



Journal of the Medical Technologist Association of Thailand

วารสารเทคนิคการแพทย์

Vol. 52 No. 1 April 2024

ปีที่ 52 ฉบับที่ 1 เมษายน 2567

CONTENT

Original Articles

- Performance Evaluation of Neuron-Specific Enolase Detection by Chemiluminescent Microparticle Immunoassay Using Alinity i Systems and Electrochemiluminescence Immunoassay Using Cobas e801 Analyzer 8807
*Chavachol Setthaudom
Soonthorn Buahom
Supornchai Onpun
Siraporn Pitak and
Arisara Samutpong*
- Effect of Magnesium Sulfate and Sodium Citrate Anticoagulants on EDTA-Dependent Pseudothrombocytopenia 8820
Chureeporn Thongbai
- Antioxidant and Antiglycation Activities of Pigmented Thai Rice Husk Extracts 8845
*Sasichay Rakchim and
Kanyanath Piumngam*
- Study of Genetic Diversity and Genetic Relationship of Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Subunit 1 (*cox1*) Gene of *Plasmodium knowlesi* in Thailand 8859
*Tuvaporn Suvanla and
Dujdow Songthamwat*
- Identification of SARS-CoV-2 variants using Next Generation Sequencing at Bamrasnaradura Infectious Diseases Institute 8878
*Sumonmal Uttayamakul
Kornkanok Prasertsom
Visal Moolasart
Weerawat Manosuthi and
Kitpong Sunchatawirul*
- Effects of Zinc on Peptide Profiles and Identification Score Value of Human Pathogen *Vibrio cholerae* Identified by MALDI-TOF MS 8891
*Maneemon Koben
Supitcha Pannengpetch
Piyada Na Nakorn and
Patcharee Isarankura-Na-Ayudhya*
- Comparison of Modified Fite-Faraco Staining, Auramine O Staining and Real-Time Polymerase Chain Reaction with Standard Staining Methods for Detection of *Mycobacterium leprae* in Slit-Skin Samples 8916
*Patisaya Tassanatailak
Thaval Rerksngarm and
Wimolpak Sriwai*

Short Communication

- Error Rate of Pre-Analytical Process at Laboratory in Thailand Medical School 8933
*Noppadol Arechep
Preechaya Wongkrajang
Jirayu Sutasanasuang and
Sathima Laiwejpithaya*

**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
BIOSAFETY 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

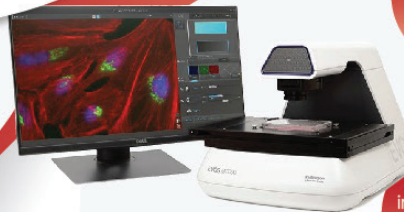
High performance automation and robotic solutions



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



3N HOLDING HOUSE, 44/6 Suthisarnvinitchai Rd.,
Samsennok, Huay Kwang, Bangkok 10310

Tel : (66) 0 2274 8331 | E-mail : info@gibthai.com
Fax : (66) 0 2274 8336, (66) 0 2274 8580



Gibthai Fan



@Gibthai



Gibthaicompany



www.gibthai.com

SCAN ME
GET MORE!





วารสาร เทคนิคการแพทย์

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย
ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

ปีที่ 52 ฉบับที่ 1 เมษายน 2567

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 บทความนิพนธ์ต้นฉบับ (Original article) จำนวน 7 เรื่อง และ บทความวิจัยอย่างสั้น จำนวน 1 เรื่อง โดยเนื้อหาของบทความ จัดตามกลุ่มวิชา ดังนี้ 1) บทความทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก จำนวน 1 เรื่อง 2) บทความทางด้านจุลชีววิทยาคลินิก จำนวน 2 เรื่อง 3) บทความทางด้านปรสิตวิทยาทางการแพทย์ จำนวน 1 เรื่อง 4) บทความทางด้านชีวเคมี จำนวน 2 เรื่อง 5) บทความทางด้านการจัดการคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ จำนวน 1 เรื่อง และ 6) บทความทางด้านโลหิตวิทยา จำนวน 1 เรื่อง

สมชาย วิริยะยุทธกร
บรรณาธิการวารสารเทคนิคการแพทย์



วารสาร เทคนิคการแพทย์

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย
ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

ปีที่ 52 ฉบับที่ 1 เมษายน 2567

สารบัญ

นิพนธ์ต้นฉบับ

- การประเมินประสิทธิภาพของการทดสอบ 8807
Neuron-Specific Enolase โดยวิธี
Chemiluminescent Microparticle
Immunoassay ด้วยเครื่อง Alinity i
และวิธี Electrochemiluminescence
Immunoassay ด้วยเครื่อง Cobas e801
ชวชล เศรษฐอุดม
สุนทร บัวหอม
สุพรชัย อ่อนผัน
ศิริภรณ์ พิทักษ์ และ
อริสรา สมุทรพ่อง
- ผลของสารกันเลือดแข็งแมกนีเซียมซัลเฟตและ 8820
โซเดียมซิเตรตต่อภาวะเกล็ดเลือดต่ำปลอม
จากสารกันเลือดแข็งชนิดอีทีเอ
สุรวิพร ทองใบ
- ฤทธิ์การยับยั้งอนุโมลิอิสระและการต้าน 8845
ไกลโคเจนของสารสกัดจากกล้วยไทยที่มี
รงควัตถุ
ศศิฉาย รักฉิม และ
กัญญาณัฐ เปี่ยมงาม
- การศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ 8859
ทางพันธุกรรมของยีน Mitochondrial
Cytochrome c Oxidase Subunit 1 (cox1)
ของเชื้อ *Plasmodium knowlesi* ในประเทศไทย
ธวัชพร สุวรรณลา และ
ดุจดาว ทรงธรรมวัฒน์
- การจำแนกหัตถ์พันธุกรรมของเชื้อ SARS-CoV-2 8878
ด้วยเทคนิค Next Generation Sequencing
ที่สถาบันบำราศนราดูร
สุนนมาลย์ อุทัยมกุล
กรกนก ประเสริฐสม
วิศัลย์ มูลศาสตร์
วีรวัฒน์ มโนสุทธิ และ
กิตติพงศ์ สัตยชาติวิรุฬห์
- ผลกระทบของสัณฐานต่อรูปแบบเปปไทด์และ 8891
ค่าคะแนนในการระบุเชื้อเชื้อก่อโรค *Vibrio*
cholerae ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS
มณีนมณช์ โคเบนทร์
สุพิชฌาย์ ปั้นแห่งเพ็ชร
ปิยดา ณ นคร และ
พัชรวิ อิศรางกูร ณ อยุธยา
- การเปรียบเทียบวิธีการย้อมสี Modified 8916
Fite-Faraco การย้อมสี Auramine O และ
วิธี Real-Time PCR กับการย้อมสีด้วยวิธี
มาตรฐาน ในการตรวจหาเชื้อ *Mycobacterium*
leprae ในตัวอย่างที่เก็บจากการกรีดผิวหนัง
พรศิษา ทักสินไตรลักษ์ณธ์
ถวัลย์ ฤกษ์งาม และ
วิมลพัคตร์ ศรีไวย

บทความวิจัยอย่างสั้น

- อัตราความผิดพลาดในขั้นตอนก่อนการ 8933
ตรวจวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการ
ในโรงเรียนแพทย์ไทย
นพดล อาชีวะ
ปรีชญา วงษ์กระจำง
จิรายุ สุทัศนทรง และ
สาธิตา ไหลเวชพิทยา



วารสาร เทคนิคการแพทย์

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย
ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

Vol. 52 No. 1 April 2024

CONTENTS

Original Articles

- Performance Evaluation of Neuron-Specific Enolase Detection by Chemiluminescent Microparticle Immunoassay Using Alinity i Systems and Electrochemiluminescence Immunoassay Using Cobas e801 Analyzer 8807
Chavachol Setthaudom
Soonthorn Buahom
Supornchai Onpun
Siraporn Pitak and
Arisara Samutpong
- Effect of Magnesium Sulfate and Sodium Citrate Anticoagulants on EDTA-Dependent Pseudothrombocytopenia 8820
Chureeporn Thongbai
- Antioxidant and Antiglycation Activities of Pigmented Thai Rice Husk Extracts 8845
Sasichay Rakchim and
Kanyanath Piumngam
- Study of Genetic Diversity and Genetic Relationship of Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Subunit 1 (*cox1*) Gene of *Plasmodium knowlesi* in Thailand 8859
Tuvaporn Suvanla and
Dujdow Songthamwat
- Identification of SARS-CoV-2 variants using Next Generation Sequencing at Bamrasnaradura Infectious Diseases Institute 8878
Sumonmal Uttayamakul
Kornkanok Prasertsom
Visal Moolasart,
Weerawat Manosuthi and
Kitpong Sunchatawirul
- Effects of Zinc on Peptide Profiles and Identification Score Value of Human Pathogen *Vibrio cholerae* Identified by MALDI-TOF MS 8891
Maneemon Koben
Supitcha Pannengpetch
Piyada Na Nakorn and
Patcharee Isarankura-Na-Ayudhya
- Comparison of Modified Fite-Faraco Staining, Auramine O Staining and Real-Time Polymerase Chain Reaction with Standard Staining Methods for Detection of *Mycobacterium leprae* in Slit-Skin Samples 8916
Patisaya Tassanatailak
Thaval Rerksngarm and
Wimolpak Sriwai

