซึ่งเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลราชบุรี จังหวัดราชบุรี เป็นระยะเวลา 9 ปี ระหว่างปี พ.ศ. 2555-2563 จำนวน 2,106 ราย ได้รับการตรวจกรองทางห้องปฏิบัติการด้วย Dengue NS1 Ag จากชุด Rapid test (SD Bioline, South Korea) ในการศึกษานี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างซีรัม 2 ครั้ง ครั้งแรกในขณะที่ผู้ป่วยมาโรงพยาบาล และครั้งที่ 2 นัดห่างจากวันเริ่มป่วย 10-17 วัน ซึ่งจะเก็บซีรัมทั้งสองครั้งไว้ที่ -20°C เพื่อตรวจหาสถานภาพการติดเชื้อของไวรัสเดงกี และ serotype ของเชื้อเดงกีต่อไป งานวิจัยนี้ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์

(COE No.21/2563)

2. การตรวจหาสารพันธุกรรมโดยวิธี Real time RT-PCR

ตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยที่เก็บครั้งแรกนับจากวันเริ่มมีอาการป่วย 0-5 วัน จำนวน 1,027 ราย ทดสอบหาสารพันธุกรรมตรวจหาซีโรทัยป์ของเชื้อเดงกีด้วย real time PCR ณ ห้องปฏิบัติการฝ่ายอาชีวไวรัส สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยสกัดอาร์เอ็นเอเลือด 100 µL ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป QIAamp viral RNA kit (QIAGEN, Germany) จากนั้นนำอาร์เอ็นเอที่ได้ไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยวิธี Real time RT-PCR ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป abTEST™ DENV/CHIKU5 qPCR II kit (ATI biotech, Singapore) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต⁽¹¹⁾ ด้วยเครื่อง ABI 7500 ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต การแปลผลซีโรทัยป์ของเชื้อเดงกี หลังจากพบ amplification curve ซึ่งมีค่า Ct น้อยกว่าหรือเท่ากับ 40 ในกรณีเกิดที่ target สี Cy5, สี FAM, สี Texas Red และ สี TAMRA สรุปผลเป็นเดงกี-1 เดงกี-2 เดงกี-3 และ เดงกี-4 ตามลำดับ

3. การตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM และ IgG ด้วยวิธี Antibody capture ELISA

ตัวอย่างเลือดผู้ติดเชื้อเดงกีที่เจาะทั้ง 2 ครั้ง ในครั้งแรกและครั้งที่ 2 จำนวน 2,106 ราย นำส่งตรวจหา Ab ชนิด IgM และ IgG ต่อเชื้อไวรัสเดงกีและวิเคราะห์สถานภาพของการติดเชื้อครั้งแรกหรือติดเชื้อซ้ำ ณ ฝ่ายอาชีวไวรัส สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยตรวจชนิดและปริมาณ IgM และ IgG ต่อเชื้อไวรัสเดงกี วิธี Ab capture ELISA (Cappel, Ohio, USA)

ตามวิธีของ Innis และคณะ⁽¹²⁾ การแปลผล Dengue IgM เป็นผลบวกเมื่อค่า IgM มากกว่าหรือเท่ากับ 40 ยูนิต และ Dengue IgG เป็นผลบวกเมื่อค่า IgG มากกว่าหรือเท่ากับ 100 ยูนิต ในกรณีสัดส่วนระหว่าง IgM และ IgG มากกว่าหรือเท่ากับ 1.8 และระยะห่างระหว่างเลือดครั้งแรกและครั้งที่ 2 ห่างกันตั้งแต่ 7 วัน ขึ้นไป แสดงว่า ผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเดงกีครั้งแรก (Primary infection) ในกรณีสัดส่วนระหว่าง IgM และ IgG น้อยกว่า 1.8 และระยะห่างระหว่างเลือดครั้งแรกและครั้งที่ 2 ห่างกันไม่เกิน 17 วัน แสดงว่า ผู้ป่วยมีการติดเชื้อซ้ำ (Secondary infection)⁽¹³⁾

ผลการวิจัย

ผู้ป่วยเดงกีที่ได้รับการวินิจฉัยทางคลินิกด้วย ไข้เลือดออกเดงกี หรือไข้เลือดออกช็อก จำนวนทั้งสิ้น 2,106 รายหรือร้อยละ 14 ที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลราชบุรี ในช่วงปี พ.ศ. 2555-2563 ซึ่งแยกจำนวนผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเดงกีในแต่ละปี ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2555, 2556, 2557, 2558, 2559, 2560, 2561, 2562 และ 2563 ได้เป็น 451 (ร้อยละ 27.8), 395 (ร้อยละ 29.6), 284 (ร้อยละ 28.6), 428 (ร้อยละ 9.8), 72 (ร้อยละ 18.4), 102 (ร้อยละ 15.8), 159 (ร้อยละ 9.0), 173 (ร้อยละ 9.0) และ 42 (ร้อยละ 4.3) ตามลำดับ โดยพบจำนวนผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเดงกีสูงสุดในปี พ.ศ. 2558 (จำนวน 428 ราย) แต่ในปีถัดไป (พ.ศ. 2559) พบจำนวนผู้ป่วยเริ่มลดน้อยลงต่ำสุด (72 ราย) การศึกษาทางห้องปฏิบัติการในผู้ติดเชื้อเดงกีตรวจพบแอนติบอดีชนิด IgM และ/หรือ IgG วิธี ELISA ร้อยละ 48.6-95.9 และยืนยันการตรวจพบสารพันธุกรรมด้วยวิธี real time RT-PCR ร้อยละ 37.6-74.7 (Table 1) จากการวิเคราะห์สถานภาพการติดเชื้อจากแอนติบอดีในช่วงเวลาที่ศึกษา พบเป็นการติดเชื้อครั้งแรกเพียงร้อยละ 0-20

แต่เป็นผู้ที่ติดเชื้อซ้ำร้อยละ 80-100 (Table 2) โดยอยู่ในกลุ่มผู้ป่วยโรคไข้เดงกี (DF) ร้อยละ 58.6-80.1 ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกเดงกี (DHF) ร้อยละ 16.6-35.9 ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกช็อก (DSS) ร้อยละ 1.3-12.9 แสดงว่าการติดเชื้อซ้ำมีอาการไม่รุนแรง

ในกลุ่มผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกีได้ส่งตรวจหาสารพันธุกรรม โดยวิธี real time RT-PCR ทั้งหมด 1,027 ราย พบผลบวก 602 ราย (ร้อยละ 58.6) และในภาพรวมสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสเดงกีที่พบเรียงลำดับดังนี้ เชื้อไวรัสเดงกี-1 เดงกี-2 เดงกี-4 และเดงกี-3 พบร้อยละ 36.5 (220 ราย) ร้อยละ 26.3 (158 ราย) ร้อยละ 20.6 (124 ราย) และร้อยละ 16.4 (99 ราย) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบการติดเชื้อร่วมกันของเชื้อไวรัสเดงกี-2 และเชื้อไวรัสเดงกี-3 ร้อยละ 0.2 (1 ราย) (Fig. 1) โดยที่ซีโรทัยป์ที่พบสูงเด่นระหว่างปี พ.ศ. 2555-2563 ในแต่ละปีสลับกันไปมา (Fig. 2) โดยที่เชื้อไวรัสเดงกี-1 เป็นซีโรทัยป์พบได้ทุกปี ในขณะที่เดงกี-2 เค้นในช่วงแรก (ปี 2555-2556) แต่เริ่มลดลงชัดเจนในปี พ.ศ. 2557 และขึ้นมาใหม่ในช่วงหลัง (พ.ศ. 2561 เป็นต้นไป) ส่วนเดงกี-3 และเดงกี-4 พบในช่วงกลางๆ (พ.ศ. 2557-2559 และปี พ.ศ. 2557-2560 ตามลำดับ) นอกจากนี้ในปี พ.ศ. 2562 ยังพบการติดเชื้อ 2 ซีโรทัยป์ร่วมกัน (เดงกี-2 และเดงกี-3) จำนวน 1 ราย

เมื่อวิเคราะห์สถานภาพของการติดเชื้อเดงกีในผู้ป่วย พบว่าติดเชื้อครั้งแรกด้วยไวรัสเดงกี-1 เดงกี-2 เดงกี-3 และเดงกี-4 ร้อยละ 59.4, 18.8, 17.2 และ 4.7 ตามลำดับ ในขณะที่พบผู้ติดเชื้อซ้ำด้วยไวรัสเดงกี-1 เดงกี-2 เดงกี-4 และเดงกี-3 ร้อยละ 31.9, 28.2, 25.0 และ 14.6 ตามลำดับ (Fig. 3) ในผู้ป่วยไข้เดงกี (DF) เกิดจากเชื้อไวรัสเดงกี-1 เดงกี-2 เดงกี-4 และเดงกี-3 ร้อยละ 37.6, 24.3, 20.4 และ 17.4 ตามลำดับในผู้ป่วยไข้เลือดออกเดงกี

(DHF) เกิดจากเชื้อไวรัสเดงกี-1 เดงกี-2 เดงกี-4 พบว่าเกิดจากเชื้อไวรัสเดงกี-4 เดงกี-1 เดงกี-2 และ เดงกี-3 ร้อยละ 32.7, 32.0, 23.1 และ 12.2 เดงกี-3 ร้อยละ 38.5, 26.9, 23.1 และ 11.5 ตามลำดับ ในขณะที่ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกช็อกกลับ ตามลำดับ (Fig. 4)

Table 1 Number of dengue positive Ab (IgM and/or IgG) and/or dengue genome in dengue patients.

Year B.E.	Positive dengue Ab by ELISA (total tested)	Positive dengue genome by real time RT-PCR (total tested)
2555	83.8% (n = 451)	46.2% (n = 117)
2556	95.9% (n = 395)	45.9% (n = 74)
2557	89.4% (n = 284)	37.6% (n = 178)
2558	86.2% (n = 428)	74.7% (n = 312)
2559	48.6% (n = 72)	50.0% (n = 46)
2560	79.4% (n = 102)	72.9% (n = 59)
2561	84.9% (n = 159)	56.2% (n = 73)
2562	70.5% (n = 173)	60.9% (n = 128)
2563	81.0% (n = 42)	72.5% (n = 40)
	Total (n = 2,106)	Total (N = 1,027)

Table 2 Occurrence of dengue primary infection and secondary infection by years during 2555-2563.

Year B.E. (total tested = 1,174)	Dengue infection as determined by ELISA	
	Primary infection (%)	Secondary infection (%)
2555 (n = 233)	42 (18.8%)	181 (81.2%)
2556 (n = 190)	38 (20%)	152 (80.0%)
2557 (n = 98)	15 (15.3%)	83 (84.7%)
2558 (n = 303)	36 (11.9%)	267 (88.1%)
2559 (n = 27)	0 (0%)	27 (100%)
2560 (n = 74)	14 (18.9%)	60 (81.1%)
2561 (n = 116)	20 (17.2%)	96 (82.8%)
2562 (n = 104)	16 (15.4%)	88 (84.6%)
2563 (n = 29)	2 (6.9%)	27 (93.1%)

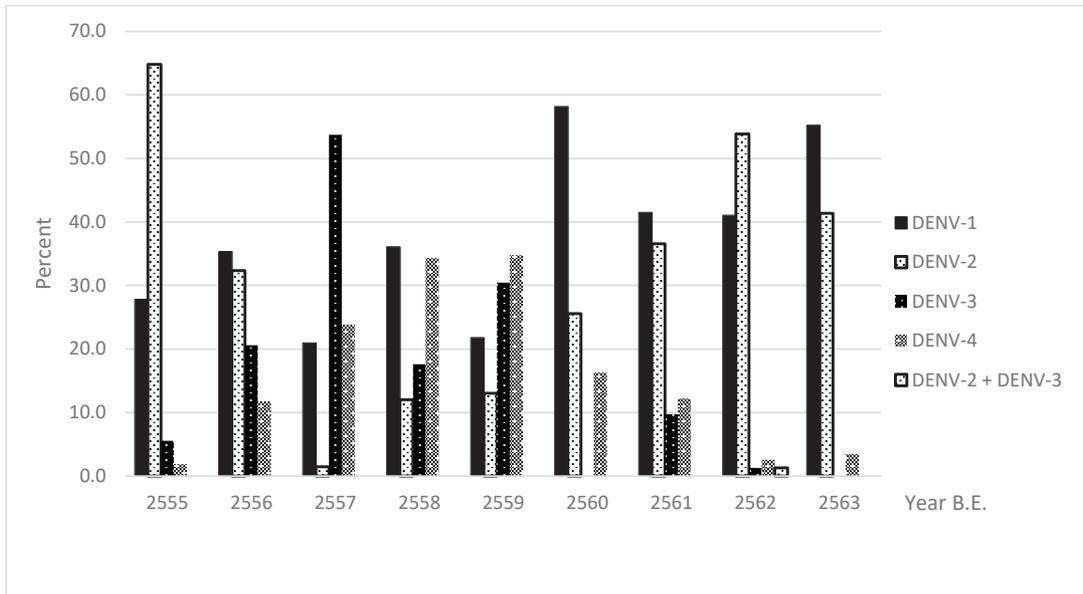


Fig. 1 Distribution of serotypes dengue infection in Ratchaburi province during 2555-2563.

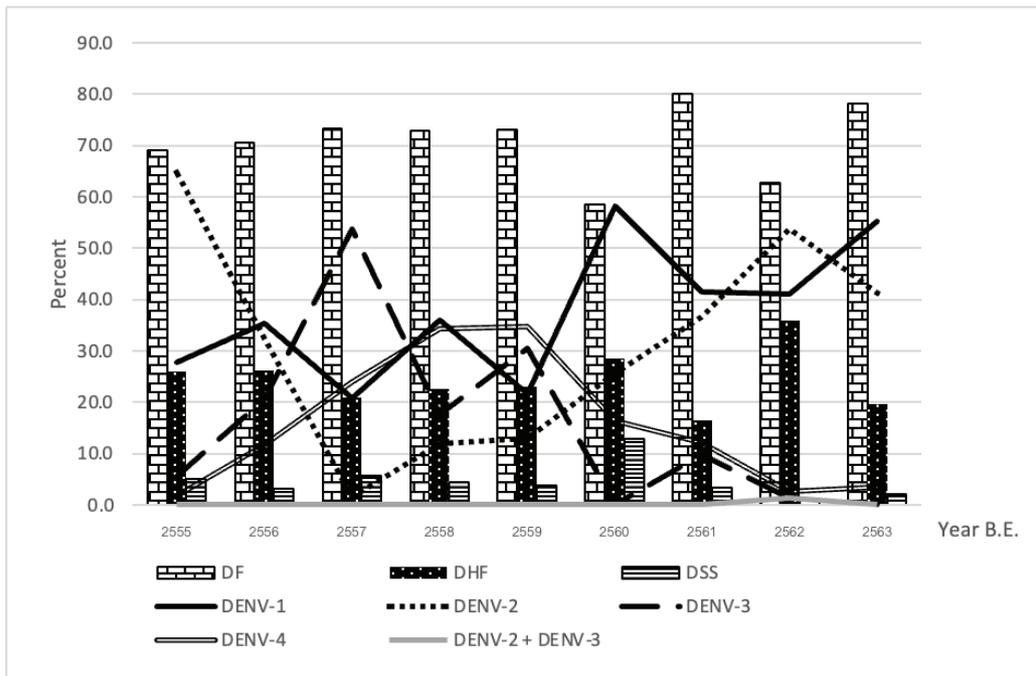


Fig. 2 Percentage of dengue manifestations; dengue fever (DF), dengue hemorrhagic fever (DHF), and dengue shock syndrome (DSS) vs dengue serotypes.

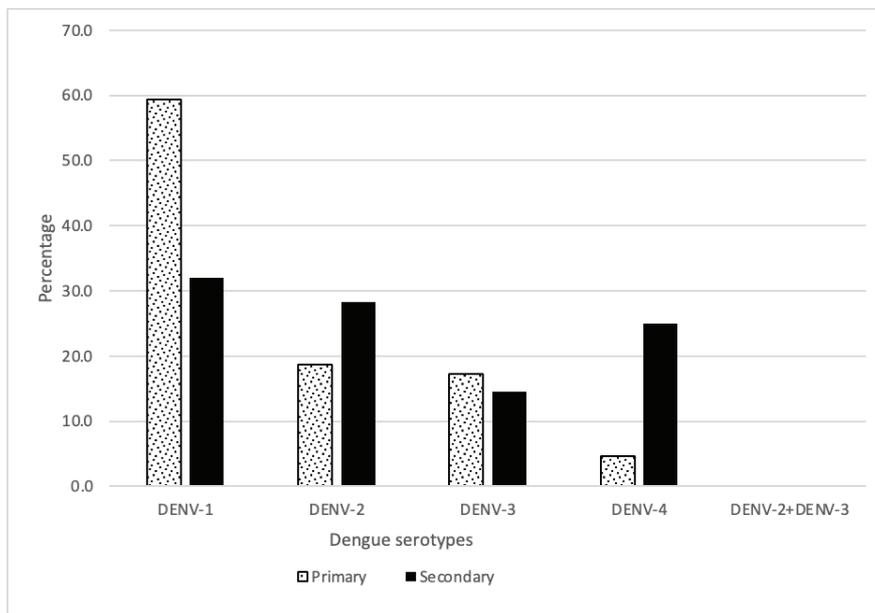


Fig. 3 Percentage of primary and secondary dengue infection in dengue patients vs serotypes.

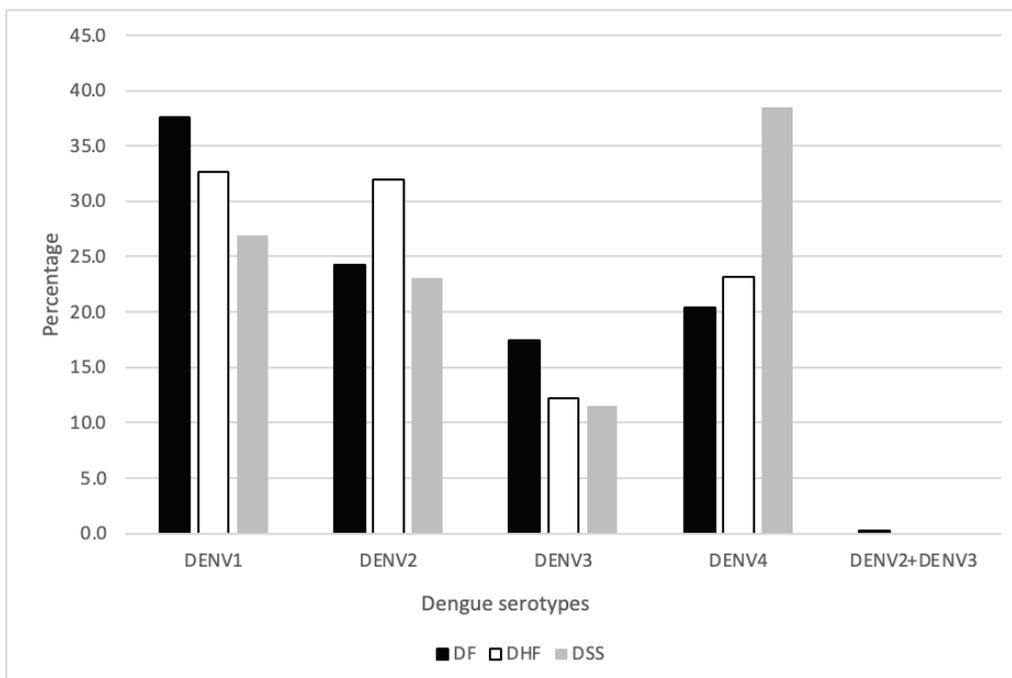


Fig. 4 Percentage of dengue manifestations: dengue fever (DF), dengue hemorrhagic fever (DHF), and dengue shock syndrome (DSS) vs dengue serotypes.

วิจารณ์ผลการวิจัย

หลังจากมีการติดเชื้อเดงกีภายใน 5 วันแรก จะตรวจพบเชื้อในกระแสเลือด ต่อมาจะพบ IgM หลังจากนั้นพบแอนติบอดีเฉพาะ IgG เพิ่มขึ้นจนถึงระดับสูงสุดที่ 14-21 วัน ในกรณีที่มีการติดเชื้อซ้ำก็อาจพบ IgM ในระดับต่ำ แต่ IgG จะเพิ่มปริมาณขึ้นเร็วและสูงกว่าครั้งแรก ทำให้สามารถแยกการติดเชื้อครั้งแรกและการติดเชื้อซ้ำได้จากอัตราส่วน IgG ต่อ IgM สูง จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้นี้ การตรวจทางห้องปฏิบัติการในผู้ป่วยเดงกีที่ได้รับการวินิจฉัยทางคลินิก พบการติดเชื้อเดงกีด้วยแอนติบอดีต่อเชื้อชนิด IgM และ/หรือ IgG ได้ร้อยละ 48.6-95.9 แต่พบเชื้อเดงกีด้วยวิธี RT-PCR เพียงร้อยละ 37.6-74.7 เนื่องจากผู้ป่วยอาจมาโรงพยาบาลหลังติดเชื้อเดงกีมานานกว่า 7 วัน ทำให้เชื้อไวรัสในกระแสเลือดของผู้ป่วยลดลงจนถึงไม่สามารถตรวจพบเชื้อเดงกีได้ในที่สุด แม้จะตรวจพบ NS1 แอนติเจนก็ตาม โดยเฉพาะผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อครั้งแรก⁽¹⁴⁾ ดังนั้น การตรวจด้วย RT-PCR มักใช้ในการตรวจการติดเชื้อเดงกีในระยะแรก หรือใช้สำหรับการตรวจแยกซีโรทัยป์เท่านั้น จากการวิเคราะห์สถานภาพการติดเชื้อ เป็นการติดเชื้อครั้งแรกด้วยแอนติบอดีโดยรวมร้อยละ 0-19 ใกล้เคียงกับการศึกษาค้นหาผู้ติดเชื้อทางน้ำเหลืองวิทยาในเขตอำเภอบางแพ จังหวัดราชบุรี ในช่วงปี พ.ศ. 2555-2558 พบผู้ป่วยที่ติดเชื้อครั้งแรกร้อยละ 4.8-14.7⁽¹⁵⁾ นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังพบว่าส่วนใหญ่เคยติดเชื้อไวรัสเดงกีมาก่อนหรือเป็นการติดเชื้อซ้ำ (ร้อยละ 80-100) เช่นเดียวกับข้อมูลพื้นที่ในกรุงเทพฯ (ร้อยละ 68.7) และกำแพงเพชร (ร้อยละ 69.1)⁽¹⁶⁾ แสดงให้เห็นว่าเชื้อเดงกีที่ระบาดอยู่ในแต่ละพื้นที่มีซีโรทัยป์ต่างชนิดหมุนเวียนอยู่ตลอดเวลา จึงมีจำนวนผู้ติดเชื้อเดงกีซ้ำในแต่ละพื้นที่มากกว่าผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกีครั้งแรก ส่วนผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกช็อกนั้นพบน้อยกว่าร้อยละ 1

ทั้งสองเพศ เช่นเดียวกับรายงานการศึกษาในกรุงเทพฯ ที่พบผู้ป่วยเป็นโรคไข้เดงกีส่วนใหญ่ทั้งเพศชายและเพศหญิงเท่ากับร้อยละ 87.2 และ 84 ตามลำดับ ตามด้วยผู้ป่วยที่เป็นโรคไข้เลือดออกเดงกีร้อยละ 7.5 และ 10.4 ในเพศชายและเพศหญิงตามลำดับ ส่วนผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกช็อกเพศชายและเพศหญิงมีจำนวนร้อยละ 5.2 และ 5.5 ตามลำดับ⁽¹⁶⁾ ซึ่งการเกิดความรุนแรงของอาการทางคลินิกในผู้ป่วยแต่ละคนนั้นประกอบด้วยปัจจัยจากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยเอง และสายพันธุ์ของไวรัสที่ติดเชื้อในผู้ป่วย เช่น การติดเชื้อซ้ำด้วยไวรัสเดงกี-2 และเดงกี-3 มีอัตราเสี่ยงสูงที่จะเกิดโรคไข้เลือดออกชนิดรุนแรงมากกว่าการติดเชื้อซ้ำด้วยซีโรทัยป์อื่น⁽⁹⁾

จากผลการศึกษาที่พบจำนวนของผู้ป่วยโรคไข้เดงกีมากกว่าผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกเดงกี และจำนวนผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกเดงกีมากกว่าจำนวนผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกช็อกนั้น (DF>DHF>DSS) เหมือนกันทั้งในจังหวัดราชบุรี กำแพงเพชร และกรุงเทพฯ เนื่องจากพบสายพันธุ์ของไวรัสเดงกีที่คล้ายกันในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อไวรัส ส่งผลให้การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยเกิดความรุนแรงเมื่อเกิดการติดเชื้อไวรัสเดงกีซ้ำ ซึ่งข้อมูลการวิจัยพบว่าในปีที่มีปริมาณผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกเดงกีและโรคไข้เลือดออกช็อกสูง (ปี พ.ศ. 2560) จะเป็นปีที่พบไวรัสเดงกี-2 และเดงกี-3 มากกว่าในช่วงปีอื่นๆ

จากผลการศึกษาสายพันธุ์ของไวรัสเดงกีและวิเคราะห์ตามสถานการณ์การติดเชื้อ พบเป็นเชื้อไวรัสเดงกี-1 จำนวนสูงที่สุด ตามด้วยเดงกี-2 ซึ่งเป็นไปตามข้อมูลรายงานทางระบาดวิทยาในแต่ละปีที่พบเชื้อไวรัสเดงกี-1 หรือเดงกี-2 มักจะเป็นซีโรทัยป์เด่น⁽¹⁷⁾ ในผู้ป่วยไข้เดงกีและไข้เลือดออก พบเชื้อเดงกี-1 ปริมาณสูงที่สุด ส่วนในผู้ป่วยไข้เลือดออกช็อก พบเดงกี-4 สูงที่สุด สอดคล้องกับ

การศึกษาในกรุงเทพฯ ของ Kerdpanich และคณะ ที่พบเดงกี-1 เป็นซีโรทัยป์เด่นในผู้ป่วยไข้เดงกี และผู้ป่วยไข้เลือดออก แต่ในจังหวัดกำแพงเพชรกลับพบเชื้อไวรัสเดงกี-3 และเดงกี-2 เป็นซีโรทัยป์เด่นในผู้ป่วยไข้เดงกี และผู้ป่วยไข้เลือดออกตามลำดับ อาจมีสาเหตุจากกรุงเทพฯ และจังหวัดราชบุรีมีระยะทางใกล้กว่ากำแพงเพชร ทำให้พบซีโรทัยป์ของไวรัสเดงกีเหมือนกันมากกว่า⁽¹⁶⁾

การตรวจพบทั้ง 4 ซีโรทัยป์ ในจังหวัดราชบุรี ระหว่างปี พ.ศ. 2555-2563 ในการศึกษาครั้งนี้โดยมีสัดส่วนที่แตกต่างกันในแต่ละปี จำนวนผู้ป่วยเดงกี สูงสุด (จำนวน 484 ราย) ในปี พ.ศ. 2558 และเริ่มลดน้อยลงต่ำสุดในปี พ.ศ. 2559 (จำนวน 72 ราย) สาเหตุที่พบผู้ติดเชื้อเดงกีน้อยลง อาจเนื่องจากข้อมูลรายงานการพยากรณ์โรคไข้เลือดออกปี พ.ศ. 2560 กรมควบคุมโรค ได้วิเคราะห์ถึงสาเหตุที่ปริมาณผู้ป่วยติดเชื้อเดงกีลดลงในปี พ.ศ. 2559 ระบุว่าอาจเกิดจากผลการประกาศเตรียมพร้อมรับการระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสซิกา ในการรณรงค์ด้านการจัดการสิ่งแวดล้อมเพื่อลดแหล่งเพาะพันธุ์ยุงลาย ซึ่งเป็นยุงนำโรคชนิดเดียวกับเชื้อไวรัสเดงกี⁽¹⁸⁾ และข้อมูลที่น่าสนใจในปี พ.ศ. 2560 ไม่พบไวรัสเดงกี-3 ซึ่งสอดคล้องกับภาพรวมของประเทศที่ไวรัสเดงกี-3 ลดลงโดยพบเพียงร้อยละ 2.17 ในปี พ.ศ. 2560⁽¹⁹⁾ ไวรัสเดงกี-1 มีความชุกสูงเกือบทุกปีตลอดการศึกษา เชื้อไวรัสเดงกี-2 พบในช่วงแรกแต่เริ่มลดลงชัดเจนในปี พ.ศ. 2557 สอดคล้องกับรายงานพยากรณ์โรคไข้เลือดออก กรมควบคุมโรค สถานการณ์การระบาดของไวรัสเดงกีในประเทศไทยที่มีเชื้อไวรัสเดงกี-1 เป็นซีโรทัยป์เด่น ในปี พ.ศ. 2558 และ พ.ศ. 2560-2563 และเดงกี-2 ลดลงตั้งแต่ในปี พ.ศ. 2557-2558^(17,20) เชื้อไวรัสเดงกี-2 เคยเป็นซีโรทัยป์เด่นในปี พ.ศ. 2556 และเดงกี-2 และเดงกี-4 เป็นซีโรทัยป์เด่นใน

ปี พ.ศ. 2557⁽¹⁵⁾ โดยรวมในแต่ละปีที่ศึกษา ซีโรทัยป์ที่สูงเป็นเชื้อไวรัสเดงกี-2 (พ.ศ. 2555), เดงกี-1 ร่วมกับเดงกี-2 (พ.ศ. 2556) และเดงกี-3 (พ.ศ. 2557) ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาในอำเภอ บางแพซึ่งเป็นอำเภอหนึ่งในจังหวัดราชบุรีเช่นเดียวกัน ที่พบสูงเด่นเป็นเชื้อไวรัสเดงกี-3 เด่น (พ.ศ. 2555) เชื้อเดงกี-2 (พ.ศ. 2556) เชื้อเดงกี-2 ร่วมกับเชื้อเดงกี-4 (พ.ศ. 2557)⁽¹⁵⁾ ซึ่งคงต้องวิเคราะห์ร่วมกับลักษณะทางภูมิศาสตร์และประชากรศาสตร์ของเขตอำเภอบางแพและอำเภอข้างเคียงในจังหวัดราชบุรีต่อไป ในขณะที่ผลการศึกษานี้พบซีโรทัยป์เด่นของเชื้อไวรัสเดงกี-1 ร่วมกับเดงกี-4 (พ.ศ. 2558) และเดงกี-4 (พ.ศ. 2559) ซึ่งมีความสอดคล้องกับการศึกษาในกรุงเทพฯ พบเดงกี-4 เด่น ระหว่างปี พ.ศ. 2558-2559⁽²¹⁾ ช่วงปี พ.ศ. 2559-2560 จังหวัดนนทบุรีพบเป็นเดงกี-2⁽²²⁾ แต่จากการศึกษานี้พบเป็นเดงกี-4 (พ.ศ. 2559) และเดงกี-1 (พ.ศ. 2560) นอกจากนี้ระหว่างปี พ.ศ. 2561-2563 ในกรุงเทพฯ พบเดงกี-1 เด่นตามด้วยเดงกี-2 เดงกี-4 และเดงกี-3 ตลอดทั้ง 3 ปี⁽²³⁾ ซึ่งการศึกษาในจังหวัดราชบุรี ปี พ.ศ. 2561 ได้ผลแบบเดียวกัน แตกต่างเพียงเล็กน้อยในปี พ.ศ. 2562 พบเป็นเดงกี-2 ตามด้วยเดงกี-1 ส่วนการติดเชื้อร่วมกันระหว่างเดงกี-2 และเดงกี-3 (2562) ที่พบในการศึกษานี้เคยมีรายงานในจังหวัดราชบุรี (2543) ที่มีรายงานการติดเชื้อร่วมกันระหว่างไวรัสเดงกี-1 และเดงกี-3⁽²⁴⁾

สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้ทำให้ได้ทราบข้อมูลสำคัญที่บ่งบอกซีโรทัยป์ของไวรัสเดงกีในจังหวัดราชบุรี ซึ่งเป็นจังหวัดที่พบความชุกของการระบาดสูงของเชื้อไวรัสเดงกีในประเทศไทย โดยพบเชื้อไวรัสเดงกีทั้ง 4 ซีโรทัยป์ สลับเปลี่ยนกันไปในแต่ละปี ระหว่างช่วงปี

พ.ศ. 2555-2560 จึงทำให้พบการติดเชื้อซ้ำจากต่าง
 ชาติโรทัยได้ง่าย ผลที่ได้จากการศึกษานี้จะเป็นข้อมูล
 พื้นฐานที่เป็นประโยชน์ต่อหน่วยงานที่เกี่ยวข้องในการ
 ป้องกันและควบคุมการระบาดของโรคติดเชื้อไวรัส
 เดงกี รวมถึงเป็นแนวทางในการวิจัยพัฒนาวัคซีนใน
 อนาคต ดังนั้นเพื่อให้มีข้อมูลของการติดเชื้อไวรัส
 เดงกีที่ครอบคลุมในภาพรวมของประเทศ ควรมีการ
 ศึกษาอุบัติการณ์การติดเชื้อไวรัสเดงกีและการ
 เปลี่ยนแปลงซีโรทัยอย่างต่อเนื่องในทุกๆ พื้นที่ของ
 ประเทศไทยต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Thongcharoen P. Hemorrhagic fever. Bangkok: Aksorn Samai; 1977: p.188-226. (in Thai)
2. Henchal EA, Putnak JR. The dengue viruses. Clin Microbiol Rev 1990; 3: 376-96.
3. Innis BL. Dengue and dengue hemorrhagic fever. In: Porterfield JS editor. Kass Handbook of Infectious Diseases: Exotic Virus Infections. London: Chapman & Hall Medical; 1995: p.103-46.
4. Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, *et al.* Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization test with polyclonal antisera. J Gen Virol 1989; 70: 37-43.
5. Nimmannitya S. Dengue hemorrhagic fever: current issues and future research. Asian Oceanian J Paediatr Child Health 2002; 1: 1-21.
6. World Health Organization. Dengue Hemorrhagic Fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd ed. Geneva: World Health Organization; 1997.
7. World Health Organization. Prevention and control of dengue and dengue hemorrhagic fever. New Delhi: WHO Regional Office for South-East Asia; 1999.
8. Nguyen TKT, Do QH, Tran KT, Loung CQ. Predictive indicators for forecasting epidemic of dengue/dengue hemorrhagic fever through epidemiological, virological and entomological surveillance. Dengue Bull 1999; 23: 44-50.
9. Nimmannitya S, Kalayanaroojj S, Witthayasup A, editors. Guidelines for diagnosis and treatment of dengue hemorrhagic fever. 1st ed. Bangkok: Ministry of Public Health; 2542.
10. Yenchitsomanus PT, Sricharoen P, Jaruthasana I, *et al.* Rapid detection and identification of dengue viruses by polymerase chain reaction (PCR). Southeast Asian J Trop Med Public Health 1996; 27: 228-36.
11. Product Insert abTES™DENV/CHIKU 5 qPCR II kit (V2.1), AITbiotech Pte Ltd, 2017.
12. Innis BL, Nisalak A, Nimmannitya S, *et al.* An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. Am J Trop Med Hyg 1989; 40: 418-27.

13. Arbovirus section, Standard Operating Procedure 13-02-497 “Anti-dengue antibody detection by ELISA using tissue cultured antigen. Nonthaburi: National Institute of Health, Department of Medical Sciences; 1-11.
14. Parkash O, Shueb RH. Diagnosis of dengue infection using conventional and biosensor based techniques. *Viruses* 2015; 7: 5410-27.
15. Limkittikul K, Chanthavanich P, Lee KS., *et al.* Dengue virus seroprevalence study in Bangphae district, Ratchaburi, Thailand: A cohort study in 2012-2015. *PLoS Negl Trop Dis* 2022; 16: e0010021. doi:10.1371/journal.pntd.0010021
16. Kerdpanich P, Kongkiatngam S, Buddhari D., *et al.* Comparative analyses of historical trends in confirmed dengue illnesses detected at public hospitals in Bangkok and northern Thailand, 2002-2018. *Am J Med Hyg* 2021; 104: 1058-66.
17. Department of Disease Control, Ministry of Public Health. Report of Dengue Hemorrhagic Fever Prophecy, 2021. (in Thai)
18. Department of Disease Control, Ministry of Public Health. Report of Dengue Hemorrhagic Fever Prophecy, 2017. (in Thai)
19. Department of Disease Control, Ministry of Public Health. Report of Dengue Hemorrhagic Fever Prophecy, 2019. (in Thai)
20. Department of Disease Control, Ministry of Public Health. Report of Dengue Hemorrhagic Fever Prophecy, 2015. (in Thai)
21. Liulak W, Saichaer P, Waidab W, *et al.* Prospective study of dengue in Bangkok during 2015-2016. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2017; 48: 33-8
22. Uttayamakul S, Nitiyanontakij R, Dedsatit S, Reawrang S, Suttha P, Moolasart V. Molecular laboratory testing for dengue serotypes at Bamrasnaradura Infectious Disease Institute. *Bull Dept Med Sci* 2019; 61: 31-9.
23. Poltep K, Phadungsombat J, Nakayama EE., *et al.* Genetic diversity of dengue virus in clinical specimens from Bangkok, Thailand, during 2018-2020: co-circulation of all four serotypes with multiple genotypes and/or clades. *Trop Med Infect Dis* 2021; 6: 162-72.
24. Chanama S, Anantapreecha S, Thongthai P, A-nuegoonpipat A, Panthuyosri N. Surveillance of dengue virus in four provinces of Thailand, 1999-2000. *J Health Sci* 2011; 10: 688-94.