Short Communication

- Error Rate of Pre-Analytical Process at Laboratory in Thailand Medical School 8933
Noppadol Arechep
Preechaya Wongkrajang
Jirayu Sutasanasuang and
Sathima Laiwejpithaya



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
พระวรราชทินนิตมาตุ

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

อดีตนายก

ศ. ดร.พรทิพย์	โล่ห์เลขา	รศ. กุลนารี	สิริสาดี
รศ. ดร.ปราณี	ลิ้นจี่ชัย	น.ส. ทศนีย์	สกุลดำรงคัพานิช
รศ. ดร.กำพล	รุจิวิชัย		

บรรณาธิการ

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

รองบรรณาธิการ

รศ. ดร.ไพโรจน์	ศิริพฤกษ์พงษ์	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ผศ. ดร.นริศ	เก่งตรง บดีรัฐ	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ผศ. ดร.อรุณี	อิงคกุล	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
อ. ดร.สว่าง	เพชรวิเศษ	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ผศ. ดร.เอนก	ภูทอง	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

คณะบรรณาธิการ

ศ. ดร.ศรีสิน คุสมิทธิ	มหาวิทยาลัยมหิดล
ศ. ดร.วัชร กสิณฤกษ์	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ศ. ดร.เพทาย เ็นจิตโสมนัส	มหาวิทยาลัยมหิดล
ศ. ดร.สมพนธ์ วรรณวิมลรักษ์	มหาวิทยาลัยมหิดล
ศ. ดร.นัฏรณิณ อิศรางกูร ณ อยุธยา	มหาวิทยาลัยมหิดล

คณะบรรณาธิการ

ศ. พลตรีหญิง ดร.อ้อยทิพย์ ณ ถลาง	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศ. ดร.วันชัย มาลีวงษ์	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ศ. ดร.สาคร พรประเสริฐ	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ศ. ดร.สุพรรณ ฟุ่เจริญ	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ศ. ดร.ภาวพันธ์ ภัทรโกศล	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ศ. ดร.สุดา ดุษิโรจนกุล	มหาวิทยาลัยมหิดล
Assoc. Prof. Chuan-Liang Kao	National Taiwan University
รศ. พรรณี พิเดช	มหาวิทยาลัยมหิดล
รศ. พญ.จิราพร สิทธิถาวร	มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
รศ. ดร.จินตนา จิรถาวร	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รศ. อิสยา จันทรวีทยานุชิต	มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
รศ. ดร.กาญจนา สุริยะพรหม	มหาวิทยาลัยรังสิต
รศ. ดร.เกรียงไกร กิจเจริญ	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รศ. ดร.ศิริพร ปรงวิทยา	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รศ. ดร.ปาลนี อัมรานนท์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ผศ. พิษณุ 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 คงจำ	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ผศ. ดร.ไผ่มุกด์ ช่างศรี	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
อ. ทศนีย์ สกุดคำรงพานิช	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 Santiyanont
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	Mahasarakham 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. Kanyanath Piumngam	Thammasat University
Asst. Prof. Dr. Dujdaw Songthamwat	Thammasat University
Asst. Prof. Dr. Sudawadee Kongkhum	Thammasat University
Asst. Prof. Dr. Khaimuk Changsri	Thammasat University
Lecturer Tasanee Sakuldamrongpanich	Chulalongkorn University
Dr. Piriaporn 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 จันทโร	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	Dhaiyapruk 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 ฐรวงศ์จิรกุล	Assoc. Prof. Dr. Panan Ratthawongjirakul	Scientific chairman
ประชาสัมพันธ์	อ.ดร.ทพ.ธนสาร ศิริรัตน์	Dr. Thanasan Sirirat	Public relations
เหรียญฉีก	ทพญ.ภัทราภรณ์ บุญจันทร์	Pataporn Boonkant	Treasurer
เลขาธิการฯ	ทพ.ไพบูลย์ รัตนชัยพรพันธ์	Paipoon Rattanchaipornpun	Secretary general
กรรมการกลาง	ทพ.ชวลล เศรษฐอุดม	Dhavachol Setthaudom	Committee
กรรมการกลาง	ทพญ.ธัญธำรีศ 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	10,000	บาท/ฉบับ	รวม	30,000	บาท/ปี
○ ปกหน้าด้านในสี	อัตรา	10,000	บาท/ฉบับ	รวม	30,000	บาท/ปี
○ ปกหลังด้านในสี	อัตรา	10,000	บาท/ฉบับ	รวม	30,000	บาท/ปี
○ เติมน้ำด้านในสี	อัตรา	10,000	บาท/ฉบับ	รวม	30,000	บาท/ปี

ตั้งแต่ฉบับที่ ปี

รวมทั้งสิ้นเป็นเงิน บาท ตัวอักษร (.....)

e-book : www.amtt.org, tci-thaijo.org

(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

การประเมินประสิทธิภาพของการทดสอบ Neuron-Specific Enolase โดยวิธี Chemiluminescent Microparticle Immunoassay ด้วยเครื่อง Alinity i และวิธี Electrochemiluminescence Immunoassay ด้วยเครื่อง Cobas e801

ชวชด เศรษฐอุดม สุนทร บัวหอม สุพรชัย อ่อนผัน ศิราภรณ์ พิทักษ์
และ อริสรา สมุทรพ่อง*

ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร

บทคัดย่อ

Neuron-specific enolase (NSE) เป็นสารบ่งชี้มะเร็งที่มีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัย ติดตามการรักษา และพยากรณ์โรคมะเร็งปอดชนิดเซลล์ขนาดเล็ก การตรวจวัด NSE ในอดีตมีข้อจำกัด เนื่องจากมีวิธีให้เลือกใช้ทดสอบน้อย และวิธีการทดสอบมีความซับซ้อน ปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการทดสอบที่หลากหลายและใช้งานง่ายขึ้น เช่น การตรวจวิเคราะห์ NSE ด้วยวิธี chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) โดยใช้เครื่อง Alinity i ของ Abbott การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นไปที่การเปรียบเทียบการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ NSE ระหว่างการทดสอบ NSE ของ Abbott ที่ใช้ระบบ Alinity i และการทดสอบ NSE ของ Roche Elecsys โดยใช้ Cobas e801 ผลการทดสอบพบว่าความแม่นยำแบบ within-run (%CV) ของ Cobas e801 อยู่ระหว่างร้อยละ 0.9 ถึง 1.0 ในขณะที่ Alinity i อยู่ระหว่างร้อยละ 1.71 ถึง 2.76 และความแม่นยำแบบ within-laboratory ของ Cobas e801 อยู่ระหว่างร้อยละ 2.03 ถึง 2.11 ในขณะที่ Alinity i อยู่ที่ร้อยละ 1.89 ถึง 2.86 ถึงแม้ว่าผลการศึกษานี้จะแสดงให้เห็นว่า Cobas e801 มีความแม่นยำมากกว่า Alinity i เล็กน้อย แต่การวิเคราะห์โดยใช้ Passing and Bablok regression แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ที่ดีระหว่าง Alinity i และ Cobas e801 ด้วยผลความชันเท่ากับ 0.96 และจุดตัดเท่ากับ -2.02 นอกจากนี้การศึกษาค่าผลรวมความสอดคล้องของทั้งสองเครื่อง พบว่าค่าทำนายผลบวกเท่ากับร้อยละ 98.65 และค่าทำนายผลลบเท่ากับร้อยละ 90.91 ดังนั้น จากผลการศึกษาทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่าค่าการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ NSE ด้วยเครื่องทั้งสองนี้สอดคล้องกัน และสามารถใช้ทดแทนกันได้

คำสำคัญ: Chemiluminescent microparticle immunoassay, Electrochemiluminescence immunoassay, Immunoassay, Neuron-specific enolase

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: kaew5406093@gmail.com

Performance Evaluation of Neuron-Specific Enolase Detection by Chemiluminescent Microparticle Immunoassay Using Alinity i Systems and Electrochemiluminescence Immunoassay Using Cobas e801 Analyzer

Chavachol Setthaudom, Soonthorn Buahom, Supornchai Onpun, Siraporn Pitak
and Arisara Samutpong*

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

Abstract

Neuron-specific enolase (NSE) is a tumor marker that has been used to support the diagnosis, monitoring and prognosis of small cell lung cancer. In the past, NSE determination was narrowly assessed due to the complicated assay platform and lesser availability. Currently, chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) for detection of NSE has been adopted by Abbott, Alinity i platform. This study focused on comparing NSE quantitative assay between Abbott Alinity i systems and Roche Elecsys NSE assay using Cobas e801. The results showed that within-run precision (%CV) of Cobas e801 ranged from 0.9 to 1.0, whereas Alinity i ranged from 1.71 to 2.76. The within-laboratory precision (%CV) of Cobas e801 was from 2.03 to 2.11%, whereas Alinity i was from 1.89 to 2.86%. Although the imprecision demonstrated that Cobas e801 had a little better performance than Alinity i, Passing and Bablok regression revealed the slope at 0.96 and intercept at -2.02, indicating a good correlation between Alinity i and Cobas e801. The percentage of agreement between these analyzers was 98.65% positive agreement and 90.91% negative agreement. These results, therefore, verified acceptable performance of these two assays and could be interchangeable for NSE measurement.