Extraction and Evaluation of Antifungal Compounds against Mucormycosis and Aspergillosis from Thai Herbal GPO Products Used for COVID-19 Patients

Yordhathai Thongsri^{1*}, Narathit Chanraeng², Peeranut Poorungreang²,
Chatchawan Bampencho², Kanchana Usuwanthim¹, Pachuen Potup¹
and Sophit Khanthawong³

¹Cellular and Molecular Immunology Research Unit, Faculty of Allied Health Sciences,
Naresuan University, Phitsanulok Province, Thailand

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

³Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science and Center of
Excellence in Fungal Research, Naresuan University, Phitsanulok Province, Thailand

Abstract

The affecting of current COVID-19 epidemic in patients complication with COVID-19 associated mucormycosis (CAM) and COVID-19 associated pulmonary aspergillosis (CAPA) results in fatal and life-threatening. *Andrographis paniculata* (AP) and *Curcuma longa* (CL) herbal products by the Government Pharmaceutical Organization are used as an alternative treatment for COVID-19 patients while the antifungal activity data are still unknown. We aimed to test the antifungal activity of herbal products against CAM and CAPA pathogenic fungi together with suitable solvent extraction of active compounds from both products. A screening antifungal activity test using powder of AP and CL (200 mg/mL) in hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and methanol was conducted with agar toxicity method against five pathogenic fungi: *Rhizopus* sp., *Absidia* sp., *Mucor* sp., *Aspergillus fumigatus* and *A. flavus*. The results showed that CL powder in ethyl acetate produced better antifungal effect than AP. The highest inhibition effect on *A. fumigatus* was detected with the mycelial growth inhibition (MGI) of 100%. For the extraction with partition method, % yield of CL with methanol was 24.35% and 18.24% from AP crude extracts. The crude extracts (0.6 mg/mL) in 1% DMSO were tested for antifungal activity by disc diffusion method. The crude extract from

*Corresponding author E-mail address: yordhathait@nu.ac.th

CL could inhibit the mycelial growth of 4 species of fungi, *Mucor* sp. *Absidia* sp. *A. flavus* and *A. fumigatus*. The highest effect was on *A. fumigatus* with an inhibition zone of 12.10 mm while AP could not show any effect against the tested fungi. The antifungal properties of AP and CL herbal products here supported and added value to Thai medicinal herbs used in alternative treatments for COVID-19 patients infected with opportunistic fungi that may be found in COVID-19 patients in the future.

Keywords: *Andrographis paniculata*, *Curcuma longa*, Mucormycosis, Aspergillosis, COVID-19

การสกัดและทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคมิวคอร์ไมโคซิสและ โรคแอสเปอร์จิลโลซิสจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรฟ้าทะลายโจรและ ขมิ้นชันที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยโควิด 19

ยอดหทัย ทองศรี^{1*} นราทิพย์ จันแรง² พีรณัฐ ผู้รุ่งเรือง² ชัชวาลย์ บำเพ็ญเชาว์²
กาญจนา อุสุวรรณทิม¹ พาชื่น โปทัพ¹ และ โสภิศ คันธวงค์³

¹หน่วยวิจัยภูมิคุ้มกันวิทยาระดับเซลล์และโมเลกุล ภาควิชาเทคนิคการแพทย์
คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

²ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

³ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา และ สถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการด้านเห็ดและรา
คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

บทคัดย่อ

โรคติดเชื้อราฉวยโอกาสแทรกซ้อนในผู้ป่วยโรคโควิด 19 ชนิด COVID-19 associated mucormycosis (CAM) และ COVID-19 associated pulmonary aspergillosis (CAPA) มีความรุนแรงและอันตรายถึงชีวิต ประเทศไทยมีผลิตภัณฑ์สมุนไพรฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันเป็นยาทางเลือกสำหรับโรคโควิด 19 ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ศึกษาชนิดของสารสกัดสมุนไพรที่เหมาะสมและประเมินการออกฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคแทรกซ้อนดังกล่าวจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *Rhizopus* sp. *Absidia* sp. *Mucor* sp. *Aspergillus fumigatus* และ *A. flavus* โดยสารที่ใช้เป็นตัวทำละลายและ/หรือสารสกัดสมุนไพร ได้แก่ น้ำกลั่น เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ผลทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นด้วยวิธี agar toxicity ของสารละลายสมุนไพรที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่า ขมิ้นชันมีฤทธิ์ต้านเชื้อราประสิทธิภาพสูงกว่าฟ้าทะลายโจร โดยผงขมิ้นชันที่ละลายด้วยเอทิลอะซิเตทสามารถยับยั้งเชื้อ *A. fumigatus* ได้ร้อยละ 100 และเมื่อเปรียบเทียบกับผลผลิตสารสกัดหยาบจากผงสมุนไพรด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิดพบว่า เมทานอลให้ปริมาณสารสกัดหยาบจากผงขมิ้นชัน และฟ้าทะลายโจรมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 24.35 และ 18.24 ตามลำดับ การทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดหยาบผงสมุนไพรจากตัวทำละลายต่างชนิดที่ความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยวิธี agar disc diffusion พบว่า สารสกัดหยาบจากผงขมิ้นชันด้วยตัวทำละลายเฮกเซนมีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ 4 สายพันธุ์ คือ *Mucor* sp. *Absidia* sp. *A. flavus* และ *A. fumigatus* โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. fumigatus* ได้ดีที่สุด

คำสำคัญ: ฟ้าทะลายโจร ขมิ้นชัน โรคมิวคอร์ไมโคซิส โรคแอสเปอร์จิลโลซิส โควิด 19

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: yordhathait@nu.ac.th

รับบทความ: 6 มิถุนายน 2566

แก้ไขบทความ: 13 กรกฎาคม 2566

รับตีพิมพ์บทความ: 27 กรกฎาคม 2566

บทนำ

ปัจจุบันมีการแพร่ระบาดของโรคโควิด 19 ซึ่งเป็นโรคติดต่อที่เกิดจากเชื้อโคโรนาไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่เรียกว่า severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) ไวรัสและโรคอุบัติใหม่นี้เริ่มมีการระบาดในเมืองอู่ฮั่น ประเทศจีนในเดือนธันวาคมปี พ.ศ. 2562 และมีการระบาดใหญ่ไปทั่วส่งผลกระทบต่อหลายประเทศทั่วโลก⁽¹⁾ อีกทั้งผู้ป่วยหลายรายได้รับผลกระทบจากการเป็นโรคเป็นระยะเวลานานทำให้ร่างกายอ่อนแอลง เรียกว่าเกิดภาวะ long COVID โดยภาวะ long-COVID-19 syndrome หรือ post-COVID-19 syndrome คือ อาการหลงเหลือหลังการติดเชื้อโควิด 19 ในระยะยาวเนื่องจากในขณะที่ป่วย ร่างกายมีการสร้างแอนติบอดีบางอย่างซึ่งไปจับกับโปรตีนในเซลล์ของอวัยวะบางส่วนในร่างกายและไปทำลายอวัยวะต่างๆ โดยบางรายอาจมีภาวะแทรกซ้อนรุนแรงจนเข้ารับการรักษา ซึ่งผลกระทบของ long Covid สามารถเกิดขึ้นได้ทั่วร่างกายตั้งแต่ระบบหายใจ ระบบประสาท ระบบทางเดินอาหาร และระบบหัวใจและหลอดเลือด

ภาวะแทรกซ้อนรุนแรงที่พบได้ในผู้ป่วยติดเชื้อโควิด 19 มักเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อราแทรกซ้อนในระบบทางเดินหายใจที่มีพยาธิสภาพถูกทำลายจากการติดเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 โดยเชื้อแทรกซ้อนส่วนใหญ่ เช่น แบคทีเรีย *Mycoplasma pneumoniae* เชื้อราก่อโรคแอสเปอร์จิลโลสิส (aspergillosis) และแคนดิดิเอสิส (candidiasis) ซึ่งเป็นเชื้อราที่สามารถพบได้บ่อยในกลุ่มคนที่มีภาวะ long-COVID-19 syndrome⁽¹⁾ นอกจากนี้ยังพบรายงานเกี่ยวกับโรคติดเชื้อมิวคอร์ไมโคสิส (mucormycosis) ในผู้ป่วยโควิด 19 ที่เพิ่มขึ้นทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศอินเดีย โรคมิวคอร์ไมโคสิสหรือโรคราดำ (black fungus) เป็น

โรคติดเชื้อราที่ลุกลามอย่างรวดเร็วทางหลอดเลือด (angioinvasive) เป็นภาวะร้ายแรงที่ส่งผลกระทบต่อผู้ป่วยหลายกลุ่ม เชื้อราที่ก่อโรคมิวคอร์ไมโคสิส ได้แก่ *Mucor* sp. *Rhizopus* sp. และ *Absidia* sp. นอกจากนี้ยังอาจส่งผลให้ผู้ป่วยติดเชื้อราฉวยโอกาสอื่น ๆ ได้ เช่น โรค COVID-19 associated pulmonary aspergillosis (CAPA) ที่มีเชื้อก่อโรคหลักคือเชื้อ *Aspergillus fumigatus* โดยสาเหตุหลักที่ส่งเสริมให้เกิดการติดเชื้อราฉวยโอกาส คือ สภาพแวดล้อมที่มีออกซิเจนต่ำ (hypoxia) กลูโคสสูง (โรคเบาหวาน, new-onset hyperglycemia, steroid induced hyperglycemia) ภาวะที่เป็นกรด (metabolic acidosis, diabetic ketoacidosis) ระดับธาตุเหล็กสูง และการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวลดลงจากการกดภูมิคุ้มกันร่วมกับปัจจัยเสี่ยงอื่น ๆ รวมถึงการรักษาตัวในโรงพยาบาลเป็นระยะเวลานาน^(2, 3) ปัจจุบันยังไม่มียาต้านไวรัสที่จำเพาะสำหรับการรักษาโรคโควิด 19 จึงมีการรักษาด้วยยาที่มีประสิทธิภาพใกล้เคียงมากที่สุด เช่น เรมเดซิเวียร์ (GS-5734) ฟาวพิราเวียร์ (T-705) และคลอโรควิน⁽⁴⁾ แต่การรักษาด้วยยาแผนปัจจุบันอาจก่อให้เกิดผลข้างเคียงกับผู้ป่วยได้ อีกทั้งยังมีราคาแพงและหาซื้อได้ยาก จึงมีการนำสมุนไพรธรรมชาติบางชนิดมาใช้เป็นทางเลือกในการรักษาโรคโควิด 19 เช่น ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) และขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) เนื่องจากผลการศึกษาวิจัยพบว่ามีกลไกต้านไวรัส ป้องกันไม่ให้ไวรัสเข้าเซลล์ ลดการเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์ เพิ่มภูมิคุ้มกันในการต่อสู้กับไวรัส และลดการอักเสบที่ปอดจากการติดเชื้อไวรัสได้^(5, 6) ซึ่งการรักษาด้วยยาสมุนไพรให้ผลการรักษาได้ดีใกล้เคียงกับยาแผนปัจจุบัน มีความปลอดภัยแก่ผู้ใช้มากกว่า และสามารถหาได้ง่ายในท้องถิ่นเพราะส่วนใหญ่เป็นพืชซึ่งมีอยู่ทั่วไปทั้งในเมืองและชนบท และ

ด้วยสรรพคุณการออกฤทธิ์ของสมุนไพรส่วนใหญ่จะมีฤทธิ์กว้างรักษาโรคได้หลายชนิด จึงสามารถพบรายงานผลของสมุนไพรในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้มากมาย

ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ศึกษาชนิดของสารสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันที่ใช้รักษาโรคโควิด 19 และประเมินการออกฤทธิ์ของสมุนไพรต่อการต้านเชื้อราก่อโรคฉวยโอกาส มีวอร์ไมโคลิสและแอสเปอร์จิลโลสิส ซึ่งข้อมูลผลการศึกษาอาจช่วยเพิ่มคุณค่าของสมุนไพรในการรักษาโรคได้

วัตถุประสงค์และวิธีการ

1. สายพันธุ์เชื้อราและการเพาะเลี้ยง

งานวิจัยนี้ใช้เชื้อราเพื่อการศึกษาทั้งหมด 5 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *Rhizopus* sp. *Absidia* sp. *Mucor* sp. *A. fumigatus* และ *A. flavus* ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.โสภิศ คันธวงค์ สาขาวิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร (เอกสารรับรองความปลอดภัยทางชีวภาพ NUIBC MI 61-08-49) โดยนำเชื้อรามาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Sabouraud dextrose agar (SDA) slant และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3-5 วัน เพื่อเก็บเป็นสต็อก ซึ่งเชื้อที่ใช้สำหรับการทดสอบ antifungal susceptibility test จะ subculture จากหลอดสต็อกโดยใช้เข็มเจาะเชื้อเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด SDA plate ที่สถานะเดิม เมื่อเชื้อเจริญแล้วจึงตัดเชื่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA ด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากการเพาะเลี้ยงและเป็นการควบคุมปริมาณของเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบ

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันด้วยวิธี agar toxicity

สมุนไพรฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันที่ใช้ในการศึกษาเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรบรรจุแคปซูลพร้อมทานจำหน่ายโดยองค์การเภสัชกรรมของประเทศไทย ภายใต้เลขทะเบียนเลขที่ G468/41 และ G447/41 ตามลำดับ โดยในการทดสอบใช้ความเข้มข้นของสมุนไพรแต่ละชนิดเท่ากับ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายในตัวทำละลายน้ำกลั่นและตัวทำละลายมีขั้ว ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล

การทดสอบด้วยวิธี agar toxicity⁽¹³⁾ ทำโดยนำสารละลายสมุนไพรที่เตรียมจากตัวทำละลายแต่ละชนิดในปริมาตรสุทธิ 2 มิลลิลิตร มาผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA ปราศจากเชื้อ 18 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้แล้วจึงเทลงในจานเพาะเชื้อ จากนั้นนำเชื้อราที่ต้องการทดสอบวางลงตรงกลางจานอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยในการทดสอบมีการควบคุมผลของตัวทำละลายต่อการเจริญของเชื้อราด้วยการใช้อาหาร SDA ผสมน้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมลบ (negative control) หรือผสมตัวทำละลายแต่ละชนิดเป็น solvent control นอกจากนี้ในการศึกษาได้ใช้ยาแอมโฟเทอริซิน บี (amphotericin B) เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นตัวควบคุมบวก (positive control) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ

การอ่านผลทำโดยวัดและบันทึกค่าเส้นผ่าศูนย์กลางในหน่วยมิลลิเมตรของโคโลนีของเชื้อทุก 24 ชั่วโมง จนเชื้อในจานควบคุมลบเจริญเติบโตจนเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำผลการวัดการเจริญของเชื้อราบนจานควบคุมและจานทดสอบมาคำนวณค่าร้อยละของการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (mycelial growth inhibition rate, % MGI) ของการทดสอบ agar toxicity ด้วยสูตรตามแสดง

$$MGI = (DC-DT)/DC \times 100$$

DC = ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อ
บนจานควบคุม

DT = ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อ
บนจานทดสอบ

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดหยาบ ฟ้าทะลายโจรและไขมันชั้นด้วยวิธี disc diffusion

นำผงสมุนไพรฟ้าทะลายโจรและไขมันชั้นจาก
ผลิตภัณฑ์มาละลายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น
50 กรัมต่อ 500 มิลลิลิตร และนำมาสกัดหยาบด้วยวิธี
แยกชั้น (partition method) โดยใช้กรวยแยก
(separatory funnel) และใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มี
ขั้ว ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท
และเมทานอล ในอัตราส่วน 1:1 การสกัดทำทั้งหมด
3 ชั่วโมง จากนั้นนำชั้นของสารละลายที่สกัดได้กรองด้วย
สำลีและโซเดียมไโทซัลเฟตที่ปราศจากน้ำ ชั้นของ
สารสกัดอินทรีย์ที่ได้แต่ละชนิดนำไปทำให้แห้งโดยใช้
เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator)
ที่ความเร็ว 80 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศา-
เซลเซียส การคำนวณปริมาณผลผลิตร้อยละ
(% yield) ของสารสกัดหยาบสมุนไพรฟ้าทะลายโจร
(*A. paniculata* extract, AP) และสารสกัดหยาบ
ไขมันชั้น (*C. longa* extract, CL) ที่เตรียมได้สามารถ
คำนวณได้จากสูตร

$$\text{ปริมาณผลผลิตร้อยละ (\% yields)}$$

$$= W1/W2 \times 100$$

W1 = ปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้

W2 = ปริมาณสาร (ผงสมุนไพร) เริ่มต้น

สารสกัดหยาบจากผงสมุนไพรที่มาจากตัวทำ
ละลายแต่ละชนิดนำไปเตรียมสารละลายความเข้มข้น
0.6 กรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ไดเมทิลซัลฟอกไซด์
(DMSO) เข้มข้นร้อยละ 1 เป็นตัวทำละลาย และ

ส่วนของชั้นน้ำ (aqueous phase) ที่เหลือจากการสกัด
หยาบจากสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด นำมาทดสอบฤทธิ์ต้าน
เชื้อราด้วยวิธี agar disc diffusion^(12, 14) โดย
ดูดสารละลายดังกล่าว 20 ไมโครลิตร มาหยดลงบน
แผ่นดิสก์ปลอดเชื้อ (sterile disc) ที่มีเส้นผ่า-
ศูนย์กลางขนาด 6 มิลลิเมตร นำวางลงบนจานอาหาร
เลี้ยงเชื้อ SDA แล้วจึงนำเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบวาง
ตรงกลางของจานอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศา-
เซลเซียส โดยในการทดสอบมีการควบคุมผลของตัว
ทำละลายต่อการเจริญของเชื้อราด้วยการใช้น้ำกลั่น
เป็นตัวควบคุมลบ (negative control, NC) DMSO
เข้มข้นร้อยละ 1 เป็น DMSO control (DC) และ
ตัวทำละลายอินทรีย์มีขั้วแต่ละชนิดเป็นตัวทำละลาย
ควบคุม (solvent control, SC) หยดลงบนแผ่นดิสก์
ปลอดเชื้อในปริมาณเท่ากัน วางทดสอบในจานเพาะเชื้อ
เดียวกัน นอกจากนี้ในการศึกษาได้ใช้แผ่นยา
ไอทราโคนาโซล (itraconazole) ความเข้มข้น 30
ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นตัวควบคุมบวก (positive
control, PC) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ การอ่าน
ผลทำโดยวัดโซนยับยั้งการเจริญของเชื้อรอบแผ่นดิสก์
(inhibition zone) และบันทึกค่าเส้นผ่าศูนย์กลางใน
หน่วยมิลลิเมตร จนกว่าเชื้อเจริญถึงแผ่นควบคุมลบ
(negative control disc) โดยรายงานผลการทดสอบ
เป็น active หรือ non-active หากพบหรือไม่พบโซน
ยับยั้งการเจริญของเชื้อรอบแผ่นดิสก์ทดสอบตาม
ลำดับ

4. สถิติในการวิจัย

บันทึกผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราจาก
การทดสอบ agar toxicity โดยบันทึกการเจริญของ
เชื้อราโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 ตำแหน่ง บันทึก
ค่าการเจริญของเชื้อทั้งหมด 3 ชั่วโมง นำค่าเฉลี่ย (mean)
การเจริญของเชื้อ ในหน่วยมิลลิเมตรมาคำนวณ

หาค่าร้อยละของการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (mycelial growth inhibition rate, % MGI) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ค่า MGI ที่มากกว่าร้อยละ 50 ถือว่ามีการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดี การทดสอบวิธี disc diffusion บันทึกค่าโซนยับยั้งการเจริญของเชื้อ (inhibition zone) โดยใช้เวอร์เนียคาลิเปอร์วัดรอบมุมทั้งสามด้านรอบแผ่นดิสก์ บันทึกค่าการเจริญของเชื้อทั้งหมด 3 ซ้ำ รายงานผลค่าโซนยับยั้งการเจริญของเชื้อเป็นค่าเฉลี่ย (mean) ในหน่วยมิลลิเมตร

ผลการวิจัย

1. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันด้วยวิธี agar toxicity

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์สมุนไพร 2 ชนิด คือ ฟ้าทะลายโจร และขมิ้นชัน ละลายในน้ำกลั่นและในตัวทำละลายอินทรีย์ 4 ชนิดคือ เฮกเซน ไคคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเชื้อราก่อโรคมิวคอร์ไมโคซิสจำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *Rhizopus* sp. *Mucor* sp. และ *Absidia* sp. และเชื้อราก่อโรคแอสเปอร์จิลโลซิสจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *Aspergillus*

fumigatus และ *A. flavus* ด้วยวิธี agar toxicity ตัวทำละลายที่ให้ผลการทดสอบที่ดีที่สุดของผงขมิ้นชันคือเอทิลอะซิเตท สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรค 4 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *Rhizopus* sp. *Absidia* sp. *A. fumigatus* และ *A. flavus* โดยมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. fumigatus* ดีที่สุด มีอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ร้อยละ 100 (Table 1, Fig. 1) และผงฟ้าทะลายโจรที่ละลายด้วยเอทิลอะซิเตท ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุดต่อเชื้อราก่อโรค 2 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *A. fumigatus* และ *A. flavus* โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. fumigatus* ได้ดีที่สุด มีอัตราการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ร้อยละ 67.21 (Table 1, Fig. 1) จากผลการทดสอบสรุปได้ว่าผงขมิ้นชันมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคที่ทดสอบได้ดีกว่าฟ้าทะลายโจร โดยพบว่าผงสมุนไพรที่ละลายด้วยตัวทำละลายดังกล่าวมีค่า MGI ที่มากกว่าร้อยละ 50 โดยผงขมิ้นชันสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคนำมาทดสอบได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ ส่วนผงฟ้าทะลายโจรมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ทดสอบได้เพียง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *Mucor* sp. *Absidia* sp. *A. fumigatus* และ *A. flavus*

Table 1 Mycelial growth inhibition rate of *Andrographis paniculata* (AP) and *Curcuma longa* (CL) against five human pathogenic fungi by agar toxicity assay.

solvent	Herbal type	Mycelial growth inhibition (MGI) (%)				
		<i>Rhizopus</i> sp.	<i>Absidia</i> sp.	<i>Mucor</i> sp.	<i>A. flavus</i>	<i>A. fumigatus</i>
DI	AP	0.00	0.00	7.01	0.00	0.00
	CL	33.88	58.32	53.34	60.97	12.64
	PC	84.50	66.89	84.50	84.50	84.50
Hex	AP	0.00	4.01	18.63	0.00	39.46
	CL	42.27	56.08	54.64	54.83	25.97
	PC	84.50	64.39	63.06	84.50	55.91
DCM	AP	0.00	0.00	38.06	0.00	0.00
	CL	64.84	51.40	73.75	65.85	18.05
	PC	84.50	60.29	60.83	84.50	32.69
EtOAc	AP	0.00	0.00	N/A	11.03	67.21
	CL	79.90	53.79	N/A	71.08	100.00
	PC	62.38	39.10	55.19	84.50	70.56
MeOH	AP	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	CL	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	PC	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

AP; *Andrographis paniculata*, CL; *Curcuma longa*, DI; Deionized water, Hex; Hexane, DCM; Dichloromethane, EtOAc; Ethyl acetate, MeOH; Methanol, PC; Positive control (Amphotericin B 1 mg/mL), N/A : Not available (no colony growth)

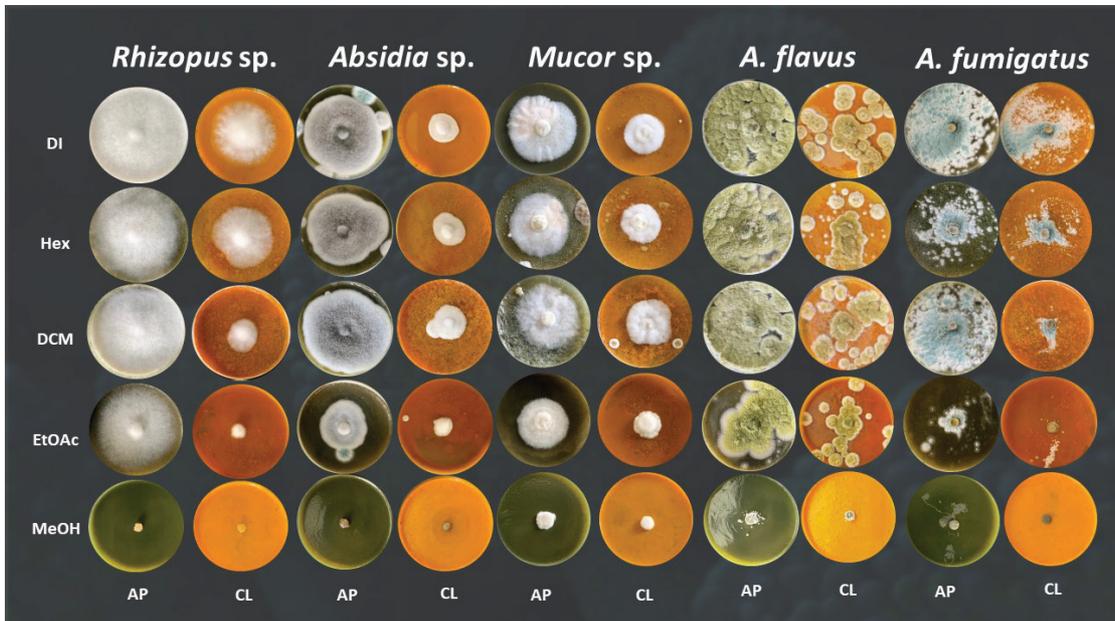


Fig. 1 Mycelial growth inhibition of *Andrographis paniculata* (AP) and *Curcuma longa* (CL) dissolved in various types of organic solvent against five strains of human pathogenic fungi by agar toxicity assay. AP; *Andrographis paniculata*, CL; *Curcuma longa*, DI; Deionized water, Hex; Hexane, DCM; Dichloromethane, EtOAc; Ethyl acetate, MeOH; Methanol.

2. การสกัดสารต้านเชื้อราจากฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

การสกัดสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ด้านการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคมิวคอร์ไมโคซิส และโรคแอสเปอร์จิลโลซิสด้วยวิธีแยกชั้น (partition method) และใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความมีขั้วที่แตกต่างกัน ได้แก่ สารละลาย เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล แล้วทำให้แห้งโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน เมื่อได้สารสกัดหยาบจากผงสมุนไพรแล้วนำไปคำนวณหาปริมาณ

ผลผลิตร้อยละของสารสกัดหยาบที่ได้ดังแสดงใน Table 2 สารสกัดหยาบเมทานอลจากขมิ้นชัน มีน้ำหนักของสารสกัดหยาบสูงที่สุดเท่ากับ 12.17 กรัม เมื่อนำมาคำนวณปริมาณผลผลิตร้อยละของสารสกัดหยาบได้เท่ากับร้อยละ 24.34 การสกัดสารสำคัญจากฟ้าทะลายโจรพบว่าตัวทำละลายเมทานอล มีน้ำหนักของสารสกัดหยาบที่สกัดได้สูงที่สุดเช่นเดียวกันโดยมีน้ำหนักเท่ากับ 9.12 กรัม เมื่อนำมาคำนวณปริมาณผลผลิตร้อยละของสารสกัดหยาบได้เท่ากับร้อยละ 18.24

Table 2 Weight and % yield of crude extracts from *Andrographis paniculata* (AP) and *Curcuma longa* (CL) with different types of organic solvent by partition method.

Solvent	Crude extract (g)		% Yield of crude extract	
	AP	CL	AP	CL
Hexane	0.77	2.36	1.54	4.73
Dichloromethane	1.01	6.28	2.20	12.55
Ethyl acetate	7.15	7.31	14.30	14.63
Methanol	9.12	12.17	18.24	24.34

AP; *Andrographis paniculata*, CL; *Curcuma longa*

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดหยาบฟ้าทะลายโจรและน้ำมันชั้นด้วยวิธี disc diffusion

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดหยาบจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรม ได้แก่ ฟ้าทะลายโจรและน้ำมันชั้น ต่อเชื้อราก่อโรคมิวคอร์ไมโคลิส จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *Rhizopus* sp. *Absidia* sp. และ *Mucor* sp. และเชื้อราก่อโรคแอสเปอร์จิลโลสิสจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *Aspergillus fumigatus* และ *A. flavus* โดยการสกัดสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อราด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 4 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล นำสารสกัดหยาบมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคด้วยวิธี agar disc diffusion ผลการ

ทดสอบดังแสดงใน Table 3 พบว่าสารสกัดหยาบ hexane จากผงขม้นชั้นให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อดีที่สุด จากเชื้อ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *Absidia* sp. *A. fumigatus* และ *A. flavus* โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. fumigatus* ดีที่สุด มีค่าโซนยับยั้งการเจริญของเชื้อเท่ากับ 12.10 มิลลิเมตร (Fig. 2) การทดสอบสารสกัดหยาบเมทานอล จากผงฟ้าทะลายโจรให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อดีที่สุดจากเชื้อ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *Mucor* sp. และ *A. flavus* โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Mucor* sp. ดีที่สุด มีค่าโซนยับยั้งการเจริญของเชื้อเท่ากับ 8.95 มิลลิเมตร (Fig. 3)

Table 3 Antifungal activity of crude extracts from *Andrographis paniculata* (AP) and *Curcuma longa* (CL) against five human pathogenic fungi by disc diffusion method.

Solvent	Herb type	Inhibition zone (mm.)				
		<i>Rhizopus</i> sp.	<i>Absidia</i> sp.	<i>Mucor</i> sp.	<i>A. flavus</i>	<i>A. fumigatus</i>
Hex	AP	0	0	6.35	0	0
	CL	0	8.01	6.46	5.3	12.1
	PC	8.72	19.44	6.38	22.06	21.71
DCM	AP	0	0	0	0	0
	CL	0	0	0	0	3.49
	PC	8.75	11.27	4.93	17.78	19.38
EtOAc	AP	0	0	0	8.51	0
	CL	0	0	0	9.34	0
	PC	9.25	10.41	4.95	23.20	23.14
MeOH	AP	0	0	8.95	0	0
	CL	0	0	0	0	0
	PC	9.28	10.85	9.15	23.98	22.89

AP; *Andrographis paniculata*, CL; *Curcuma longa*, DI; Deionized water, Hex; Hexane, DCM; Dichloro-methane, EtOAc; Ethyl acetate, MeOH; Methanol, PC = Positive control (Itraconazole 30 µg/mL)

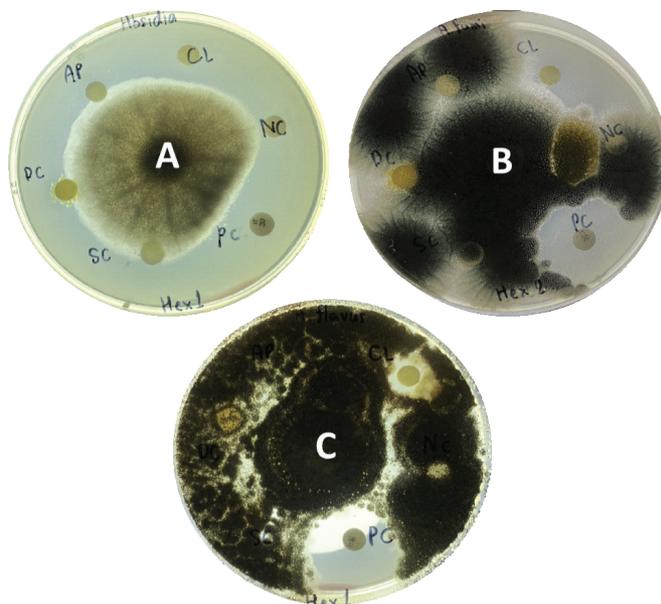


Fig. 2 Antifungal activity of crude hexane extract from *Curcuma longa* (CL) against human pathogenic fungi by disc diffusion method: A) antifungal activity of *Absidia* sp. B) *Aspergillus fumigatus* and C) *Aspergillus flavus*.: AP; *Andrographis paniculata*, CL; *Curcuma longa*, NC; Negative control (Deionized water), PC; Positive control (Itraconazole, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$); DC; 1%DMSO control and SC; Solvent control (Hexane, Dichloromethane, Ethyl acetate, and Methanol).

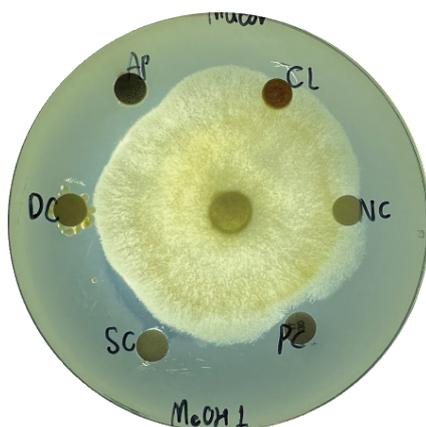


Fig. 3 Antifungal activity of crude methanol extract from *Andrographis paniculata* (AP) against *Mucor* spp. by disc diffusion method: AP; *Andrographis paniculata*, CL; *Curcuma longa*, NC; Negative control (Deionized water), PC; Positive control (Itraconazole (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$); DC; 1%DMSO control and SC; Solvent control (Hexane, Dichloromethane, Ethyl acetate, and Methanol).

วิจารณ์

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์สมุนไพรฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) และขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) ที่ละลายในน้ำกลั่นและตัวทำละลายอินทรีย์ 4 ชนิดคือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ต่อเชื้อราก่อโรคมิวคอร์ไมโคลิส จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *Rhizopus* sp. *Mucor* sp. และ *Absidia* sp. และเชื้อราก่อโรคแอสเปอร์จิลโลลิส จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *Aspergillus fumigatus* และ *A. flavus* ด้วยวิธี agar toxicity พบว่าเมื่อใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท สารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับตัวทำละลายชนิดอื่น ผลการทดสอบเมื่อใช้ตัวทำละลายเมทานอล ไม่สามารถแปลผลได้เนื่องจากปริมาณเมทานอล ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทดสอบ ด้วยวิธี agar toxicity มีความเข้มข้นสูงเมื่อเพาะเชื้อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อจึงไม่พบการเจริญเติบโตเนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อมีความเป็นพิษสูง แต่เมื่อนำสมุนไพรมาสกัดสารต้านเชื้อราด้วยวิธีแยกชั้น (partition method) พบว่าสารสกัดหยาบเมทานอล เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคได้ดีทั้งจากขมิ้นชัน และฟ้าทะลายโจร แสดงให้เห็นว่าตัวทำละลายเมทานอล สามารถสกัดสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราได้ดี จากการสกัดสารสำคัญของฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชัน พบว่าสารสกัดหยาบเมทานอลจากขมิ้นชัน มีน้ำหนักของสารสกัดหยาบสูงที่สุด เท่ากับ 12.17 กรัม เมื่อนำมาคำนวณปริมาณผลผลิตร้อยละของสารสกัดหยาบได้เท่ากับ ร้อยละ 24.34 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Popuri และ Pagara ในปี พ.ศ. 2556 ที่ศึกษาการสกัดสารเคอคูมิน จากรากของขมิ้นชันด้วยตัวทำละลาย อะซิโตน เอทิลอะซิเตท เอทานอล เมทานอล ไอโซโพรพานอล

และเฮกเซน พบว่าตัวทำละลายเมทานอลละลายผงขมิ้นชันได้ดี และสามารถสกัดสารเคอคูมินที่เป็นสารออกฤทธิ์สำคัญของขมิ้นชันได้ดีที่สุด⁽⁷⁾ การสกัดสารสำคัญจากฟ้าทะลายโจรพบว่าตัวทำละลาย เมทานอลให้น้ำหนักของสารสกัดหยาบที่ได้สูงที่สุดเช่นเดียวกัน จากงานวิจัยของ Farhana และคณะ ในปี พ.ศ. 2565 ได้สกัดสารสำคัญจากรากฟ้าทะลายโจรด้วยตัวทำละลาย เอทิลอะซิเตท เอทานอล และ เมทานอล พบว่าตัวทำละลาย เมทานอล ให้ปริมาณผลผลิตสูงที่สุดเท่ากับ ร้อยละ 12.60⁽⁸⁾ และ ในปี พ.ศ. 2552 Kumoro และ Hasan ได้สกัดสารแอนโดรกราโฟไลด์ (andrographolide) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของใบฟ้าทะลายโจรด้วยวิธี standard soxhlet method โดยใช้ตัวทำละลาย เฮกเซน ปีโตรเลียมอีเทอร์ เอทิลอะซิเตท คลอโรฟอร์ม อะซิโตน เอทานอล และ เมทานอล พบว่าตัวทำละลาย เมทานอล สามารถสกัดสารแอนโดรกราโฟไลด์ จากใบฟ้าทะลายโจรได้ดีที่สุด โดยได้ปริมาณผลผลิตเท่ากับร้อยละ 38.08⁽⁹⁾