Keywords: Chemiluminescent microparticle immunoassay, Electrochemiluminescence immunoassay, Immunoassay, Neuron-specific enolase

*Corresponding author E-mail address: kaew5406093@gmail.com

Received: 14 June 2023

Revised: 3 August 2023

Accepted: 15 August 2023

Introduction

Neuron-specific enolase (NSE) is a dimeric glycolytic enzyme consisting of $\gamma\gamma$ and $\alpha\gamma$ isoenzymes. The $\gamma\gamma$ isoenzyme is expressed in the cytoplasm of neuronal cells while $\alpha\gamma$ isoenzyme is expressed in the cytoplasm of neuroendocrine cells such as microglia, astrocytes, and oligodendrocytes.⁽¹⁾ NSE is also found in non-neuronal and non-neuroendocrine cells or tissues (e.g., erythrocytes, platelets, uterus, and prostate).⁽²⁻⁴⁾ NSE plays a role in neuronal survival, neuronal differentiation, neuroprotection, and neuroinflammation.⁽¹⁾ The early studies reported that NSE was associated with cancer progression by promoting cell survival, proliferation, and migration.⁽²⁾ Generally, healthy people have low levels of serum NSE. The increase of serum NSE level could reflect the pathological condition. NSE has been considered as a tumor marker associated with various cancer types such as lung cancer, neuroendocrine tumors, neuroblastoma, melanoma, and seminoma.^(2,5)

Lung cancer is the most common cause of cancer mortality in men and women. In 2020, lung cancer accounted for 1.80 million deaths worldwide.⁽⁶⁾ Lung cancer can be classified as either small cell lung cancer (SCLC) and non-small cell lung cancer (NSCLC), with approximately 10-15% of all lung cancers being SCLC and 80-85% being NSCLC.⁽⁷⁾ The increase of NSE was commonly observed in SCLC patients but it also increased in some of NSCLC patients.⁽⁸⁾ Combination with

histologic study, diagnostic imaging, and other tumor markers, NSE helps support diagnosis, treatment monitoring, and prognosis of SCLC.

Since the NSE detection assay has initially developed using solid-phase radioimmunoassay (RIA) in the 1970s,^(2,9) Several detection assays have also been developed subsequently to improve test performance such as enzyme immunoassay (EIA)^(2,10-12), immuno-bioluminescent assay⁽¹³⁻¹⁶⁾, chemiluminescence immunoassay (CIA)⁽¹⁷⁾ and immunosensor.⁽¹⁸⁻²⁰⁾ Although many assays have been available, there is still no gold standard method for NSE measurement. Thus, the present study aimed to compare the performance of the Abbott NSE assay-based chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) using Alinity i systems and Roche Elecsys NSE-based electrochemiluminescent immunoassay (ECLIA) using Cobas e801.

Materials and Methods

Serum samples

A total of 163 samples were randomly collected from patients who had been tested for NSE assay under the workflow of routine laboratory testing at Ramathibodi Hospital, Thailand. Non exclusion criteria of clinical status, medical history, age and sex were applied. The venous blood samples were collected in clot blood tubes and serum samples were separated by centrifugation at 3,500 rpm for 10 minutes at room temperature. The hemolysis, icteric and lipemic samples were

excluded. This study obtained ethical approval from the Human Research Ethics Committee, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University (MURA2020/1872).

Assay systems

The NSE level was initially measured in duplicate by using Roche Elecsys NSE assay; Cobas e801 analyzer. Then, the NSE measurement was followed by using Abbott NSE assay; Alinity i analyzer. The general test principles and characteristics of each automated system are shown in Table 1.^(21, 22) The quantitative NSE levels were reported in ng/mL.

Alinity i

Abbott NSE assay is an automated one-step CMIA analyzer used to quantitatively measure NSE in human serum via the Alinity i System. Briefly, serum sample, anti-NSE (E21) coated paramagnetic microparticles, and anti-NSE (E17) acridinium-labeled conjugate were combined to create a reaction mixture following the incubation. The NSE present in the sample bound to the anti-NSE (E21) coated microparticles and to the anti-NSE (E17) acridinium-labeled conjugate. Following washing cycle, pre-trigger and trigger solutions were added. The resulting chemiluminescent

Table 1 Characteristic NSE assay by Alinity i and Cobas e801.

System	Alinity i	Cobas e801
Assay principle	CMIA	ECLIA
Sample type	Serum	Serum
Sample volume (μL)	25	12
Measuring range (ng/mL)	1.6-400	0.075-300
Reportable range (ng/mL)	0.4-800	0.075-600
Expected values (ng/mL)	11.1	16.3
Limit of quantification (ng/mL)	1.6	0.225
Reagent stability onboard	30 days	16 weeks
Interferences (endogenous substances)	-Hemolysis -Conjugated bilirubin > 72 mg/dL -Unconjugated bilirubin > 40 mg/dL -Total protein > 15 g/dL -Triglycerides > 3000 mg/dL	-Hemolysis -Bilirubin > 66 mg/dL -Intralipid > 2000 mg/dL -Biotin > 70 ng/mL -Rheumatoid factors > 1200 IU/mL
Assay duration	29 min	18 min

reaction was measured as a relative light unit and converted to the NSE level.

Cobas e801

Elecsys NSE assay based on ECLIA by Cobas e801 was used to determine NSE level in human serum. Principally, the sandwich complex was created by NSE in the sample, a biotinylated monoclonal NSE antibody (18E5), and a monoclonal NSE antibody (84B10) labeled with a ruthenium complex during the first incubation. In the second incubation, the streptavidin-coated microparticles bound to the solid phase via the interaction of biotin and streptavidin. The mixture of microparticles was magnetically captured onto the surface of the electrode. The unbound substances were then removed with ProCell II M before inducing chemiluminescent emission. The measured signal was calculated to give the serum NSE level.

Analytical precision evaluation

The precision performance of the Alinity i and Cobas e801 NSE assays was assessed based on Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guideline.⁽²³⁾ Assay repeatability and within-laboratory precision were evaluated using low and high-level quality control (QC) materials provided by respective manufacturers. Two levels of QC were analyzed in 5 replicates, 2 runs each day for 5 days. The QC results were used to calculate the mean and coefficient of variation (CV).

Statistical analysis

The NSE results generated by both systems were tested for data distribution by using the Komogorov-Smirnov test and built the Box-and-Whisker plot. Wilcoxon Signed-Rank test and Spearman's correlation were used for statistical difference analysis. The comparison of the NSE assays was performed according to CLSI EP9-A3 protocol⁽²⁴⁾ using Bland-Altman plot and Passing and Bablok regression analysis. The reliability between the two assays was evaluated by Cohen's kappa coefficients and estimated the agreement following the CLSI.⁽²⁵⁾ All statistical analyses were conducted using MedCalc® Statistical Software version 20.111.

Results

Precision performance

The results of within-run and within-laboratory precision are shown in Table 2. The imprecision of Cobas e801 was demonstrated as %CV in within-run precision ranged from 0.9 to 1.0 and 2.03 to 2.11 in within-laboratory precision, whereas %CV of Alinity i ranged from 1.71 to 2.76 in within-run precision and 1.89 to 2.86 in within-laboratory precision. Royal College of Pathologists of Australasia (RCPA) specified the allowable total error (TEa) for NSE as $\pm 2.0 \mu\text{g/L} \leq 20 \mu\text{g/L}$; $\pm 10\%$ $> 20 \mu\text{g/L}$.⁽²⁶⁾

Method comparison

The NSE results from patient samples (n = 163) were tested for the data distribution by using Kolmogorov-Smirnov test prior to non-parametric statistics analysis. The distribution of NSE results from both Alinity i and Cobas e801 are shown in the Box-and-Whisker plot (Fig. 1). The median of NSE results from Alinity i was 11.19 ng/mL (range: 2.36-327.27 ng/mL) while the median from Cobas e801 was 14.95 ng/mL (range: 3.94-283.00 ng/mL). Wilcoxon Signed-Rank test demonstrated no significant difference between NSE levels measured by Cobas e801 and Alinity i with $p < 0.0001$. The concordance of both assays was investigated by using Spearman's correlation test. The correlation coefficient revealed a solid relationship with $r_s = 0.985$ (Table 3).

The Bland-Altman plot was also performed to display the difference between the two measurements. As shown in Fig. 2, the mean difference was -2.43 ng/mL and limits of agreement (LOA) ranged from -22.04 to 17.19 ng/mL, which covered the majority of values around 95.7%.⁽²⁷⁾ In addition, Passing and Bablok regression revealed the slope (95% CI) = 0.96 (0.92-0.99) and intercept (95% CI) = -2.02 (-2.42-(-1.55)) which indicated the good correlation between Alinity i and Cobas e801 (Fig. 3).

Finally, the percentage of agreement was calculated from the results based on the manufacturer's cutoff (Alinity i = 11.1 ng/mL and Cobas e801 = 16.3 ng/mL) in Table 4. The 94.44% overall percentage of agreement between 2 analyzers was further investigated to be 98.65% of positive agreement and 90.91% of negative agreement.

Table 2 The within-run and within-laboratory precision of Alinity i and Cobas e801 using manufacturer's QC materials.

	Control	Mean (ng/mL)	Within-run precision (%CV)	Within-laboratory precision (%CV)
Alinity i	Low	10.07	1.71%	1.89%
	High	205.14	2.76%	2.86%
Cobas e801	PC TM1	14.18	0.9%	2.03%
	PC TM2	95.50	1.0%	2.11%

Table 3 The statistical analysis result of method comparison between Alinity i and Cobas e801.

Sample size, n	163
Wilcoxon Signed-Rank test	p value < 0.0001
Spearman's correlation coefficient	p value < 0.0001, $r_s = 0.985$
Bland-Altman plot	
Mean difference	-2.43 ng/mL
Limits of agreement (LOA)	-22.04 to 17.19 ng/mL
Passing and Bablok regression	
Intercept (95% CI)	-2.02 (-2.42-(-1.55))
Slope (95% CI)	0.96 (0.92-0.99)

Table 4 The 2x2 contingency table for NSE results of Alinity i and Cobas e801.

		Cobas e801		
		Positive	Negative	Total
Alinity i	Positive	74	8	82
	Negative	1	80	81
	Total	75	88	163

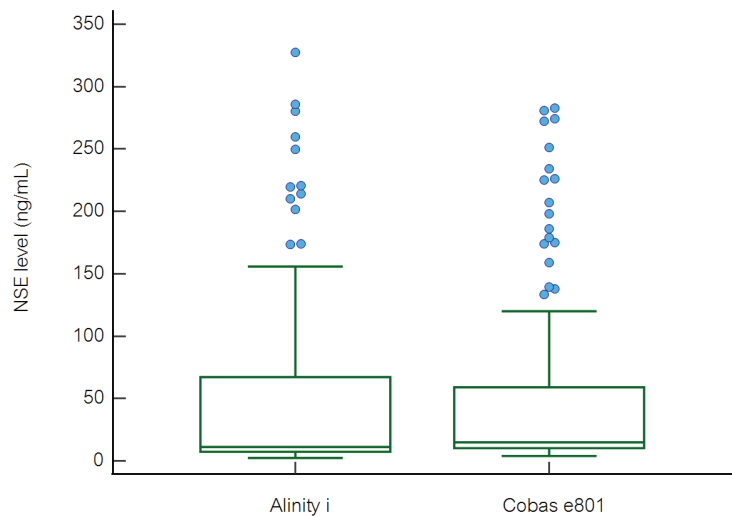


Fig. 1 Box-and-Whisker plot of NSE levels measured by Alinity i and Cobas e801. Each serum sample was measured NSE level using both analyzers and the data of each analyzer was plotted and presented as median, 1st quartile, 3rd quartile, upper adjacent value and lower adjacent value (n = 163).

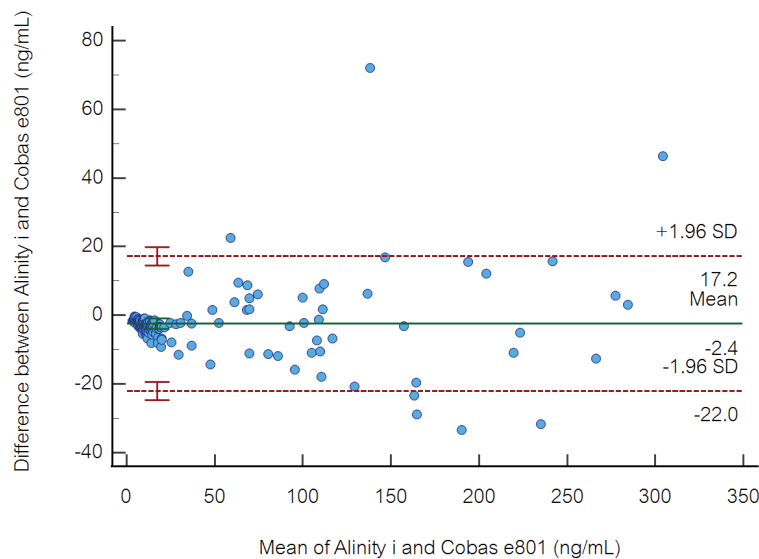


Fig. 2 Bland-Altman chart of NSE levels analyzed by Cobas e801 and Alinity i. The difference between Cobas e801 and Alinity i is presented on the y-axis and the mean of Cobas e801 and Alinity i is shown on the x-axis. The green solid line indicates the mean difference and the red dashed lines indicate the upper and lower limits of agreement (LOA).

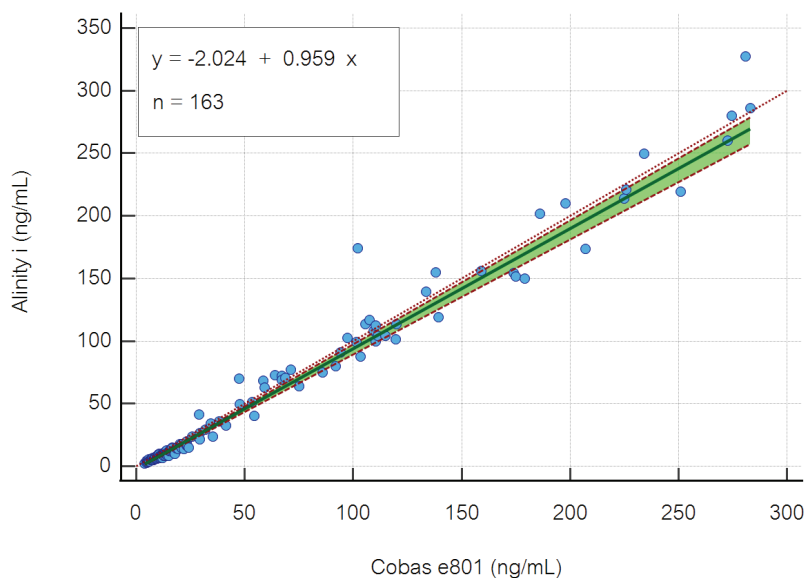


Fig. 3 Passing and Bablok regression for NSE measurement using Cobas e801 and Alinity i. The scatter plot shows the NSE levels detected by Alinity i on the y-axis and Cobas e801 on the x-axis. The green solid line is the regression line, the red dashed lines present the confidence interval for the regression, and the dotted line indicates the identity line.

Discussion

NSE was first described by Moore and McGregor in 1965.^(2, 5, 28) It becomes an important tumor marker that supports the clinical management of patients with lung cancer, especially SCLC. The automatic analyzers for NSE quantification have been developed and implemented for clinical use comprehensively. In this study, Abbott NSE assay-based CMIA using Alinity i systems and Roche Elecsys NSE-based ECLIA using Cobas e801 analyzer were selectively compared for NSE test performance. The precision performance of each assay was evaluated by its own manufacturer's QC materials. Both

assays demonstrated excellent precision with less than 3%CV at each QC level in within-run and within-laboratory (Table 2). Those %CVs were in the acceptable range of its manufacturer's criteria; Alinity i = $\leq 10\%CV$, Cobas e801 = $\leq 6.5\%CV$.⁽²⁹⁾ Although Cobas e801 demonstrated a lower %CV than Alinity i at 2 levels of QC material in the within-run, the imprecision in the within-laboratory were similar to each other.

The comparison of the NSE assay between Alinity i and Cobas e801 analyzer was further assessed. The NSE levels of 163 samples were measured by both assays and their correlation was analyzed. The statistical

analysis in this study indicated the same direction that indicated the good correlation of Alinity i and Cobas e801 ($p < 0.0001$, $r_s = 0.985$). As shown in the Bland-Altman plot and Passing and Bablok regression, NSE at a low level (approximately < 40 ng/mL) gave stronger correlation between both assays with slightly different values.

NSE can be related to a variety of pathological conditions. Until now, the universal cutoff of the NSE level is still in progress. Previous studies have reported the cutoff of NSE. However, the cutoff level varied depending on the detection assays, diseases, sample group selection, and other different conditions in each laboratory.^(5, 30-34) Therefore, the present study separately applied the NSE cutoff according to each manufacturer's recommendation (Alinity i = 11.1 ng/mL and Cobas e801 = 16.3 ng/mL).^(21, 22) The percentage of agreement between Alinity i and Cobas e801 was rather high (94.44%), especially the percentage of positive agreement (98.65%), while the percentage of negative agreement was 90.91%. Based on each manufacturer's cutoff, there were 9 discordant results between the 2 assays; however, patient clinical status access was not allowed to clear-cut the discordant results in this study which was our limitation. Although the 5 discordant results showed a little higher NSE level than the cutoff measured by Alinity i but lower than the cutoff when measured by Cobas e801, their

NSE levels were in the range of 95% CI of cutoff from manufacturer's recommendation (Alinity i = 9.0-12.4 ng/mL and Cobas e801 = 15.7-17.0 ng/mL).^(21, 22) These borderline results might affect the calculation of the negative percentage of agreement. The discordant result might be caused by the different anti-NSE monoclonal antibodies in each assay. Alinity i used anti-NSE E17 and E21 but Cobas e801 used anti-NSE 18E5 and 84B10.^(21, 22) Even though NSE antibodies of both assays are recognized at the same target as the γ subunit of enolase, the binding affinity and epitope recognition are different.⁽³⁵⁾ Moreover, the presence of interference in samples, such as a human anti-mouse antibody (HAMA) and some cancer drugs, can also affect NSE levels.^(21, 22, 36, 37)

Conclusion

This study demonstrated that NSE measurements by using Abbott Alinity i and Roche Elecsys Cobas e801 were highly précised and correlated well with each other. These analyzers could then be used interchangeably for detection of serum NSE. These findings also indicated an alternative option for NSE assay setup in other laboratories. The different characteristics of each assay, such as measuring range, limit of quantification, sample volume, and reagent stability, should also be considered for assay selection.