การทดสอบสารสกัดหยาบเฮกเซน จากผงขมิ้นชันให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. fumigatus* ดีที่สุด (ค่าโซนยับยั้งการเจริญของเชื้อ เท่ากับ 12.10 มิลลิเมตร) ซึ่งจากงานวิจัยของ Das และ Bhatnagar ในปี พ.ศ. 2563 ที่ทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. flavus* ด้วยสารสกัดจากขมิ้นชันและขิง (ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิเมตร) พบว่าสารสกัดเฮกเซนมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. flavus* ได้ดีที่สุดในเช่นเดียวกัน (อัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อร้อยละ 47.19)⁽¹⁰⁾ การทดสอบสารสกัดหยาบเมทานอลจากผงฟ้าทะลายโจรให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อดีที่สุด จากเชื้อ *Mucor* sp. (ค่าโซนยับยั้งการเจริญของเชื้อ เท่ากับ 8.95 มิลลิเมตร) (Table 3) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chuku

และคณะ ในปี พ.ศ. 2563 ที่ทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อราด้วยสารสกัดฟ้าทะลายโจรด้วยตัวทำละลาย เอทานอล และเมทานอล ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhizopus sp.*, *A. niger*, *A. flavus* และ *Mucor sp.* พบว่าสารสกัดเมทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ทดสอบได้ดีที่สุดเช่นเดียวกัน⁽¹¹⁾ ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นที่พบว่าผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่ละลายด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท ให้ผลการทดสอบที่ดีที่สุด ในขณะที่เมื่อนำผงผลิตภัณฑ์สมุนไพรมาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ต่างชนิดกันพบว่าสารละลายเฮกเซน ให้ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดหยาบจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรมที่ดีที่สุด ทั้งนี้อาจเกิดจากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นได้มีการผสมตัวทำละลายลงไปในการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นสารประกอบที่สามารถออกฤทธิ์ได้ดีเมื่อละลายด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท แต่เมื่อได้สกัดสารสำคัญให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น ตัวทำละลายเฮกเซนสามารถสกัดออกมาได้ดีกว่าจึงทำให้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ดีกว่า จากการศึกษาในครั้งนี้ได้มีการใช้ตัวทำละลายเพียง 4 ชนิด ในการสกัดสารสำคัญ และจากผลการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดหยาบจากผลิตภัณฑ์ฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันขององค์การเภสัชกรรมในครั้งนี้ ที่พบว่ามียุทธินี้ดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา จึงสามารถนำสารสกัดหยาบที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ไปวิเคราะห์หาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา และนำไปทำให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นเพื่อใช้ในการผลิตยาต้านเชื้อราที่สกัดได้จากธรรมชาติต่อไปได้นอกจากนี้ผลจากการศึกษาในครั้งนี้ยังสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการเลือกชนิดของตัวทำละลายในการสกัดสารต้านเชื้อราจากผงสมุนไพรฟ้าทะลายโจรและขมิ้นชันขององค์การเภสัชกรรมที่ใช้ในผู้ป่วย

โควิด 19 เพื่อเพิ่มโอกาสในการค้นหาสารสำคัญที่สามารถป้องกันการติดเชื้อราวยโอกาสที่อาจเกิดการติดเชื้อในผู้ป่วยโควิด 19 ได้อีกด้วย

สรุป

การใช้ผลิตภัณฑ์สมุนไพรในการรักษาโรคโควิด 19 ในช่วงที่มีการระบาดของโรครุนแรงที่ผ่านมาด้วยผลิตภัณฑ์สมุนไพรขององค์การเภสัชกรรม 2 ชนิด คือ ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) และขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) และการที่พบโรคติดเชื้อรา โรคแอสเปอร์จิลโลซิส และมิวคอร์ไมโคซิส การศึกษานี้ได้ทดสอบสกัดสารต้านเชื้อราด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ 4 ชนิด และทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้นด้วยวิธี agar toxicity เพื่อเลือกชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสม พบว่าตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ดีกว่าตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดอื่น เมื่อสกัดสารสกัดหยาบจากผงสมุนไพรแล้วทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อรา ด้วยวิธี disc diffusion พบว่าสารสกัดหยาบเฮกเซนจากผงขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคได้ดีกว่าฟ้าทะลายโจร การวิจัยนี้เป็นการศึกษานำร่องในการเลือกใช้ตัวทำละลายโดยใช้คุณสมบัติการยับยั้งเชื้อราก่อโรคเป็นตัวบ่งชี้ (antifungal activity guided) เพื่อนำไปสู่การสกัดสารต้านเชื้อราให้บริสุทธิ์ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากสำนักงาน คณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรมปีงบประมาณ 2565 (R2565B092) ขอบพระคุณ รศ.ดร. วรศักดิ์ แก้วก่อง และนางสาวชนนิกานต์ ตู่ทอง ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร นายกิตติ ปานมณี

และนายปาน สถานทุง เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้ความอนุเคราะห์การใช้ชุดระเหยสารภายใต้ระบบสูญญากาศ และสถานที่การทำวิจัย คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

เอกสารอ้างอิง

1. Lansbury L, Lim B, Baskaran V, Lim WS. Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *J Infect* 2020; 81: 266-75.
2. Singh AK, Singh R, Joshi SR, Misra A. Mucormycosis in COVID-19: A systematic review of cases reported worldwide and in India. *Diabetes Metab Syndr* 2021; 15.
3. Martin Hoenigl, Danila Seidel, Agostinho Carvalho SMR, *et al.* The emergence of COVID-19 associated mucormycosis: Analysis of cases from 18 countries. *The Lancet. Microbe* 2022; 3: 543-52.
4. Tidwong N, Montakantikul P, Manosuthi W. Pharmacological treatment for the novel coronavirus disease 2019 (COVID-19 infection). *Pharm Sci Asia* 2020; 47: 97-103.
5. Satayavivad J. *Andrographis Paniculate* : from integrated research to clinical use as anti COVID-19. *J Chulabhorn Royal Acad* 2022; 4: 1-14.
6. Bormann M, Alt M, Schipper L, *et al.* Turmeric root and its bioactive ingredient curcumin effectively neutralize SARS-CoV-2 *in vitro*. *Viruses*. 2021; 13: 1914.
7. Asshok Kumar Popuri, Bangaraiah Pagala. Extraction of curcumin from tumeric roots. *IJIRS* 2013; 2: 290-9.
8. Farhana S, Aziz S, Rahman S, Afrin S, Bhuiyan MNI, Al-Reza SM. Chemical composition of fixed oil and *in vitro* antimicrobial activity of *Andrographis paniculata* root. *J King Saud Univ Sci* 2022; 34: 101921.
9. Andri Cahyo Kumoro, Masitah Has. Experimental and modeling studies of Andrographolide extraction from *Andrographis paniculata* in a soxhlet extractor. *Proceedings of the 1st International Conference on Natural Resources Engineering & Technology 2006 (24-25th July 2006)*; Putrajaya, Malaysia, 664-70.
10. Rashmi Das, Sunita Bhatnagar. Evaluation of *curcuma longa* and *curcuma amada* against aflatoxin producing fungus *Aspergillus flavus*. *World J Pharm Sci* 2020; 8: 8-12.
11. Chuku EC, Chika B, Nmom FW. Fungicidal property of *Andrographis paniculata* extract on fungal organisms from *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad (Melon Seeds). *IJISRT* 2020; 5.

12. Thanaboripat D, Thawai C, Jindaporn N, Mathurot O, Kongniam O. Growth inhibition of *Aspergillus flavus* IMI 242684 by crude extract of *Penicillium* sp. KMITL Sci Tech 2011; 11: 79-84.
13. Mulatu A, Megersa N, Tolcha T, Alemu T, Vetukuri RR. Antifungal compounds, GC-MS analysis and toxicity assessment of methanolic extracts of *Trichoderma* species in an animal model. PLoS ONE 2022; 17: e0274062.
14. Arikan S, Paetznick V, Rex JH. Comparative evaluation of disk diffusion with microdilution assay in susceptibility testing of caspofungin against *Aspergillus* and *Fusarium* isolates. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 3084-7.

Simple Sample Preparation with SDS for Direct Identification from Positive Blood Culture Using MALDI-TOF MS.

Nuttiya Srisurat* and Krittika Kamlangharn

Department of Medical Technology, Khon Kaen Hospital, Khon Kaen Province, Thailand

Abstract

Septicemia is a life-threatening condition. Accurate and rapid pathogen diagnosis is essential for providing appropriate and expedient care to patients, thereby reducing the severity and complications of the disease. The study aimed to evaluate the sample preparation method for direct bacterial identification by the matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) technique. One hundred fifty-seven positive blood culture samples from the BACTEX FX automated culture system were prepared for direct identification by MALDI-TOF MS. The preparation was done by using 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) as a lysis buffer and 70% formic acid and acetonitrile for protein extraction. Then, the samples were determined by MALDI-TOF MS and the results were compared to results from the standard method using colony from solid media. The results showed that by using the direct method, the identification results were correctly identified at species and genus levels at 81.53% (128/157) and 14.01% (22/157), respectively. There were unreliable identification results at 4.46% (7/157). Those that were identified consistently but the score represented lower than 1.70 were 3.82% (6/157) and no peak 0.64% (1/157). There was no misidentification by using the direct identification method. The direct identification results correctly identified at species levels were 75.68% (56/74), 88.24% (60/68) and 80.00% (12/15) for gram negative bacteria, gram positive bacteria and others (yeast and mycobacteria), respectively and at genus levels were 17.58% (13/74), 10.29% (7/68), and 13.33% (2/15), respectively. There was no difference of the spectral score level obtained from the direct identification compared to using colonies with the Wilcoxon Signed Rank test at a confidence level of 95% in the gram-negative bacteria ($p = 0.142$) and the others (yeast and mycobacteria) ($p = 0.530$). However, using the standard method with MALDI-TOF in the gram-positive bacteria yielded higher score compared to using the direct method, which are statistically significant ($p < 0.05$). This study revealed that the preparation of positive blood cultures with 10% SDS for direct identification

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

by MALDI-TOF MS showed excellent performance for pathogenic identification and shorter turn-around time by several hours or even days (< 30 minutes to 2 hours). This rapid direct identification allows a much faster optimization of antibiotic therapy in patients with sepsis compared to conventional workflows (only the gram stain result was known), for effective treatment thus reduced mortality and preventing drug resistance.

Keywords: Direct identification, Blood culture, MALDI-TOF MS

การเตรียมตัวอย่างแบบง่ายด้วย SDS เพื่อวินิจฉัยเชื้อโดยตรง จากตัวอย่างเลือดด้วย MALDI-TOF MS

นัตติยา ศรีสุราษ* และ กฤติกา กำลิ่งหาญ

กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น

บทคัดย่อ

การติดเชื้อในกระแสเลือดเป็นภาวะที่เป็นอันตรายถึงชีวิต การวินิจฉัยเชื้อก่อโรคได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว เป็นปัจจัยสำคัญที่จะทำให้ผู้ป่วยได้รับการดูแลรักษาที่ถูกต้องและทันท่วงที ซึ่งช่วยลดความรุนแรงและภาวะแทรกซ้อนของโรคลงได้ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินวิธีการเตรียมตัวอย่างเลือดสำหรับการจำแนกชนิดของเชื้อโดยตรงด้วยเทคนิค matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) โดยเตรียมตัวอย่างเลือดจากตัวอย่างที่พบผลบวกจากเครื่องเพาะเชื้อแบบอัตโนมัติ (the BACTEX FX system) จำนวน 157 ตัวอย่าง เริ่มจากการทำให้เซลล์แตกด้วยสารละลาย 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) จากนั้นสกัดโปรตีนด้วยสารละลาย 70% formic acid และ acetonitrile ก่อนนำไปจำแนกชนิดของเชื้อด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS เทียบกับวิธีการทดสอบด้วยโคโลนีที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ผลการศึกษาพบว่า การจำแนกชนิดของเชื้อจากตัวอย่างโดยตรงให้ผลการทดสอบถูกต้องในระดับ species และ genus คิดเป็นร้อยละ 81.53 (128/157) และร้อยละ 14.01 (22/157) ตามลำดับ ไม่สามารถรายงานผลได้ร้อยละ 4.46 (7/157) โดยร้อยละ 3.82 (6/157) ให้ผลการทดสอบที่มีระดับคะแนน (spectral score) น้อยกว่า 1.70 และร้อยละ 0.64 (1/157) ไม่พบ spectrum ของโปรตีน ผลการศึกษาไม่พบการจำแนกชนิดของเชื้อผิดพลาดจากการใช้ตัวอย่างโดยตรง ผลการทดสอบในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ แกรมบวก และเชื้อกลุ่มอื่น ๆ (ยีสต์และมัยโคแบคทีเรีย) การทดสอบจากตัวอย่างเลือดโดยตรงเทียบกับการใช้โคโลนีมีความถูกต้องในระดับ species คิดเป็นร้อยละ 75.68 (56/74), 88.24 (60/68) และ 80.00 (12/15) ตามลำดับ และความถูกต้องในระดับ genus คิดเป็นร้อยละ 17.58 (13/74), 10.29 (7/68) และ 13.33 (2/15) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบระดับคะแนน (spectral score) ระหว่างสองวิธี ด้วย Wilcoxon Signed Rank test ($p < 0.05$) พบว่าการใช้ตัวอย่างเลือดโดยตรงให้ผลการทดสอบไม่แตกต่างกับการใช้โคโลนีในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ ($p = 0.142$) และเชื้ออื่น ๆ (ยีสต์และมัยโคแบคทีเรีย) ($p = 0.530$) ส่วนแบคทีเรียแกรมบวก การใช้โคโลนีในการวินิจฉัยชนิดของเชื้อด้วย MALDI-TOF MS จะมีระดับคะแนน (score) สูงกว่าการใช้ตัวอย่างเลือดโดยตรง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการจำแนกชนิดของเชื้อจากตัวอย่างเลือดโดยตรงด้วย MALDI-TOF MS ให้ผลการทดสอบที่สอดคล้อง

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

กับวิธีอ้างอิง สามารถรายงานผลชนิดของเชื้อได้เร็วไม่เกิน 30 นาที - 2 ชั่วโมง ระยะเวลาไม่ต่างจากการย้อมสีแกรม และยังให้ผลดีกว่าเนื่องจากทราบชนิดของเชื้อก่อโรค ช่วยให้แพทย์สามารถพิจารณาใช้ยาได้ตรงกับชนิดเชื้อ ทำให้การรักษามีประสิทธิภาพ ลดอัตราการเสียชีวิต รวมถึงป้องกันการเกิดการดื้อยาในอนาคต

คำสำคัญ: การวินิจฉัยเชื้อโดยตรง, การเพาะเชื้อจากเลือด, MALDI-TOF MS

บทนำ

การติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) เกิดจากการที่ผู้ป่วยติดเชื้อที่ส่วนใดส่วนหนึ่งของร่างกาย จากนั้นเชื้อจะเข้าสู่กระแสเลือด เมื่อผู้ป่วยมีภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด การให้ยาปฏิชีวนะที่ช้าไปทุก ๆ 1 ชั่วโมง จะเพิ่มโอกาสการเสียชีวิตขึ้นร้อยละ 7.6⁽¹⁾ หากไม่ได้รับการรักษาที่ถูกต้องและทันเวลา การอักเสบอาจเกิดขึ้นทั่วร่างกาย ทำให้เกิดลิ้มเลือดและการอุดตันของหลอดเลือด ซึ่งมีผลต่อการลำเลียงออกซิเจนไปยังอวัยวะที่สำคัญของร่างกาย เมื่อไม่ได้รับออกซิเจนไปหล่อเลี้ยงอย่างเพียงพอ การทำงานของอวัยวะส่วนนั้นจึงล้มเหลว นำไปสู่ภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดแบบรุนแรง (severe sepsis) ภาวะช็อกจากการติดเชื้อ (septic shock)^(2,3)

ปัจจุบันภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดเป็นหนึ่งในปัญหาสำคัญของระบบสาธารณสุขไทย และถือเป็นประเด็นปัญหาสุขภาพในแผนการพัฒนาระบบบริการสุขภาพ (service plan) ของกระทรวงสาธารณสุข⁽⁴⁾ นอกจากนี้จะส่งผลกระทบต่อผู้ป่วยแล้ว ยังรวมถึงผลกระทบทั้งในด้านอุบัติการณ์ของการเกิดโรค อุบัติการณ์การเกิดเชื้อดื้อยา และค่าใช้จ่ายในการรักษาที่เพิ่มขึ้น การรักษาภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดซึ่งถือว่าเป็นภาวะวิกฤตของชีวิต ซึ่งต้องอาศัยการทำงานเป็นทีมสหสาขาวิชาชีพ เพื่อมีความรวดเร็วในการประเมินผู้ป่วย^(5,6) รวมถึงมีความรวดเร็วในการรักษาที่เหมาะสม จึงจะทำให้ผู้ป่วยมีผลลัพธ์ของการรักษาที่ดี และมีภาวะแทรกซ้อนลดลง^(7,8) ปัจจุบันการรักษาผู้ป่วยติดเชื้อในกระแสเลือดยังมีความจำเป็นต้องอาศัยผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ การเพาะเชื้อจากเลือด แต่การเพาะเชื้อในเลือดใช้เวลาในการรายงานผลไม่น้อยกว่า 48 ชั่วโมง หลังจากพบการเจริญของเชื้อในขวดเพาะเชื้อ (positive blood culture)⁽⁹⁾ ดังนั้นการตัดสินใจในการรักษาผู้ป่วยเบื้องต้น หลังตรวจ