Acknowledgments

We acknowledge Assoc. Prof. Mongkol Kunakorn, Mr. Anuchat Uamkhayn and Miss Rakruthai Thongchai for encouragement, guidance and advice. We also would like to thank the Department of Pathology, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University for the support and providing equipment and Abbott Laboratories Ltd. for supporting the NSE reagents.

References

1. Haque A, Polcyn R, Matzelle D, *et al.* New insights into the role of neuron-specific enolase in neuro-inflammation, neurodegeneration, and neuroprotection. *Brain Sci* 2018; 8: 33.
2. Xu CM, Luo YL, Li S, *et al.* Multifunctional neuron-specific enolase: its role in lung diseases. *Biosci Rep* 2019; 39.
3. Haimoto H, Takahashi Y, Koshikawa T, *et al.* Immunohistochemical localization of gamma-enolase in normal human tissues other than nervous and neuroendocrine tissues. *Lab Invest* 1985; 52: 257-63.
4. Soh MA, Garrett SH, Somji S, *et al.* Arsenic, cadmium and neuron specific enolase (ENO2, gamma-enolase) expression in breast cancer. *Cancer Cell Int* 2011; 11: 41.
5. Isgro MA, Bottoni P, Scatena R. Neuron-specific enolase as a biomarker: biochemical and clinical aspects. *Adv Exp Med Biol* 2015; 867: 125-43.
6. World Health Organization. Cancer [Internet]. 2022 [cited 2023 Mar 20]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
7. American Cancer Society. Key Statistics for Lung Cancer [Internet]. 2023 [cited 2023 Mar 20]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/types/lung-cancer/about/key-statistics.html>
8. Ferrigno D, Buccheri G, Giordano C. Neuron-specific enolase is an effective tumour marker in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer* 2003; 41: 311-20.
9. Parma AM, Marangos PJ, Goodwin FK. A more sensitive radioimmunoassay for neuron-specific enolase suitable for cerebrospinal fluid determinations. *J Neurochem* 1981; 36: 1093-6.
10. Kimura S, Uchikawa H, Yamamoto R, *et al.* Practicable enzyme immunoassay for neuron-specific enolase in human serum. *J Appl Biochem* 1984; 6: 319-24.
11. Schmitt UM, Stieber P, Hasholzner U, *et al.* Methodological and clinical evaluation of two automated enzymatic immunoassays as compared with a radioimmunoassay for neuron-specific enolase. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996; 34: 679-82.

12. Muley T, Ebert W, Stieber P, *et al.* Technical performance and diagnostic utility of the new Elecsys neuron-specific enolase enzyme immunoassay. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41: 95-103.
13. Wevers RA, Jacobs AA, Hommes OR. A bioluminescent assay for enolase (EC 4.2.1.11) activity in human serum and cerebrospinal fluid. *Clin Chim Acta* 1983; 135: 159-68.
14. Gerbitz KD, Summer J, Thallemer J. Brain-specific proteins: solid-phase immunobioluminescence assay for neuron-specific enolase in human plasma. *Clin Chem* 1984; 30: 382-6.
15. Viallard JL, Murthy MR, Betail G, *et al.* Determination of serum neuron-specific enolase by differential immunocapture. *Clin Chim Acta* 1986; 161: 1-10.
16. Viallard JL, Ven Murthy MR, Dastugue B. Rapid electrophoretic determination of neuron-specific enolase isoenzymes in serum. *Clin Chem* 1986; 32: 593-7.
17. Fu X, Meng M, Zhang Y, *et al.* Chemiluminescence enzyme immunoassay using magnetic nanoparticles for detection of neuron specific enolase in human serum. *Anal Chim Acta* 2012; 722: 114-8.
18. Ho JA, Chang HC, Shih NY, *et al.* Diagnostic detection of human lung cancer-associated antigen using a gold nanoparticle-based electrochemical immunosensor. *Anal Chem* 2010; 82: 5944-50.
19. Li GZ, Tian F. Guanine-decorated graphene nanostructures for sensitive monitoring of neuron-specific enolase based on an enzyme-free electrocatalytic reaction. *Anal Sci* 2013; 29: 1195-201.
20. Wei Z, Zhang J, Zhang A, *et al.* Electrochemical detecting lung cancer-associated antigen based on graphene-gold nanocomposite. *Molecules* 2017; 22: 392.
21. Abbott Laboratories. NSE package insert. United States; 2019.
22. Roche Diagnostics. Eyecsys NSE package insert. Switzerland; 2019.
23. Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline-Third Edition CLSI guideline EP05-A3. Wayne, PA: CLSI; 2014.
24. Clinical and Laboratory Standards Institute. Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation using Patients Samples; Approved Guideline -Third Edition CLSI guideline EP9-A3. Wayne, PA: CLSI; 2013.
25. Clinical and Laboratory Standards Institute. User Protocol for Evaluation of Quantitative Test Performance; Approved Guideline -Third Edition CLSI guideline EP12-A2. Wayne, PA: CLSI; 2008.
26. Westgard QC. RCPA Allowable Limits of Performance for Biochemistry [Internet]. 2019 [cited 2023 Jul 19]. Available from: <https://www.westgard.com/rcpa-biochemistry.htm#tumour>

27. Myles PS, Cui J. Using the Bland-Altman method to measure agreement with repeated measures. *Br J Anaesth* 2007; 99: 309-11.
28. Moore BW, McGregor D. Chromatographic and Electrophoretic Fractionation of Soluble Proteins of Brain and Liver. *J Biol Chem* 1965; 240: 1647-53.
29. Abbott Laboratories. PRODUCT REQUIREMENT Alinity i NSE package insert. United States; 2019.
30. Stern P, Bartos V, Uhrova J, *et al.* Performance characteristics of seven neuron-specific enolase assays. *Tumour Biol* 2007; 28: 84-92.
31. Stammet P, Collignon O, Hassager C, *et al.* Neuron-specific enolase as a predictor of death or poor neurological outcome after out-of-hospital cardiac arrest and targeted temperature management at 33 degrees C and 36 degrees C. *J Am Coll Cardiol* 2015; 65: 2104-14.
32. Ferraro S, Braga F, Luksch R, *et al.* Measurement of serum neuron-specific enolase in neuroblastoma: is there a clinical role? *Clin Chem* 2020; 66: 667-75.
33. Lee JH, Kim YH, Lee JH, *et al.* Combination of neuron-specific enolase measurement and initial neurological examination for the prediction of neurological outcomes after cardiac arrest. *Sci Rep* 2021; 11: 15067.
34. Rundgren M, Cronberg T, Friberg H, *et al.* Serum neuron specific enolase-impact of storage and measuring method. *BMC Res Notes* 2014; 7: 726.
35. Paus E, Hirzel K, Lidqvist M, *et al.* TD-12 workshop report: characterization of monoclonal antibodies to neuron-specific enolase. *Tumour Biol* 2011; 32: 819-29.
36. Kricka LJ. Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. *Clin Chem* 1999; 45: 942-56.
37. Kricka LJ, Schmerfeld-Pruss D, Senior M, *et al.* Interference by human anti-mouse antibody in two-site immunoassays. *Clin Chem* 1990; 36: 892-4.

Effect of Magnesium Sulfate and Sodium Citrate Anticoagulants on EDTA-Dependent Pseudothrombocytopenia

Chureeporn Thongbai^{*}

*Clinical Pathology Laboratory, Panyananthaphikkhu Chonprathan Medical Center,
Srinakharinwirot University, Nonthaburi Province, Thailand*

Abstract

EDTA-dependent pseudothrombocytopenia (EDTA-PTCP) is a phenomenon that characterized by a spurious decrease of platelets in vitro due to EDTA anticoagulant induced platelet aggregation in blood samples. It may cause diagnostic failure and unnecessary treatment. Therefore, this study aimed to study effect of Magnesium sulfate, 3.2% sodium citrate and K₃EDTA anticoagulants on platelet counts (PLT) and other hematological parameters at different times by Sysmex XN-3000. Thirty patients with EDTA-PTCP were enrolled in study. Comparative analysis showed that mean platelet counts in blood samples collected in magnesium sulfate ($183.89 \pm 57.20 \times 10^3/\mu\text{L}$) were significantly higher than those collected in 3.2% sodium citrate ($114.23 \pm 43.94 \times 10^3/\mu\text{L}$) and K₃EDTA ($77.41 \pm 32.90 \times 10^3/\mu\text{L}$). All blood samples (100%) collected in magnesium sulfate had higher platelet counts than those collected in K₃EDTA whereas only 19 blood samples (63.33%) collected in 3.2% sodium citrate showed higher platelet counts than those collected in K₃EDTA. Thus, magnesium sulfate was more effective for correcting EDTA-induced pseudothrombocytopenia than sodium citrate.

Keywords: Magnesium sulfate, Pseudothrombocytopenia, Anticoagulant, Platelet count

^{*}Corresponding author E-mail address: chureepornt@g.swu.ac.th

Received: 1 January 2023

Revised: 21 March 2023

Accepted: 4 October 2023

ผลของสารกันเลือดแข็งแมกนีเซียมซัลเฟตและโซเดียมซิเตรต ต่อภาวะเกล็ดเลือดต่ำปลอมจากสารกันเลือดแข็งชนิดอีดีทีเอ

ชฎีพร ทองใบ*

ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาคลินิกและกายวิภาค ศูนย์การแพทย์ปัญญานันทภิกขุ ชลประทาน
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ จังหวัดนนทบุรี

บทคัดย่อ

ภาวะเกล็ดเลือดต่ำปลอมจากสารกันเลือดแข็งชนิดเอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซิติกแอซิด หรืออีดีทีเอ (EDTA-dependent pseudothrombocytopenia; EDTA-PTCP) เป็นภาวะเกล็ดเลือดมีการเกาะกลุ่มเนื่องจากสารกันเลือดแข็งอีดีทีเอ ทำให้จำนวนเกล็ดเลือดที่นับได้ต่ำกว่าความจริง เกิดความคลาดเคลื่อนในการรายงานจำนวนเกล็ดเลือด ซึ่งส่งผลให้การวินิจฉัยและการรักษาผิดพลาดได้ ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาประสิทธิภาพของสารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต โซเดียมซิเตรต และอีดีทีเอที่มีต่อจำนวนเกล็ดเลือดและค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ทางโลหิตวิทยา และวิเคราะห์ที่เวลาแตกต่างกันด้วยเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ Sysmex XN-3000 โดยศึกษาในผู้ที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำปลอมจากสารกันเลือดแข็งอีดีทีเอจำนวน 30 ราย ผลการศึกษาพบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดในตัวอย่างเลือดที่เก็บในสารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต (183.89 ± 57.20) $\times 10^3/\mu\text{L}$ มีค่ามากกว่าการเก็บในสารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรต (114.23 ± 43.94) $\times 10^3/\mu\text{L}$ และอีดีทีเอ (77.41 ± 32.90) $\times 10^3/\mu\text{L}$ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) ตัวอย่างเลือดที่เก็บในสารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต ทุกรายมีค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดมากกว่าอีดีทีเอคิดเป็นร้อยละ 100 ขณะที่ตัวอย่างเลือดที่เก็บในสารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรตมีค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดมากกว่าอีดีทีเอเพียง 19 ราย คิดเป็นร้อยละ 63.33 โดยสรุป สารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟตมีประสิทธิภาพในการแก้ไขการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดจากสารกันเลือดแข็งอีดีทีเอได้ดีกว่าชนิดโซเดียมซิเตรต

คำสำคัญ: แมกนีเซียมซัลเฟต เกล็ดเลือดต่ำปลอม สารกันเลือดแข็ง จำนวนเกล็ดเลือด

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: chureeporn@swu.ac.th

รับบทความ: 1 มกราคม 2566

แก้ไขบทความ: 21 มีนาคม 2566

รับตีพิมพ์บทความ: 4 ตุลาคม 2566

บทนำ

EDTA-dependent pseudothrombocytopenia (EDTA-PTCP) คือ ภาวะเกล็ดเลือดต่ำปลอมจากการเกาะกลุ่มกันเนื่องจากสารกันเลือดแข็งชนิดเอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซิติกแอซิด (ethylenediaminetetraacetic acid) หรือที่เรียกกันโดยย่อว่า อีดีทีเอ (EDTA) ทำให้จำนวนเกล็ดเลือดที่นับด้วยเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติต่ำกว่าความเป็นจริง โดยมีรายงานว่าในกลุ่มผู้ป่วยนอกพบความชุกของภาวะ EDTA-PTCP คิดเป็นร้อยละ 0.07-0.1 ผู้ป่วยในทั่วไปพบความชุกสูงขึ้นเป็นร้อยละ 2 และกลุ่มผู้ป่วยในที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำพบความชุกของภาวะ EDTA-PTCP คิดเป็นร้อยละ 1.25-15.30⁽¹⁾ ประเทศไทยมีรายงานความชุกของภาวะ EDTA-PTCP ที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ คิดเป็นร้อยละ 0.04⁽²⁾

กลไกการเกิดภาวะ EDTA-PTCP เชื่อว่าสารอีดีทีเอที่มีคุณสมบัติด้านการจับตัวของเลือดจับกับแคลเซียมไอออน (Ca^{2+} chelator) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของไกลโคโปรตีน GPIIb/IIIa ที่อยู่บนผิวของเกล็ดเลือด กลายเป็นเอพิโทป (epitope) ชนิดพิเศษ เรียกว่า cryptic epitope เป็นไกลโคโปรตีน IIb ซึ่งเป็นสาเหตุให้ออโตแอนติบอดี (autoantibody) ที่จำเพาะมาจับ กระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนต่าง ๆ เช่น แกรนูลเมมเบรนโปรตีน 140 (Granule Membrane Protein 140; GMP140) ไลโซโซมอล ไกลโคโปรตีน 55 (Lysosomal glycoprotein; Gp55) และทอมโบสปอนดิน (thrombospondin) สามารถกระตุ้นการทำงานของเกล็ดเลือดด้วยเอนไซม์ไทโรซีนไคเนส (tyrosine kinase) ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด (platelet aggregation) ในหลอดทดลอง⁽³⁻⁶⁾ จึงทำให้ตรวจนับจำนวนเกล็ดเลือดได้ต่ำกว่าความเป็นจริง ส่งผลให้การวินิจฉัยและการรักษา

ผิดพลาดได้ รวมถึงการให้เลือดและเกล็ดเลือดโดยไม่จำเป็น ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการเพื่อแยกภาวะเกล็ดเลือดต่ำปลอม (pseudothrombocytopenia) จึงมีความสำคัญ

โรคบางชนิดมีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดภาวะ EDTA-PTCP เช่น ผู้ป่วยโรคมะเร็ง โรคตับเรื้อรัง การติดเชื้อ การตั้งครรภ์ โรคแพ้ภูมิตัวเอง และโรคหลอดเลือดหัวใจ⁽⁷⁻⁸⁾ นอกจากนี้ยังมีรายงานพบในผู้ป่วยปอดติดเชื้อไวรัสโคโรนา-2019⁽⁹⁾ และผู้ป่วยที่เตรียมการผ่าตัดรักษาหอนรองกระดูกเคลื่อน⁽¹⁰⁾

วิธีแก้ไข EDTA-PTCP คือ (1) อุณหภูมิเลือดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสก่อนตรวจวิเคราะห์ (2) การเติมยาหรือสารต้านเกล็ดเลือดต่าง ๆ (3) การเปลี่ยนชนิดสารกันเลือดแข็ง ในห้องปฏิบัติการนิยมใช้สารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรตเป็นสารกันเลือดแข็งเพื่อแก้ไขภาวะ EDTA-PTCP อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของโซเดียมซิเตรตต่อจำนวนเกล็ดเลือดยังไม่เป็นที่แน่ชัด เนื่องจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าสารกันเลือดแข็งโซเดียมซิเตรตทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้เช่นเดียวกับอีดีทีเอ⁽¹¹⁻¹³⁾ สารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟตเป็นสารกันเลือดแข็งที่มีคุณสมบัติยับยั้งไฟบริโนเจน (fibrinogen) ในกระบวนการการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด⁽¹⁴⁾ รายงานการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าแมกนีเซียมซัลเฟตสามารถป้องกันการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดจากสารอีดีทีเอได้⁽¹⁵⁻¹⁶⁾ อีกทั้งการศึกษาที่กล่าวข้างต้นเป็นการศึกษาในกลุ่มประชากรต่างประเทศ และยังไม่พบรายงานการศึกษาลงผลของสารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟตต่อการป้องกันการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดในกลุ่มประชากรไทย ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาผลของสารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต โซเดียมซิเตรต และอีดีทีเอ ที่มีต่อจำนวนเกล็ดเลือดและค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ทางโลหิตวิทยา เมื่อวิเคราะห์

ที่เวลาแตกต่างกันในผู้ที่มีภาวะ EDTA-PTCP เพื่อประเมินประสิทธิภาพการป้องกันการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดจากสารอีทีทีเอ

วัตถุประสงค์และวิธีการ

1. กลุ่มตัวอย่าง

งานวิจัยนี้เป็นการวิจัยแบบกึ่งทดลอง (quasi-experimental research) ใช้รูปแบบการวิจัยแบบกลุ่มเดียววัดซ้ำ (repeated measures designs) กลุ่มตัวอย่าง คือ ผู้ป่วยนอกที่มารับบริการตรวจความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (complete blood count) และตรวจพบภาวะ EDTA-PTCP จำนวน 30 ราย คำนวณขนาดตัวอย่างในการศึกษานี้ ใช้สูตรการประมาณค่าเฉลี่ย โดยทราบจำนวนประชากร (Estimate a mean in finite population)⁽¹⁷⁾ ใช้สูตรการคำนวณดังนี้

$$n \geq \frac{N \left(Z_{1-\alpha/2} \right)^2 \sigma^2}{d^2 (N-1) + \left(Z_{1-\alpha/2} \right)^2 \sigma^2}$$

n แทน ขนาดของกลุ่มตัวอย่าง

N แทน จำนวนผู้ที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำที่มารับบริการเจาะเลือด โดยใช้หลอดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิดอีทีทีเอ ตรวจความสมบูรณ์ของเม็ดเลือดที่ศูนย์การแพทย์ปัญญานันทภิกขุ ชลประทาน ปี 2563 จำนวน 379 ราย