พบเชื้อในกระแสเลือด จึงต้องอาศัยผลการย้อมสีแกรมจากขวดเพาะเชื้อที่พบผลบวก ซึ่งใช้เวลาในการรายงานผลเพียง 1-2 ชั่วโมง การตัดสินใจในการรักษาเบื้องต้นนี้ (empirical treatment) เป็นการคาดการณ์ตามผลการย้อมสีแกรมว่าน่าจะเป็นเชื้อชนิดไหน ร่วมกับการอาศัยข้อมูลด้านระบาดวิทยาของพื้นที่หรือโรงพยาบาล⁽⁶⁾ และแพทย์จะปรับเปลี่ยนการรักษาให้เหมาะสมเมื่อทราบผลจำแนกชนิดของเชื้อ และทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพ ตามวิธีมาตรฐาน ซึ่งต้องใช้เวลาโดยรวมไม่น้อยกว่า 72 ชั่วโมง หรือ 3 วัน การศึกษาหลายงานมีความพยายามในการพัฒนาวิธีการรายงานผลเพาะเชื้อในกระแสเลือดให้ถูกต้องและรวดเร็ว ซึ่งจะส่งผลทำให้การรักษาภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดได้เหมาะสม ทันเวลา สามารถลดอัตราการตายเนื่องจาก severe sepsis และ septic shock^(7,10-13) เช่น การนำโคโลนีของเชื้อที่ได้จากการเพาะเชื้อจากสิ่งส่งตรวจด้วยวิธีมาตรฐานมาทำการจำแนกด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS ซึ่งใช้เวลาตรวจเพียง 1-2 นาทีเท่านั้น^(10,14) แต่วิธีนี้ก็ยังคงต้องใช้เวลาในการเพาะเชื้อเพื่อให้ได้โคโลนีก่อน ซึ่งใช้เวลานานถึง 18-24 ชั่วโมง ดังนั้นการใช้โคโลนีในการทดสอบจึงทำให้สามารถรายงานผลจำแนกชนิดของเชื้อโดยรวมได้เร็วขึ้นประมาณ 1 วัน⁽¹⁴⁻¹⁶⁾ ต่อมาได้มีความพยายามในการรายงานผลชนิดของเชื้อให้เร็วยิ่งขึ้นด้วยการลดขั้นตอนการเพาะเชื้อ และจำแนกชนิดของเชื้อด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ด้วยการใช่วัตถุตัวอย่างโดยตรงแทนการใช้โคโลนี เช่น ตัวอย่างเลือด ปัสสาวะ และน้ำไขสันหลัง^(4,16-18) สำหรับตัวอย่างเลือดได้มีการพัฒนาชุดตรวจสำเร็จรูปเพื่อใช้ในการเตรียมตัวอย่าง^(12,18,19) ที่มีใช้อย่างแพร่หลาย เช่น The Sepsityper[®] Kit (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) ชุดตรวจสำเร็จรูปนี้ถูกผลิตมาเพื่อใช้ในการเตรียมตัวอย่างเลือดหลังพบผลบวกด้วย

เครื่องเพาะเชื้ออัตโนมัติ ก่อนนำไปทดสอบต่อเพื่อจำแนกชนิดของเชื้อด้วย MALDI-TOF MS เป็นวิธีการง่าย และใช้เวลาประมาณ 10 นาทีในการเตรียมตัวอย่าง การใช้ The Sepsityper[®] Kit ร่วมกับการจำแนกชนิดของเชื้อด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS จึงเป็นการลดขั้นตอนการเพาะเชื้อเนื่องจากไม่ต้องใช้โคโลนี ร่วมกับการใช้เทคโนโลยีใหม่ที่สามารถจำแนกชนิดของเชื้อที่รวดเร็ว ทำให้ห้องปฏิบัติการสามารถจำแนกชนิดของเชื้อได้ภายในเวลา 20-30 นาที หลังจากพบผลบวกจากขวดเพาะเชื้อ^(10,12,18,20,21) แต่มีข้อเสียคือ ชุดตรวจสำเร็จรูป หรือ The Sepsityper[®] Kit มีราคาแพง

คณะผู้วิจัยจึงได้มีการศึกษา และพัฒนาแนวทางการตรวจเพาะเชื้อในเลือดทางห้องปฏิบัติการ โดยได้พัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเลือดหลังพบการเจริญของเชื้อในขวดเพาะเชื้อ โดยใช้ 10% SDS (Sodium dodecyl sulfate) เป็นสารที่ทำให้เซลล์แตก (Lysis buffer)⁽²²⁾ แทนการใช้ The Sepsityper[®] Kit ล้างและปั่นเซลล์ให้ตกตะกอน นำตัวอย่างเลือดที่เตรียมได้ไปจำแนกชนิดของเชื้อด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ทำให้ห้องปฏิบัติการสามารถรายงานผลชนิดของเชื้อได้ภายในเวลาไม่เกิน 2 ชั่วโมง หลังพบการเจริญของเชื้อบนขวดเพาะเชื้ออัตโนมัติ

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างตรวจ

ตัวอย่างเลือดที่ส่งเพาะเชื้อในห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลขอนแก่น และให้ผลบวก โดยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ (The BD BACTEC 9240 system) ระหว่างเดือน พฤษภาคม - ธันวาคม 2564 จำนวน 157 ตัวอย่าง ประกอบด้วย gram positive bacteria 68 สายพันธุ์

และ gram negative bacteria 74 สายพันธุ์ และ เชื้อกลุ่มอื่น ๆ (ยีสต์และมัยโคแบคทีเรีย) 15 สายพันธุ์ โดยเกณฑ์การคัดเข้า (inclusion criteria) คือ ตัวอย่างเลือด ที่พบผลบวกด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ และเกณฑ์การคัดออก (exclusion criteria) ได้แก่ ตัวอย่างเลือดที่ให้ผลลบด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ ตัวอย่างชนิดอื่นที่ไม่ใช่เลือด และพบผลบวกด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ และตัวอย่างเลือดที่พบผลบวกที่พบเชื้อก่อโรคมากกว่า 1 ชนิด (polymicrobial growth) โดยการศึกษานี้ได้ผ่านการพิจารณาด้านจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ จากคณะกรรมการจริยธรรมวิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาลขอนแก่น รหัสโครงการวิจัย: KEXP64003

การเพาะเชื้อจากตัวอย่างเลือดที่พบผลบวกจากเครื่องเพาะเชื้ออัตโนมัติ

ขวดตัวอย่างเลือดที่พบผลบวกด้วยเครื่องตรวจเพาะเชื้ออัตโนมัติ (The BD BACTEC 9240 system (Aerobic/F, Anaerobic/F and Myco/F-lytic bottles); Becton Dickinson) ถูกนำมาเจาะด้วยวิธีปราศจากเชื้อ (Aseptic technic) ภายใน 2 ชั่วโมง หลังพบสัญญาณผลบวกด้วยเครื่องเพาะเชื้ออัตโนมัติ จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (blood agar, MacConkey agar, chocolate agar) ตามวิธีมาตรฐาน นำเชื้อไปย้อมสีแกรมและจำแนกชนิดเชื้อด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ต่อไป

การเตรียมตัวอย่างสำหรับการทดสอบด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS โดยตรงจากตัวอย่างเลือด

การเตรียมตัวอย่างเลือดในการศึกษานี้ผู้วิจัยได้พัฒนาปรับวิธีการจากแนวทางของชุดตรวจสำเร็จรูป (Sepsityper Kit)⁽¹²⁾ โดยคัดตัวอย่างเลือด

จากขวดเพาะเชื้อที่พบผลบวกใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นด้วยความเร็วรอบ 13,000 g นาน 2 นาที แล้วเทส่วนบนทิ้ง ตะกอนที่เหลือเติม MALDI grade water 1 มิลลิลิตร แล้วกระจายตะกอนโดยการใช้ไปเปตดูดขึ้น-ลง จากนั้นเติม 10% SDS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการใช้ไปเปตดูดขึ้น-ลง 10 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที เมื่อครบเวลา นำไปปั่นด้วยความเร็วรอบ 13,000 g นาน 2 นาที เทส่วนบนทิ้ง แล้วเติม MALDI grade water 1 มิลลิลิตร และกระจายตะกอนโดยการใช้ไปเปตนำไปปั่นด้วยความเร็วรอบ 13,000 g นาน 2 นาที เทส่วนบนทิ้ง เติม MALDI grade water ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และกระจายตะกอนโดยการใช้ไปเปต จากนั้นเติม 100% ethanol ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการใช้ไปเปตดูดขึ้น-ลง แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็วรอบ 13,000 g นาน 2 นาที เทส่วนบนทิ้ง ตะกอนที่ได้ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เมื่อครบเวลาเติมสารละลาย 70% formic acid และกระจายตะกอนโดยการใช้ไปเปต จากนั้นเติม acetonitrile ปริมาณเท่ากับสารละลาย 70% formic acid ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการใช้ไปเปตดูดขึ้น-ลง แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็วรอบ 13,000 g นาน 2 นาที ส่วนใสที่ได้ นำไปจำแนกชนิดของเชื้อโดยเทคนิค MALDI-TOF MS อัตราส่วนการเติมสารละลาย 70% formic acid / acetonitrile พิจารณาจากขนาดของตะกอนที่ได้ ได้แก่ ตะกอนเล็กมาก (มองไม่เห็นด้วยตาเปล่า) เติมสารละลาย 70% formic acid ปริมาตร 5 ไมโครลิตร / acetonitrile ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ตะกอนขนาดกลาง (เส้นผ่าศูนย์กลาง <1 มิลลิเมตร หรือ ขนาดเท่าหัวไม้ขีด) เติมสารละลาย 70% formic acid ปริมาตร 20 ไมโครลิตร / acetonitrile ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และตะกอนขนาดใหญ่

(เส้นผ่าศูนย์กลาง >1 มิลลิเมตร) เติมสารละลาย 70% formic acid ปริมาตร 50 ไมโครลิตร / acetonitrile ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

การจำแนกชนิดของเชื้อก่อโรคจากตัวอย่างโดยตรง และจากโคลนนี้ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS

การจำแนกชนิดของเชื้อจากตัวอย่างโดยตรง ทำโดยดูดส่วนใส 1 ไมโครลิตร ซึ่งได้จากการเตรียมตัวอย่างเลือดตามวิธีที่พัฒนา หยดลงบน target plate (หลอดละ 1 หลุม) แล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง สำหรับการจำแนกชนิดของเชื้อจากโคลนนี้ ทำโดยเขี่ยเชื้อจากโคลนนี้เดี่ยวที่ได้จากการเพาะเชื้อบนอาหารแข็ง ป้ายลงบน MALDI target plate 1 ตัวอย่าง ต่อ 1 หลุม^(14,23) สำหรับการควบคุมคุณภาพและทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องในการจำแนกชนิดของเชื้อกระทำทุกครั้งที่มีการทดสอบ โดยดูดสารละลาย IVD BTS (Bacterial Test Standard, Bruker Daltonics, Germany) ซึ่งเป็นเชื้อ *Escherichia coli* (DH5-alpha) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงบน target plate 1 หลุม แล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง⁽²⁴⁾ หยดสารละลาย IVD HCCA (α -cyano-hydroxycinnamic acid; Bruker Daltonics, Germany) ลงบนแต่ละหลุม ๆ ละ 1 ไมโครลิตร ปล่อยให้ทุกหลุมแห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นใส่ target plate ลงในเครื่อง MALDI-TOF MS เพื่อทดสอบการจำแนกชนิดของเชื้อ การแปลผลการทดสอบเป็นไปตามแนวทางกำหนดของเครื่องมือ โดยเครื่องจะนำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์หน้าหนักโมเลกุลของเปปไทด์ และรูปแบบของ m/z peak ที่เรียงตัวกันเป็น peptide mass fingerprint (PMF) เปรียบเทียบแมสสเปกตรัมกับฐานข้อมูล (Bruker database version 4.1.90) ความน่าเชื่อถือของผลการทดสอบจะรายงานเป็นคะแนน (score) โดยค่า score ≥ 2.00 หมายถึง

ผลการจำแนกชนิดของเชื้อถูกต้องที่ระดับ species ค่า score 1.70-1.99 หมายถึงผลการจำแนกชนิดของเชื้อถูกต้องที่ระดับ genus และ ค่า score น้อยกว่า 1.70 หมายถึง ไม่สามารถรายงานผลได้ หรือผลการจำแนกชนิดของเชื้อไม่น่าเชื่อถือ⁽²⁵⁾

การวิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบผลการจำแนกชนิดของเชื้อจากตัวอย่างเลือดที่ให้ผลบวกโดยตรงด้วยเทคนิค

MALDI-TOF MS กับการทดสอบด้วยโคโลนี ซึ่งเป็นวิธีอ้างอิง โดยใช้สถิติเชิงพรรณนา ส่วนการเปรียบเทียบความแตกต่างของระดับคะแนน (score) ระหว่างของผลการจำแนกชนิดเชื้อจากตัวอย่างโดยตรง และการใช้โคโลนี ตามวิธีที่แนะนำโดยผู้ผลิตเครื่องมือ ใช้การวิเคราะห์ด้วย Wilcoxon Signed Rank test โดยทดสอบการกระจายของข้อมูลก่อนด้วย Kolmogorov-Smirnov test ขั้นตอน และวิธีการศึกษาดังแสดงรายละเอียดตาม Fig. 1

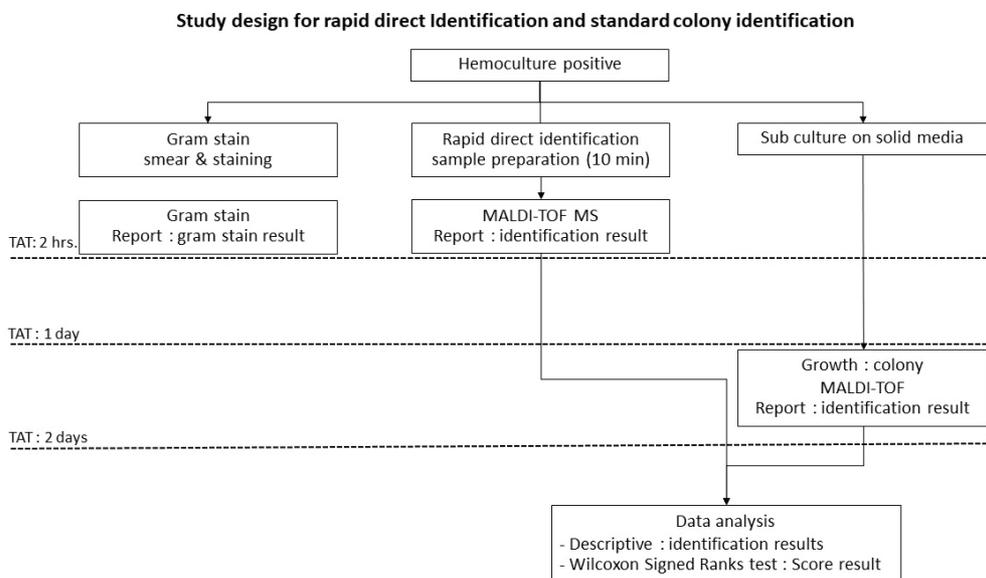


Fig. 1 Flowchart of the study design for direct Identification and standard colony identification. MALDI-TOF MS; Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight mass spectrometry, TAT; turn-around time.

ผลการวิจัย

ผลการจำแนกชนิดของเชื้อจากตัวอย่างเลือดที่พบผลบวกด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์หัตถ์โนมิติที่ตรวจพบโคโลนิบนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เกิน 1 สายพันธุ์ (monomicrobial growth) และหรือ ตรวจพบเชื้อหนึ่งชนิดจากกล้องจุลทรรศน์ จำนวน 157 ขวด จากผู้ป่วยจำนวน 157 ราย ประกอบด้วย ขวดเพาะเชื้อชนิด Aerobic/F จำนวน 154 ขวด Anaerobic/F จำนวน 1 ขวด และ Myco/F-Iytic จำนวน 2 ขวด ผลการศึกษาพบว่าผลการจำแนกชนิดของเชื้อจากตัวอย่างตรวจโดยตรงด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS

ให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องในระดับ species และ genus คิดเป็นร้อยละ 81.53 (128/157) และร้อยละ 14.01 (22/157) ตามลำดับ การจำแนกชนิดของเชื้อจากตัวอย่างโดยตรงพบว่าไม่สามารถรายงานผลได้คิดเป็นร้อยละ 4.46 (7/157) แบ่งเป็น ผลการทดสอบมีคะแนน หรือ score น้อยกว่า 1.7 ร้อยละ 3.82 (6/157) ไม่พบ spectrum ของโปรตีน หรือ no peak คิดเป็นร้อยละ 0.64 (1/157) และไม่พบการจำแนกชนิดของเชื้อผิดพลาดจากการใช้ตัวอย่างเลือดโดยตรง (Table 1)

Table 1 Direct identification results by MALDI-TOF MS from 157 blood culture samples compared to standard method.

Organism Identification by using colony (n)	Direct Identification by using 10% SDS as lysis buffer, n (%)				
	Correct		No reliable identified (score <1.70)	Mis-identified	No-peak
	Identified to species level (score ≥ 2.00)	Identified to genus level (score 1.70-1.99)			
Gram negative bacteria (74)	56 (75.68)	13 (17.58)	4 (5.41)	0	1 (1.35)
Gram positive bacteria (68)	60 (88.24)	7 (10.29)	1 (1.47)	0	0
Other organisms (15)	12 (80.00)	2 (13.33)	1 (6.67)	0	0
Total (157)	128 (81.53)	22 (14.01)	6 (3.82)	0	1 (0.64)

SDS; Sodium dodecyl sulfate, n; number of samples tested

ผลการจำแนกชนิดของเชื้อจากตัวอย่างเลือดที่พบผลบวกโดยตรง พบว่ากลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ 74 สายพันธุ์ มีผลการจำแนกชนิดของเชื้อด้วยวิธี MALDI-TOF MS ถูกต้องตรงกับการใช้โคโลนีซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน โดยผลการจำแนกชนิดของเชื้อมีความถูกต้องในระดับ species (score ≥ 2.00) และ genus (score 1.70-1.99) คิดเป็นร้อยละ 75.68 (56/74) และ 17.58 (13/74) ตามลำดับ ผลการทดสอบจากตัวอย่างโดยตรงไม่สามารถรายงานผลได้ 5 ตัวอย่าง เนื่องจาก 4 ตัวอย่าง มีคะแนนความเชื่อมั่นต่ำ (score < 1.7) ประกอบด้วย *Acinetobacter baumannii* (2 ตัวอย่าง) *Aeromonas hydrophila* (1 ตัวอย่าง) และ *Burkholderia pseudomallei* (1 ตัวอย่าง) และไม่พบสเปคตรัมของโปรตีน (no peak) 1 ตัวอย่าง ได้แก่ *Stenotrophomonas maltophilia* (Table 2) ส่วนแบคทีเรียแกรมบวกพบการจำแนกชนิดของเชื้อถูกต้องในระดับ species และ genus คิดเป็นร้อยละ 88.24 (60/68) และ 10.29 (7/68) ไม่สามารถรายงานผลได้ 1 ราย ได้แก่ *Staphylococcus epidermidis* เนื่องจากมีคะแนนความเชื่อมั่นของ score น้อยกว่า 1.7 (Table 3) สำหรับการจำแนกชนิดของเชื้อในกลุ่มอื่น ๆ (ยีสต์และมัยโคแบคทีเรีย) พบว่าการใช้ 10% SDS ในการ

เตรียมตัวอย่าง สามารถจำแนกชนิดของเชื้อได้อย่างถูกต้องที่ระดับ species และ genus คิดเป็นร้อยละ 80.00 (12/15) และ 13.33 (2/15) ตามลำดับ มี 1 ตัวอย่าง ไม่สามารถรายงานผลได้เนื่องจากมีคะแนน score น้อยกว่า 1.7 คือ *Cryptococcus neoformans* (Table 1 และ 4)

เมื่อวิเคราะห์ห้ระดับคะแนน (spectral score) ที่ได้จากการทดสอบด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ในกลุ่มเชื้อที่สามารถรายงานผลได้ (ระดับคะแนนหรือ score ≥ 1.7) เปรียบเทียบระหว่างการทดสอบด้วยตัวอย่างเลือดโดยตรง กับการใช้โคโลนีจากอาหารแข็ง ด้วย Wilcoxon Signed Rank Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าการจำแนกชนิดของเชื้อจากตัวอย่างเลือดโดยตรงกับการใช้โคโลนีที่ได้จากอาหารแข็ง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ ($p = 0.142$) และเชื้อกลุ่มอื่น ๆ (ยีสต์และมัยโคแบคทีเรีย) ($p = 0.530$) ส่วนแบคทีเรียแกรมบวก พบว่าการใช้โคโลนีในการวินิจฉัยชนิดของเชื้อ ด้วย MALDI-TOF MS จะมีระดับคะแนน (score) สูงกว่าการใช้ตัวอย่างเลือดโดยตรงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.003$) (Table 2, 3 และ 4)

Table 2 Direct identification results of gram-negative bacteria by MALDI-TOF MS from positive blood culture samples compared to the standard method.