σ แทน ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ 40% และ d แทน ค่าความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ ผู้วิจัยประมาณค่าความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้จากส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ของงานวิจัยที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับงานวิจัยครั้งนี้⁽¹⁶⁾ โดยผู้วิจัยกำหนดระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ไม่เกินร้อยละ 5

ผลการคำนวณขนาดของกลุ่มตัวอย่างเท่ากับ 23 ราย เพื่อป้องกันความผิดพลาดในการเก็บตัวอย่าง ผู้วิจัยจึงเพิ่มขนาดตัวอย่างขึ้นร้อยละ 10 ดังนั้นขนาดของกลุ่มตัวอย่างในการศึกษานี้เท่ากับ 25 ราย อย่างไรก็ตามเพื่อป้องกันการสูญหายของตัวอย่างและความถูกต้องของข้อมูล ผู้วิจัยจึงจัดเก็บตัวอย่างให้มากที่สุด โดยจะคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างแบบเฉพาะเจาะจง (purposive sampling) ตามเกณฑ์คัดเข้า-คัดออกที่กำหนดดังต่อไปนี้

เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการ (Inclusion Criteria)

1. ผู้ที่มารับบริการเจาะเลือดโดยใช้สารอีทีทีเอเป็นสารกันเลือดแข็ง เพื่อตรวจความสมบูรณ์ของเม็ดเลือดและมีอายุมากกว่า 18 ปี ขึ้นไป
2. ผู้ที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำปลอม โดยมีจำนวนเกล็ดเลือดน้อยกว่า 140,000 ตัวต่อลบ.มม. และรายงานผลจากเครื่องตรวจเม็ดเลือดอัตโนมัติพบข้อความเตือน เช่น เกล็ดเลือดต่ำ หรือ เกล็ดเลือดเกาะกลุ่มและเมื่อตรวจดูการกระจายตัวของเกล็ดเลือดในสเมียร์เลือดที่ย้อมด้วยสไล์ไรท์-จิมซ่าด้วยกล้องจุลทรรศน์พบลักษณะเกล็ดเลือดเกาะกลุ่มและไม่พบใยไฟบริน

3. ผู้ที่เซ็นใบยินยอมเข้าร่วมการศึกษาวิจัย

เกณฑ์การคัดอาสาสมัครออกจากโครงการ (Exclusion Criteria)

1. เมื่อตรวจดูการกระจายตัวของเกล็ดเลือดในสเมียร์เลือดที่ย้อมด้วยสไล์ไรท์-จิมซ่าด้วยกล้องจุลทรรศน์พบลักษณะเกล็ดเลือดเกาะกลุ่มและมีใยไฟบริน ซึ่งการพบใยไฟบรินบ่งชี้ว่ามีเลือดแข็งตัวบางส่วน (partial clotted) เป็นตัวอย่างที่ไม่เหมาะสมในการนำมาศึกษา

2. ตัวอย่างเลือดที่ตรวจ พบลักษณะเลือดแข็งตัวบางส่วนในหลอดบรรจุเลือด

การศึกษานี้ได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ศูนย์การแพทย์ปัญญานันทภิกขุ ชลประทาน มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เมื่อวันที่ 28 ธันวาคม พ.ศ. 2563 เลขที่ EC015/63 ดำเนินการเก็บตัวอย่างตั้งแต่ปี พ.ศ. 2564-2565 จากผู้ป่วยนอกที่มารับบริการตรวจความสมบูรณ์ของเม็ดเลือดจำนวน 40,624 ราย ตรวจพบภาวะ EDTA-PTCP จำนวน 32 ราย คัดเข้าศึกษาจำนวน 30 ราย อีก 2 รายอายุน้อยกว่า 18 ปีไม่อยู่ในเกณฑ์การคัดเข้า

2. วิธีการศึกษา

การศึกษาผลของสารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต โซเดียมซิเตรต และอีดีทีเอ ที่มีต่อจำนวนเกล็ดเลือดและค่าพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยาในผู้ที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำปลอมจากสารกันเลือดแข็งอีดีทีเอ ดำเนินการทดสอบสารกันเลือดแข็งแต่ละชนิดด้วยการวัดซ้ำจำนวน 5 ครั้ง ดังนี้ วิเคราะห์ที่ 0 นาที 30 นาที 60 นาที 120 นาที และ 240 นาที ตามลำดับ โดยให้เริ่มจับเวลาทันทีที่ได้รับตัวอย่างเลือด

2.1 การเก็บตัวอย่างเลือด

เจาะเลือดจากเส้นเลือดดำ (venipuncture) ปริมาณ 10 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดเก็บตัวอย่างเลือดจำนวน 3 หลอดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิดอีดีทีเอ โซเดียมซิเตรต และแมกนีเซียมซัลเฟต ตามขั้นตอนต่อไปนี้ ใส่ตัวอย่างเลือดปริมาณ 2.7 มิลลิลิตร ในหลอดที่เคลือบด้วยสารกันเลือดแข็งชนิดไตรโซเดียมซิเตรตไดไฮเดรต (3.2% sodium citrate) 0.3 มิลลิลิตร (ผลิตภัณฑ์เบกตันดิกกินสัน สหรัฐอเมริกา) ด้วยอัตราส่วนเลือดต่อสารกันเลือดแข็งเป็น 9:1 ใส่ตัวอย่างเลือด 3 มิลลิลิตร ในหลอดที่เคลือบด้วยสารกันเลือดแข็งไตรโพแทสเซียม อีดีทีเอ (K_3EDTA) 1.8 มิลลิลิตร (ผลิตภัณฑ์เบกตันดิกกินสัน สหรัฐอเมริกา) และใส่ตัวอย่างเลือด 2.7 มิลลิลิตร

ในหลอดที่เคลือบด้วยสารกันเลือดแข็งแมกนีเซียมซัลเฟต 2.7 มิลลิลิตร (ผลิตภัณฑ์ซาร์ซดักท์ เยอรมนี) ผสมเลือดและสารกันเลือดแข็งให้เข้ากันโดยคว่ำหลอดไปมาเบาๆ ประมาณ 8-10 ครั้ง นำส่งห้องปฏิบัติการทันทีโดยไม่ต้องแช่เย็น เมื่อได้รับตัวอย่างเลือดให้ตรวจวิเคราะห์ทันที โดยเริ่มจับเวลาการตรวจวิเคราะห์ที่ 0 นาที 30 นาที 60 นาที 120 นาที และ 240 นาที ตามลำดับ กำหนดระยะเวลาตั้งแต่การเจาะเก็บเลือดจนถึงการนำส่งห้องปฏิบัติการไม่เกิน 30 นาที

2.2 การตรวจดูการกระจายตัวของเกล็ดเลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์

สเมียร์เลือดบนแผ่นสไลด์แก้ว ปล่อยให้แห้งแล้วย้อมด้วยสีไรท์-จิมซ่า โดยเทสีไรท์-จิมซ่า (Wright-Giemsa stain) ให้ท่วมแผ่นสไลด์ จับเวลา 2 นาที เมื่อครบเวลา ใส่สารละลายบัฟเฟอร์ (Wright-Giemsa Buffer) ลงบนสไลด์ จับเวลาอีก 2 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาด เช็ดด้านหลังสไลด์ให้สะอาด แล้วผึ่งให้แห้ง นำไปตรวจดูการกระจายตัวของเกล็ดเลือดและรูปร่างลักษณะของเกล็ดเลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยตรวจสเมียร์เลือดด้วยเลนส์กำลังวัตถุ (objective lens) กำลังขยาย 100X ตรวจดูอย่างน้อยจำนวน 10 oil-power fields (OPF) ในบริเวณที่มีเม็ดเลือดแดงเรียงตัวเป็นชั้นเดียวไม่ซ้อนทับกัน หรือซ้อนทับกันเพียงเล็กน้อย หรือมีเม็ดเลือดแดงประมาณ 200 เซลล์ต่อ OPF โดยผู้วิจัยตรวจคนเดียวตลอดการศึกษารั้งนี้

2.3 การประเมินจำนวนเกล็ดเลือดและค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ทางโลหิตวิทยาด้วยเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ

การศึกษารั้งนี้ใช้เครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ Sysmex รุ่น XN-3000 ประเทศญี่ปุ่น อาศัยหลักการวัดการเปลี่ยนแปลงของการต้านกระแสไฟฟ้าของเม็ดเลือด (electrical resistance) และหลักการอุทกพลศาสตร์ (hydrodynamic focusing)