Organism Identification by using colony (n)	Direct Identification by using 10% SDS as lysis buffer, n (%)				
	Correct		No reliable identified (score <1.70)	Mis- identified	No-peak
	Identified to species level (score ≥ 2.00)	Identified to genus level (score 1.70-1.99)			
<i>A. baumannii</i> (7)	3 (42.86)	2 (28.57)	2 (28.57)	0	0
<i>B. pseudomallei</i> (11)	2 (18.18)	8 (72.73)	1 (9.09)	0	0
<i>E. cloacae</i> (3)	3 (100)	0	0	0	0
<i>E. coli</i> (20)	20 (100)	0	0	0	0
<i>K. pneumoniae</i> (6)	6 (100)	0	0	0	0
<i>M. morganii</i> (2)	2 (100)	0	0	0	0
<i>P. mirabilis</i> (4)	4 (100)	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i> (5)	4 (80)	1 (20.00)	0	0	0
<i>Salmonella species</i> (4)	4 (100)	0	0	0	0
<i>V. vulnificus</i> (3)	1 (33.33)	2 (66.67)	0	0	0
<i>Achromobacter xylosoxidans</i> (2)	2 (100)	0	0	0	0
<i>Aeromonas caviae</i> (2)	2 (100)	0	0	0	0
<i>Aeromonas hydrophila</i> (1)	0	0	1 (100)	0	0
<i>Aeromonas veronii</i> (1)	1 (100)	0	0	0	0
<i>B. cepacia</i> (1)	1 (100)	0	0	0	0
<i>B. vietnamiensis</i> (1)	1 (100)	0	0	0	0
<i>S. maltophilia</i> (1)	0	0	0	0	1 (100)
Total gram negative (74)	56 (75.68)	13 (17.58)	4 (5.41)	0	1 (1.35)
Wilcoxon Signed Rank test	$p = 0.142$				

SDS; Sodium dodecyl sulfate, n; number of samples tested, p ; p -value (statistically significant < 0.05)

Table 3 Direct identification results of gram-positive bacteria by MALDI-TOF MS from positive blood culture samples compared to the standard method.

Organism identified by using colony (n)	Direct Identification by using 10% SDS as lysis buffer, n (%)				
	Correctly identified		Unreliable (score <1.70)	Mis- identified	No-peak
	at species level (score \geq 2.00)	at genus level (score 1.70-1.99)			
<i>E. faecalis</i> (6)	4 (66.67)	2 (33.33)	0	0	0
<i>E. faecium</i> (8)	8 (100)	0	0	0	0
<i>S. agalactiae</i> (2)	2 (100)	0	0	0	0
<i>S. aureus</i> (18)	18 (100)	0	0	0	0
<i>S. dysgalactiae</i> (5)	5 (100)	0	0	0	0
<i>S. haemolyticus</i> (4)	2 (50)	2 (50.00)	0	0	0
<i>S. pneumoniae</i> (2)	2 (100)	0	0	0	0
<i>S. pyogenes</i> (10)	7 (70)	3 (30.00)	0	0	0
<i>S. suis</i> (6)	6 (100)	0	0	0	0
<i>E. rhusiopathiae</i> (1)	1 (100)	0	0	0	0
<i>Lactococcus lactis</i> (1)	1 (100)	0	0	0	0
<i>S. galloyticus</i> (1)	1 (00)	0	0	0	0
<i>S. sanguinis</i> (1)	1 (100)	0	0	0	0
<i>S. saprophyticus</i> (1)	1 (100)	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i> (2)	1 (50)	0	1 (50)	0	0
Total gram positive (68)	60 (88.24)	7 (10.29)	1 (1.47)	0	0

Wilcoxon Signed Rank test $p = 0.003$

SDS; Sodium dodecyl sulfate, n; number of samples tested, p ; p -value (statistically significant < 0.05)

Table 4 Direct identification results of other organism (Yeast, Mycobacteria) by MALDI-TOF MS from positive blood culture samples compared to the standard method.

Organism identified by using colony (n)	Direct Identification by using 10% SDS as lysis buffer, n (%)				
	Correctly identified		Unreliable (score <1.70)	Mis- identified	No-peak
	at species level (score ≥ 2.00)	at genus level (score 1.70-1.99)			
Other organisms					
<i>C. albicans</i> (3)	3 (100)	0	0	0	0
<i>C. glabrata</i> (1)	1 (100)	0	0	0	0
<i>C. neoformans</i> (5)	4 (80)	0	1 (20.00)	0	0
<i>C. tropicalis</i> (2)	2 (100)	0	0	0	0
<i>M. kansasii</i> (1)	0	1 (100)	0	0	0
<i>M. tuberculosis</i> (1)	0	1 (100)	0	0	0
<i>Rhodococcus hoagii</i> (1)	1 (100)	0	0	0	0
<i>Clostridium perfringens</i> (1)	1 (100)	0	0	0	0
Total other organisms (15)	12 (80.00)	2 (13.33)	1 (6.67)	0	0
Wilcoxon Signed Rank test	$p = 0.530$				

SDS; Sodium dodecyl sulfate, n; number of samples tested, p ; p -value (statistically significant < 0.05)

วิจารณ์

การศึกษาที่ผ่านมามีการพัฒนาวิธีเพื่อให้สามารถรายงานผลจำแนกชนิดของเชื้อให้เร็วขึ้น โดยลดขั้นตอนการเพาะเชื้อด้วยการใช้ตัวอย่างโดยตรงในการจำแนกชนิดของเชื้อแทนการใช้โคโลนี มีการพัฒนาน้ำยาสำเร็จรูปเพื่อให้เตรียมตัวอย่างเลือด เช่น The Sepsityper[®] Kit^(18-19,21) เพื่อนำไปทดสอบต่อด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ทำให้สามารถจำแนกชนิดของเชื้อได้ในเวลาเฉลี่ย 20-30 นาทีต่อราย หลังจากพบผลบวกโดยเครื่องเพาะเชื้อในเลือดอัตโนมัติ^(10, 12, 20) และให้ผลการจำแนกชนิดของเชื้อได้ถูกต้องทั้งในแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ และยีสต์^(18-21,26) แต่ข้อเสียคือน้ำยาสำเร็จรูปมีราคาแพง การศึกษาที่ผู้วิจัยได้ลดขั้นตอนการเพาะเชื้อในอาหารแข็งและพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างเลือดหลังพบการเจริญของเชื้อบนขูดเพาะเชื้อแบบอัตโนมัติ โดยปรับวิธีทดสอบจากชุดตรวจสำเร็จรูป (MBT Sepsityper[®] IVD Kit) ด้วยการลดขั้นตอนการปั่นล้างตะกอนเหลือ 2 รอบ และใช้การเทส่วนบนทิ้งเพื่อให้ง่ายต่อการใช้งาน รวมถึงปรับใช้สารที่ทำให้เซลล์แตก (lysis buffer) ซึ่งสามารถหาได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป คือสารละลาย 10% SDS แทนการใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป

อย่างไรก็ตาม การใช้ตัวอย่างเลือดโดยตรงพบว่าเม็ดเลือดแดงในตัวอย่างเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อประสิทธิภาพการจำแนกชนิดของเชื้อด้วย MALDI-TOF MS การเลือกใช้ lysis buffer รวมถึงขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อให้ได้โปรตีนของเชื้อจึงมีความสำคัญ และส่งผลต่อความถูกต้องของผลการทดสอบ^(12,20,27) การศึกษานี้มีการประเมินวิธีการเตรียมตัวอย่างเลือดและใช้สารละลาย 10% SDS เป็น lysis buffer พบว่าสามารถจำแนกชนิดของเชื้อได้ถูกต้อง ทั้งกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ และกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก รวมถึงเชื้อกลุ่มอื่นๆ ได้แก่ ยีสต์

และเชื้อก่อวัณโรค สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่มีการเตรียมตัวอย่างด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป (The Sepsityper[®] Kit)^(18,21) รวมถึงการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการที่แต่ละแห่งพัฒนา^(12,28,29) ซึ่งพบว่า MALDI-TOF MS สามารถจำแนกชนิดของเชื้อจากตัวอย่างเลือดโดยตรงได้ถูกต้อง ในแบคทีเรียแกรมลบ และแบคทีเรียแกรมบวก คิดเป็นร้อยละ 90-100 และ 76-100 ตามลำดับ สำหรับยีสต์และเชื้อก่อวัณโรค การใช้ 10% SDS ในการเตรียมตัวอย่างสามารถจำแนกชนิดของเชื้อได้อย่างถูกต้องร้อยละ 93.33 (14/15) เหนือกว่าการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ศึกษาการใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป (The Sepsityper[®] Kit) ในการเตรียมตัวอย่าง และให้ผลการทดสอบด้วย MALDI-TOF MS ได้ถูกต้องประมาณร้อยละ 60-62^(12,18) เมื่อศึกษาระดับคะแนน (score) ที่ได้จากการทดสอบด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS การศึกษานี้พบว่าการจำแนกชนิดของเชื้อจากตัวอย่างโดยตรงส่วนใหญ่มีระดับคะแนน (score) ต่ำกว่าการทดสอบจากโคโลนีของเชื้อที่ขึ้นในอาหารแข็ง (Table 3) สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้^(10,12,30) ซึ่งเป็นไปได้ว่าเกิดจากการปนเปื้อนของโปรตีนจากเม็ดเลือดแดง และหรือจากเซลล์อื่น ๆ ที่มีในตัวอย่างตรวจจึงทำให้คะแนนความเชื่อมั่นต่ำลง⁽²⁰⁾ อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์ค่าระดับคะแนนที่ได้จากการทดสอบด้วย MALDI-TOF MS เปรียบเทียบระหว่างการใช้ตัวอย่างเลือดโดยตรงกับการใช้โคโลนีตามวิธีที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ ด้วย Wilcoxon Signed Rank test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าการใช้ตัวอย่างเลือดโดยตรงให้ผลการทดสอบไม่แตกต่างกับการใช้โคโลนีที่ได้จากอาหารแข็ง ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ ($p = 0.142$) และกลุ่มเชื้ออื่นที่ไม่ใช่แบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ ($p = 0.530$) แต่มีความแตกต่างในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก โดยพบว่าการใช้

ตัวอย่างเลือดโดยตรงในการวินิจฉัยชนิดของเชื้อ ด้วย MALDI-TOF MS จะมีระดับคะแนน (score) ต่ำกว่าการใช้โคโลนีในการทดสอบ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังนั้นในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก จึงควรระมัดระวังในการแปลผลการทดสอบ โดยเฉพาะในเชื้อที่มีสเปกตรัมของโปรตีนที่ใกล้เคียงกัน

การจำแนกชนิดของเชื้อด้วยตัวอย่างเลือดโดยตรงด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS การศึกษานี้พบว่าร้อยละ 4.46 (7/157) ไม่สามารถรายงานผลได้ เนื่องจากมี score น้อยกว่า 1.7 คิดเป็นร้อยละ 3.82 (6/157) ได้แก่ *Acinetobacter baumannii* (2 ราย), *Aeromonas hydrophilla* (1 ราย), *Burkholderia pseudomallei* (1 ราย), *Staphylococcus epidermidis* (1 ราย) และ *Cryptococcus neoformans* (1 ราย) อีกร้อยละ 0.61 (1/157) มีผลการทดสอบเป็น no peak ผลการทดสอบเป็น no peak อาจเกิดจากความผิดพลาดในขั้นตอนหลังการปั่นเพื่อให้เซลล์ตกตะกอนแล้วทิ้งส่วนบน การศึกษานี้ใช้การ “เท” ส่วนบนทิ้ง แทนการใช้ไปเปิดค่อย ๆ ดูดทิ้ง เนื่องจากเป็นวิธีการที่ง่าย และสะดวกสำหรับการปฏิบัติในงานประจำ ผลจากการเทส่วนบนทิ้ง อาจทำให้ตะกอนหรือเซลล์ของแบคทีเรียหลุดไป ดังนั้นกรณีที่ผลการทดสอบเป็น no peak หรือสังเกตว่าไม่มีตะกอนหลังเทส่วนบนทิ้ง ควรมีการเตรียมตัวอย่างเพื่อทดสอบใหม่ และเปลี่ยนใช้ไปเปิดดูดูส่วนบนทิ้งด้วยความระมัดระวังแทนตามวิธีของชุดทดสอบสำเร็จรูป และหลายการศึกษาแนะนำ^(12,18,21,28,29) นอกจากนี้การทิ้งขวดเพาะเชื้อในเลือดหลังพบผลบวกไว้นานเกินไป อาจมีผลทำให้เชื้อจุลินทรีย์ตายตัวทำให้คุณสมบัติของโปรตีนเสียไป อย่างไรก็ตามการศึกษานี้มีการเตรียมตัวอย่างเลือดภายใน 2 ชั่วโมง หลังจากพบสัญญาณบวกโดยเครื่องเพาะเชื้อในเลือดแบบอัตโนมัติ

สรุป

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า 10% SDS สามารถใช้เตรียมตัวอย่างเลือดก่อนจำแนกชนิดของเชื้อด้วย MALDI-TOF MS ได้ทั้งในแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ รวมถึงเชื้ออื่น ๆ (ยีสต์และมัยโคแบคทีเรีย) การจำแนกชนิดของเชื้อจากตัวอย่างโดยตรงจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการพัฒนางานประจำ เพื่อให้สามารถรายงานผลชนิดของเชื้ออย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะการตรวจพบเชื้อในเลือดซึ่งถือเป็นค่าวิกฤติ การรายงานผลชนิดของเชื้อที่เร็วขึ้นจากเดิม 24-48 ชั่วโมง เหลือเพียงภายในเวลา 30 นาที - 2 ชั่วโมง หลังพบการเจริญเติบโตของเชื้อด้วยเครื่องเพาะเชื้อจากเลือดอัตโนมัติ จะทำให้ทราบชนิดของเชื้อก่อโรคเร็วขึ้น สามารถนำมาปรับใช้เพื่อรายงานผลเบื้องต้นแทนการรายงานผลการย้อมสีแกรมซึ่งเป็นแนวทางที่ใช้ในปัจจุบัน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณสมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทยในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ ที่ให้ทุนสนับสนุนและพัฒนางานวิจัยในการศึกษาคั้งนี้ ขอขอบคุณผู้อำนวยการโรงพยาบาลขอนแก่น หัวหน้ากลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลขอนแก่น ที่อนุญาตให้สามารถทำการศึกษาวิจัยได้ ขอขอบคุณคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาลขอนแก่น ที่ได้ช่วยทบทวนโครงร่างงานวิจัยให้ออกมาอย่างสมบูรณ์ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลขอนแก่นทุกท่าน ที่รวบรวมและเก็บตัวอย่าง รวมทั้งผู้ป่วยทุกรายที่ได้ให้ตัวอย่างทดสอบเพื่อศึกษาวิจัยในคั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Kumar A, Roberts D, Wood KE, *et al.* Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med* 2006; 34: 1589-96. DOI: 10.1097/01.CCM.0000217961.75225.E9
2. Anderson FS, Rodrigo C, Schandert L, *et al.* Evaluation of MALDI-TOF MS in the microbiology laboratory. *J Bras Patol Med Lab* 2013; 49: 191-7. doi.org/10.1590/S1676-24442013000300006
3. Yun F, Wang W, Jianfeng Fu. Rapid laboratory diagnosis for respiratory infectious diseases by using MALDI-TOF mass spectrometry. *J Thorac Dis* 2014; 6: 507-11. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2014.03.34
4. Patel R. MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases. *Clin Chem* 2015; 61: 100-11. doi.org/10.1373/clinchem.2014.221770
5. Shin TG, Jo IJ, Hwang SY, *et al.* Comprehensive interpretation of central venous oxygen saturation and blood lactate levels during resuscitation of patients with severe sepsis and septic shock in the Emergency Department. *Shock* 2016; 45: 4-9. doi:10.1097/SHK.0000000000000466
6. Dugar S, Choudhary C, Duggal A. Sepsis and septic shock: Guideline-based management. *Cleve Clin J Med* 2020; 87: 53-64. doi: 10.3949/ccjm.87a.18143
7. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Porras-Guerra I, *et al.* Microorganisms direct identification from blood culture by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 546-51. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03257.x
8. Perez KK, Olsen RJ, Musick WL, *et al.* Integrating rapid pathogen identification and antimicrobial stewardship significantly decreases hospital costs. *Arch Pathol Lab Med* 2013; 137: 1247-54. doi:10.5858/arpa.2012-0651-OA
9. Oviano M, Rodríguez-Sánchez B, Gomara M, *et al.* Direct identification of clinical pathogens from liquid culture media by MALDI-TOF MS analysis. *Clin Microbiol and Infect* 2018; 24: 624-9. doi:10.1016/j.cmi.2017.09.010
10. Ferroni A, Suarez S, Beretti JL, *et al.* Real time identification of bacteria and yeast in positive blood culture broths by MALDI-TOF-mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 1542-8.
11. Garnacho-Montero J, Gutierrez-Pizarraya A, Escobresca-Ortega A, *et al.* De-escalation of empirical therapy is associated with lower mortality in patients with severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med* 2014; 40: 32-40. doi:10.1007/s00134-013-3077-7

12. Ponderand L, Pavese P, Maubon D, *et al.* Evaluation of rapid sepsityper module (Bruker Daltonics) for the rapid diagnosis of bacteremia and fungemia by MALDI-TOF-MS. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2020; 19: 1-15. doi:10.1186/s12941-020-00403-w
13. Wimmer JL, Long SW, Cernoch P, *et al.* Strategy for rapid identification and antibiotic susceptibility testing of gram-negative bacteria directly recovered from positive blood cultures using the Bruker MALDI Biotyper and the BD Phoenix System. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 2452-4. doi:10.1128/JCM.00409-12
14. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, *et al.* “Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* 2009; 49: 543-51.
15. Florio W, Tavanti A, Barnini S, Ghelardi E, Lupetti A. Recent advances and ongoing challenges in the diagnosis of microbial infections by MALDI-TOF mass spectrometry. *Front Microbiol* 2018; 1-9. doi:10.3389/fmicb.2018.01097
16. Hou TY, Chiang-Ni C, Teng SH. Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. *J Food Drug Anal* 2019; 27: 404-14.
17. Han SS, Jeong YS, Choi SK. Current Scenario and Challenges in the Direct Identification of Microorganisms Using MALDI TOF MS. *Microorganisms* 2021; 9: 1-11. doi:10.3390/microorganisms9091917
18. Morgenthaler NG, Kostrzewa M. Rapid identification of pathogens in positive blood culture of patients with sepsis: review and metaanalysis of the performance of the sepsityper kit. *Int J Microbiol* 2015: 1-10.
19. Loonen AJ, Jansz AR, Stalpers J, Wolffs PF, van den Brule AJ. An evaluation of three processing methods and the effect of reduced culture times for faster direct identification of pathogens from BacT/ALERT blood cultures by MALDI-TOF MS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31: 1575-83.
20. Schubert S, Weinert K, Wagner C, *et al.* “Novel, improved sample preparation for rapid, direct identification from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry”. *J Mol Diagn* 2011; 13: 701-6.
21. Kok J, Thomas LC, Olma T, Chen SCA, Iredell JR. Identification of bacteria in blood culture broths using matrix-assisted laser desorption-ionization SepsityperTM and time of flight mass spectrometry. *PLoS One* 2011; 6: 1-7.

22. Wada A, Mari Kono M, Kawauchi S, Takagi Y, Morikawa T, Funakoshi K. Rapid discrimination of gram-positive and gram-negative bacteria in liquid samples by using NaOH-sodium dodecyl sulfate solution and flow cytometry. *PLoS One* 2012; 7: 1-10.
23. Cayrou C, Raoult D, Drancourt M. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the identification of environmental organisms: the Planctomycetes paradigm. *Environ Microbiol Rep* 2010; 2: 752-60.
24. Bourassa L. MALDI TOF MS Quality Control in Clinical Microbiology. *Clinical Laboratory News*. [serial on the Internet]. 2018 Jan [cited 2023 Sep 11]. Available form: <https://www.aacc.org/cIn/articles/2018/janfeb/maldi-tof-ms-quality-control-in-clinical-microbiology>.
25. Marko DC, Saffert RT, Cunningham SA, *et al*. Evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cultures from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 2034-9. doi:10.1128/JCM.00330-12
26. Arroyo MA, Denys GA. Parallel Evaluation of the MALDI Sepsityper and Verigene BC-GN Assays for rapid identification of gram-negative bacilli from positive blood cultures. *J Clin Microbiol* 2017; 55: 2708-18.
27. Clerc O, Prod'hom G, Vogne C, Bizzini A, Calandra T, Greub G. Impact of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry on the clinical management of patients with gram-negative bacteremia: a prospective observational study. *Clin Infect Dis* 2013; 56: 1101-7.
28. Nomura F, Tsuchida S, Murata S, Satoh M, Matsushita K. Mass spectrometry-based microbiological testing for blood stream infection. *Clin Proteom* 2020; 17: 1-11. doi:10.1186/s12014-020-09278-7
29. Lin JF, Ge MC, Liu TP, Chang SC, Lu JJ. A simple method for rapid microbial identification from positive monomicrobial blood culture bottles through matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Microbiol Immunol Infect* 2018; 51: 659-65.
30. Stevenson LG, Drake SK, Murray PR. Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 444-7.



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 และไม่อยู่ระหว่างการพิจารณาลงในวารสารใดๆ

3. บทความจะต้องมีการอ่านตรวจทานต้นฉบับ จากคณะกรรมการหรือผู้ทรงคุณวุฒิเฉพาะสาขาจากภายนอกอย่างน้อย 2 ท่าน ทั้งนี้เพื่อให้วารสารมีคุณภาพในระดับมาตรฐานสากลและนำไปอ้างอิงได้

4. บทความที่ตีพิมพ์ลงในวารสารเทคนิคการแพทย์แล้วถือว่าเป็นลิขสิทธิ์ของวารสารเทคนิคการแพทย์ สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

5. ข้อเขียนและข้อคิดเห็นใดๆ ในวารสารนี้เป็นความคิดเห็นส่วนตัว และเป็นความรับผิดชอบของผู้เขียนทั้งสิ้น ไม่ใช่ความเห็นของคณะกรรมการ

วารสารเทคนิคการแพทย์ และสมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

6. การถอนบทความระหว่างขั้นตอนการพิจารณาโดยไม่มีเหตุผลสมควร กองบรรณาธิการขอสงวนสิทธิ์รับพิจารณาตีพิมพ์บทความครั้งต่อไปเป็นระยะเวลา 2 ปี

7. บทความประเภทนิพนธ์ต้นฉบับ รายงานกรณีศึกษา และบทความวิจัยอย่างสั้น ผู้นิพนธ์ต้องแนบหนังสือรับรองที่ได้รับอนุญาตจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน (Ethic committee)

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

ค่าธรรมเนียมการเผยแพร่ ไม่เสียค่าใช้จ่าย

ประเภทของบทความ แบ่งออกเป็น 9 ประเภท คือ

1. บทบรรณาธิการ (Editorials) เป็นบทความซึ่งวิเคราะห์ผลงานทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่มีความสำคัญในวิชาชีพเทคนิคการแพทย์ หรือ

วิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้อง หรืออาจจะเป็นข้อคิดเห็นเพื่อประโยชน์ในด้านการยกระดับวิชาชีพเทคนิคการแพทย์ให้สูงขึ้น

2. บทความปริทัศน์ (Review Article)

เป็นบทความเพื่อฟื้นฟูวิชาการซึ่งรวบรวมผลงานเกี่ยวกับเรื่องใดเรื่องหนึ่งโดยเฉพาะ ที่เคยลงตีพิมพ์ในวารสารอื่นมาแล้วโดยนำเรื่องมาวิเคราะห์ วิจัย และเปรียบเทียบเพื่อให้เกิดความกระจ่างแก่ผู้อ่านเกี่ยวกับเรื่องนั้น

3. นิพนธ์ต้นฉบับ (Original Article)

เป็นรายงานเกี่ยวกับผลการวิจัยทางด้านเทคนิคการแพทย์และวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่เกี่ยวข้องโดยไม่เคยตีพิมพ์ที่ไหนมาก่อน

4. บทความพิเศษ (Special Article)

เป็นบทความเกี่ยวกับเรื่องทั่วไปที่มีเนื้อหาและสาระที่เป็นประโยชน์และสร้างสรรค์ เพื่อพัฒนาผู้อ่านวารสารทุกระดับให้ได้รับรู้ความสามารถ เพื่อนำองค์ความรู้ไปประยุกต์ใช้ในชีวิตประจำวัน เช่น เรื่องเกี่ยวกับหลักธรรมะ ศิลปะการพูด ฯลฯ

5. รายงานการประชุมวิชาการ (Seminar Report) เป็นรายงานจากการประชุมสัมมนาวิชาการที่เป็นประโยชน์แก่ผู้อ่านวารสารเทคนิคการแพทย์

6. รายงานกรณีศึกษา (Case Report)

เป็นรายงานเกี่ยวกับกรณีวินิจฉัยโรคในผู้ป่วยรายที่นำเสนอทั้งทางด้านประวัติผลการตรวจร่างกาย และการตรวจทางห้องปฏิบัติการคลินิกร่วมกัน

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

8. จดหมายถึงบรรณาธิการ (Letter to the Editor) เป็นบทความซึ่งเสนอข้อคิดเห็นและประสบการณ์ทางด้านวิชาการที่เกี่ยวข้องกับงานในสาขาวิชาชีพเทคนิคการแพทย์อย่างสั้นๆ ในรูปของจดหมายถึงบรรณาธิการ

9. ย่อวารสาร (Abstract Review) เป็นการย่อบทความทางวิชาการด้านเทคนิคการแพทย์

และวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องและน่าสนใจ ซึ่งได้รับการตีพิมพ์แล้วในวารสารนานาชาติ เป็นภาษาไทย

การเตรียมต้นฉบับ

เพื่อให้การตีพิมพ์บทความเป็นไปอย่างถูกต้องและรวดเร็วผู้นิพนธ์จะต้องปฏิบัติตามรายละเอียด ดังนี้

1. ภาษา ให้ใช้ได้ 2 ภาษาคือภาษาไทยและ/หรือภาษาอังกฤษ ถ้าต้นฉบับเป็นภาษาไทยควรพยายามใช้ถ้อยคำและศัพท์ภาษาไทยมากที่สุด โดยใช้ตามพจนานุกรมศัพท์แพทย์อังกฤษ-ไทย และพจนานุกรมศัพท์วิทยาศาสตร์ฉบับราชบัณฑิตยสถานสำหรับคำศัพท์ภาษาอังกฤษที่บัญญัติเป็นภาษาไทยแล้วแต่ยังไม่เป็นที่ทราบกันอย่างแพร่หลาย หรือแปลแล้วเข้าใจยาก ให้กำกับภาษาเดิม (อังกฤษ) ในวงเล็บหรืออนุโลมให้ใช้ภาษาอังกฤษได้

2. ต้นฉบับ พิมพ์ด้วยโปรแกรม Word for Windows ด้วยอักษร Cordia New ขนาด 14 และพิมพ์เลขหน้าที่ตรงกลางขอบล่างของทุกหน้า โดยไม่ต้องพิมพ์ชื่อสกุลผู้นิพนธ์ในต้นฉบับ โดยเนื้อหาต้นฉบับทั้งหมดรวมรูปภาพ/ตาราง ไม่ควรเกิน 12 หน้า กระดาษ A4 รูปภาพ/ตารางรวมกันไม่ควรเกิน 5 รูป/ตาราง

ส่งต้นฉบับของบทรายงานหรือบทความต่าง ๆ 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 ของผู้นิพนธ์ทุกคนที่สามารถติดต่อได้

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 ให้แยกไว้ท้ายบทความโดยใช้หน้าต่อหน้าตาราง หรือหนึ่งแผนภูมิ สำหรับภาพเป็นระบบอิเล็กทรอนิกส์ให้บันทึกภาพโดยใช้นามสกุล .jpg หรือ .tif สำหรับข้อความและคำอธิบายในตารางและภาพใช้เป็นภาษาอังกฤษ

6. การเขียนเอกสารอ้างอิง ให้ใช้ตามระบบ Vancouver ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

1. ถ้ามาจากเอกสารภาษาอังกฤษ ให้ใช้ชื่อผู้นิพนธ์เป็นภาษาอังกฤษ 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 ผู้นิพนธ์ตั้งแต่ 1 คนถึง 6 คน ใส่ชื่อผู้แต่งทุกคน ถ้ามีผู้นิพนธ์มากกว่า 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 ผู้นิพนธ์เป็นคณะหรือกลุ่มบุคคล

- 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 ไม่มีชื่อผู้นิพนธ์ 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 ผู้นิพนธ์คนเดียว

- 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 ประธานเป็นผู้แต่ง

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

6.2.4 บทในหนังสือ

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

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

6.2.5 สิ่งตีพิมพ์ขององค์กรต่างๆ

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

6.2.6 หนังสือรายเดือนและรายปักษ์

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

6.2.7 หนังสือพิมพ์รายวัน

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

6.3 ตัวอย่างการอ้างอิงเอกสารอิเล็กทรอนิกส์

6.3.1 CD-ROM

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

6.3.2 บทความวารสารทางอินเทอร์เน็ต (Journal article on the Internet)

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

6.3.3 หนังสือทางอินเทอร์เน็ต (Monograph on the Internet)

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

6.3.4 โสมเพจ/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
- อ้างอิงทำบทความตามคำแนะนำผู้แต่ง (Suggestion for Authors: www.jmt-amtt.com)

หน้าแรก (title page) เขียนเป็นภาษาไทย และ อังกฤษ

- | | | |
|--|----------------------------------|-------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> ชื่อเรื่อง | <input type="checkbox"/> ภาษาไทย | <input type="checkbox"/> ภาษาอังกฤษ |
| <input type="checkbox"/> ชื่อ-สกุล ของผู้แต่งและคณะ | <input type="checkbox"/> ภาษาไทย | <input type="checkbox"/> ภาษาอังกฤษ |
| <input type="checkbox"/> สถานที่ทำงานของผู้แต่งและคณะ | <input type="checkbox"/> ภาษาไทย | <input type="checkbox"/> ภาษาอังกฤษ |
| <input type="checkbox"/> E-mail address: ของผู้แต่งและคณะ | | |
| <input type="checkbox"/> หมายเลขโทรศัพท์ผู้รับผิดชอบบทความ | | |

ประเภทบทความ

- | | | |
|---|---|--|
| <input type="checkbox"/> บทบรรณาธิการ | <input type="checkbox"/> บทความปริทัศน์ | <input type="checkbox"/> นิพนธ์ต้นฉบับ |
| <input type="checkbox"/> บทความพิเศษ | <input type="checkbox"/> รายงานการประชุมวิชาการ | <input type="checkbox"/> รายงานกรณีศึกษา |
| <input type="checkbox"/> บทความวิจัยอย่างสั้น | <input type="checkbox"/> จดหมายถึงบรรณาธิการ | <input type="checkbox"/> ย่อวารสาร |

นิพนธ์ต้นฉบับและบทความวิจัยอย่างสั้น ให้ลำดับเนื้อหาดังต่อไปนี้

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

บทความปริทัศน์

อนุโลมตามผู้แต่ง แต่ให้มีขอบข่ายรูปแบบการเขียน ประกอบด้วย บทคัดย่อ บทนำ เนื้อเรื่อง สรุป

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> บทคัดย่อ ไม่เกิน 300 คำ | <input type="checkbox"/> คำสำคัญ (เรียงตามอักษร) จำกัด 3-5 คำ |
| <input type="checkbox"/> Abstract ไม่เกิน 300 คำ | <input type="checkbox"/> Keywords (เรียงตามอักษร) จำกัด 3-5 คำ |

ลงชื่อ ผู้รับผิดชอบบทความ

(.....)

QuantStudio family of real-time and digital PCR systems

Even more qPCR for who you are

Flexibility. Versatility. Connectivity. Speed. Precision.
Find the qPCR platform that's right for your research.



applied biosystems
by Thermo Fisher Scientific

Powerfully Simple Digital PCR

QuantStudio Absolute Q Digital PCR System



 Gibthai Fan

 @Gibthai

 Gibthaicompany



SCAN ME
Find us more:
www.gibthai.com

Modernize Diagnostics Solution



AEC Healthcare
A 3N HOLDING COMPANY

+ Infectious Diseases



TaqPath™ Respiratory Viral Select Panel
TaqPath™ Enteric Bacterial Select Panel
Taqman™ Arbovirus Triplex Kit

+ Newborn Screening



From DBS to Result
a complete solution base on
Real time PCR Technique

Taqman™ SCID/SMA assay
SMN1, TREC
Taqman™ SCID/SMA Plus assay
SMN1, TREC and KREC



new



Capillary Electrophoresis (CE) Systems

SeqStudio™ Flex Genetic Analyzer
Flexibility, usability, connectivity, and serviceability
In a mid-throughput genetic analyzer



TaqMan™ Array Card
• RTI Solution
• UTI Solution
• Antibiotics Resistance (ABR Solution)

Family of QuantStudio™
Real time PCR Systems



Real-time PCR System

applied biosystems
by Thermo Fisher Scientific

Applied Biosystems™
HIV-1 Genotyping Kit
with Integrase
Group M Subtype Coverage
A, B, C, D, F, G, CRF01_AE,
RF02_AG, CRF_06_cpx



Reproductive Healthcare:
Carrier Screening
by CE Technique

ASSAY
Applied Biosystems™ CarrierMax™
FMR1 and SMN1/SMN2 kits
Enable CE-based Fragile X and SMA carrier
screening in reproductive healthcare

 AEC Healthcare

 @aechealthcare

 info@aechealthcare.com



SCAN ME
Find us more:
www.aechealthcare.com

Clinical Immunology Products

Immunology Analyzer

maccura



I1000

mindray



CL-9001

Clinical Hematology Products

CBC Analyzer

sysmex



XN - 1500

Coagulation Analyzer

maccura



H-2600 Coagulation Analyzer

Clinical Chemistry Products

Chemistry Analyzer

FURUNO

CA-800 Automate chemistry Analyzer with rack load



mindray

BS-430



Infectious and Genetic diseases

Genematrix



SIEMENS Healthineers

Fast Track
DIAGNOSTICS



Vitassay



UNI-MEDICA



Allergy Testing

ProteomeTech Inc.

PROTIA Food IgG a
[Food Intolerance]



PROTIA Allergy-Q
96M Panel

Molecular Point of Care Testing (Molecular POCT)

COYOTE

Coyote Sample-to-result
Molecular POCT for
infectious diseases



OPTION 2

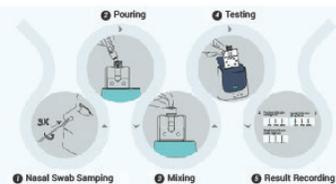


200 copies/mL
(SARS-CoV-2)



pluslife

Nucleic Acid testing analyzer:
FAST, ACCURATE and
EASY in 35 mins



AEC Healthcare Co., Ltd. (Head Office)

44/6 ถนนสุทธิสารวินิจฉัย แขวงสามเสนนอก เขตห้วยขวาง กรุงเทพฯ 10310
44/6 Sutthisarnvinitchai Rd., Samsaennok, Huay Kwang, Bangkok 10310, Thailand
Tel : (66) 0 2274 8867-9 | Fax : (66) 0 2274 8870

info@aechealthcare.com
@aechealthcare
AEC Healthcare



SCAN ME

Find us more :
www.aechealthcare.com