ในการนับจำนวนเม็ดเลือดแดงและเกล็ดเลือด ใช้หลักการย้อมสีฟลูออเรสเซนต์และวัดความเข้มของการติดสีฟลูออเรสเซนต์ในเซลล์ ประมวลผลเป็นขนาดและจำแนกชนิดของเซลล์ในการนับจำนวนเม็ดเลือดขาวและการนับจำแนกชนิดของเม็ดเลือดขาว นอกจากนี้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติรุ่นนี้สามารถตรวจนับจำนวนเกล็ดเลือดได้ 2 รูปแบบ คือ การตรวจนับจำนวนเกล็ดเลือดด้วยหลักการการกระเจิงแสง (platelet-electrical impedance method; PLT-I) และหลักการการย้อมสีอาร์เอ็นเอ/ดีเอ็นเอของเซลล์ ด้วยสีโพลีเมทิน (polymethine dye) แล้ววิเคราะห์ความเข้มของการเรืองแสงของแต่ละเซลล์ ช่วยให้แยกเกล็ดเลือดออกจากเม็ดเลือดแดงและเรติคูลไฮสต์ได้ (platelet-fluorescence optical method; PLT-O) โดยตัวอย่างเลือดที่เก็บในสารกันเลือดแข็งชนิดอีทีทีเอ โซเดียมซิเตรต และแมกนีเซียมซัลเฟต ได้รับการตรวจนับจำนวนเกล็ดเลือดทั้ง 2 แบบ คือ PLT-I และ PLT-O การตรวจค่าพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยา ได้แก่ ค่าเฉลี่ยปริมาตรของเกล็ดเลือด (mean platelet volume; MPV) ค่าการกระจายตัวของเกล็ดเลือด (platelet distribution width; PDW) ค่าสัดส่วนของเกล็ดเลือดที่มีขนาดใหญ่ (platelet large cell ratio; P-LCR) จำนวนเม็ดเลือดแดง (red blood cell; RBC) และจำนวนเม็ดเลือดขาว (white blood cell; WBC) เมื่อห้องปฏิบัติการได้รับตัวอย่างเลือดจะเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้องตลอดเวลา (25 องศาเซลเซียส) ดำเนินการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดที่เก็บในสารกันเลือดแข็งชนิดอีทีทีเอ โซเดียมซิเตรต และแมกนีเซียมซัลเฟต ตามลำดับ โดยตรวจวิเคราะห์ทันทีที่ได้รับตัวอย่างเลือด (เวลาที่ 0 นาที) แล้วตั้งหลอดเก็บตัวอย่างเลือดไว้ที่อุณหภูมิห้องเช่นเดิมและนำมาตรวจซ้ำเมื่อเวลาครบ 30 นาที 60 นาที 120 นาที และ 240 นาที สำหรับการประเมินจำนวนเกล็ดเลือดเมื่อใช้โซเดียมซิเตรตเป็นสารกันเลือดแข็ง

จำนวนเกล็ดเลือดที่ได้จากเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติให้คุณด้วย dilution factor คือ 1.1⁽¹⁸⁾

ก่อนทำการตรวจวิเคราะห์ ผู้วิจัยทำการทดสอบคุณภาพของเครื่องตรวจวิเคราะห์ด้วยน้ำยาควบคุมคุณภาพ 3 ระดับของบริษัทผู้ผลิต เข้าร่วมและผ่านการประเมินคุณภาพการตรวจวิเคราะห์โดยองค์กรภายนอก (External Quality Assessment; EQA) ของสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เข้าร่วมโปรแกรมการควบคุมคุณภาพภายนอกระหว่างประเทศ (Randox International Quality Assessment Scheme; RIQAS) จัดโดยบริษัทแรนด็อกซ์ ประเทศอังกฤษ รวมทั้งได้รับการบำรุงรักษาและสอบเทียบจากผู้เชี่ยวชาญอย่างสม่ำเสมอ

3. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ ร้อยละ ความถี่ ค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; SD) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดแบบ PLT-I ค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดแบบ PLT-O ค่าเฉลี่ย MPV ค่าเฉลี่ย PDW ค่าเฉลี่ย P-LCR ค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดแดง และค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดขาว ที่ได้จากการทดสอบสารกันเลือดแข็งทั้ง 3 ชนิด ในช่วงเวลาต่าง ๆ โดยใช้สถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบวัดซ้ำ (one-way repeated measures ANOVA) และทดสอบความแตกต่างเป็นรายคู่โดยใช้วิธีการทดสอบของแอลเอสดี (Least Significant Difference Test; LSD Test) ก่อนการวิเคราะห์ ผู้วิจัยตรวจสอบข้อตกลงเบื้องต้นความแปรปรวนของการวัดซ้ำแต่ละครั้งว่ามีค่าเท่ากัน (Compound Symmetry) โดยใช้การทดสอบของ Mauchly's test of Sphericity ถ้า Mauchly's test นี้ ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) จะพิจารณาค่า Sphericity

assumed แต่ถ้า Mauchly's test นี้ มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จะพิจารณาค่า Greenhouse-Geisser โดยกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ ค่าขนาดอิทธิพลของปัจจัย (Effect size) ใช้ Partial Eta Squared (Partial η^2) จากโปรแกรม SPSS version 27 และค่าขนาดอิทธิพลสำหรับการเปรียบเทียบความแตกต่างรายคู่ใช้ค่า d ของโคเฮน (Cohen's d) คำนวณจากการหารด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานร่วม (pooled standard deviation)⁽¹⁹⁻²⁰⁾

ผลการวิจัย

การศึกษาผลของสารกันเลือดแข็งชนิด อีดีทีเอ โซเดียมซิเตรต และแมกนีเซียมซัลเฟต ที่มีต่อ จำนวนเกล็ดเลือดและค่าพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยา ในผู้ที่ตรวจพบภาวะเกล็ดเลือดต่ำปดอมจากสารกัน เลือดแข็งอีดีทีเอ จำนวน 30 ราย เป็นเพศชาย 16 ราย

คิดเป็นร้อยละ 53.33 มีอายุเฉลี่ย 67.06 ± 10.17 ปี และเพศหญิง 14 ราย คิดเป็นร้อยละ 46.67 อายุเฉลี่ย 58.29 ± 12.68 ปี จำนวนเกล็ดเลือดของตัวอย่าง เลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งอีดีทีเอก่อนการศึกษาผล ของสารกันเลือดแข็ง พบว่าเพศชายมีค่าเฉลี่ยเกล็ด เลือด $(83.94 \pm 35.82) \times 10^3/\mu\text{L}$ และเพศหญิงมี ค่าเฉลี่ยเกล็ดเลือด $(80.36 \pm 32.97) \times 10^3/\mu\text{L}$ โดยมีค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดโดยรวมเท่ากับ $(82.27 \pm 33.98) \times 10^3/\mu\text{L}$ ผู้เข้าร่วมวิจัยส่วนใหญ่มีโรคประจำตัว จำนวน 19 ราย คิดเป็นร้อยละ 63.33 ประกอบด้วย โรคความดันโลหิตสูงจำนวน 7 ราย คิดเป็นร้อยละ 36.84 โรคเบาหวาน 4 ราย คิดเป็นร้อยละ 21.05 โรคมะเร็ง 3 ราย คิดเป็นร้อยละ 15.79 โรคไต 3 ราย คิดเป็นร้อยละ 15.79 และโรคหัวใจ 2 ราย คิดเป็น ร้อยละ 10.53

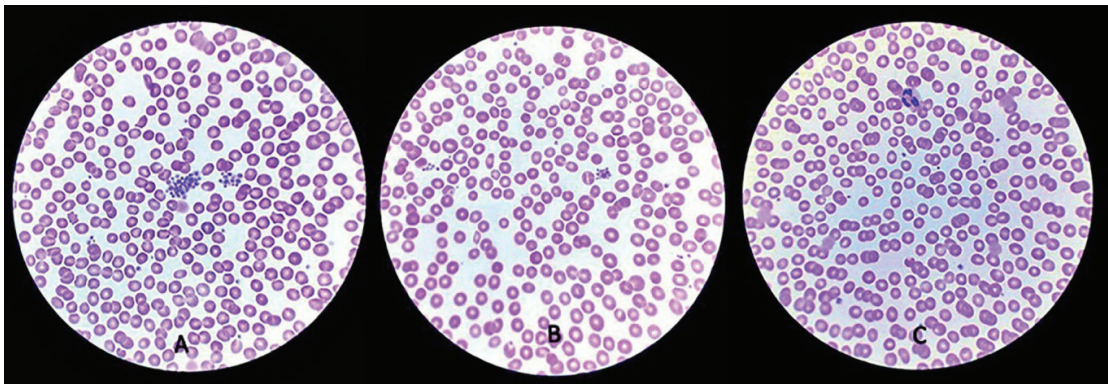


Fig. 1 Examples of platelet aggregation in peripheral blood smear at 30 minutes after receive blood sample. (Wright-Giemsa stain, 100X)

- (A) An ethylenediaminetetraacetic acid tri-potassium salt (K_3EDTA)-anticoagulated sample showing platelet aggregates.
- (B) Sodium citrate-anticoagulated sample showing some platelet aggregation.
- (C) MgSO_4 -anticoagulated sample showing dissociated platelets.

การตรวจดูการกระจายตัวของเกล็ดเลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์

ผลการตรวจรูปร่างลักษณะเซลล์เม็ดเลือดจากสเมียร์เลือดย้อมสีไรท์-จิมซ่า พบว่าเลือดที่ใช้สารกันเลือดแข็งอีทีเอ พบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดขนาดใหญ่ (Fig. 1A) เลือดที่ใช้สารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรต การกระจายตัวของเกล็ดเลือดค่อนข้างดี พบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดขนาดเล็กๆ (Fig. 1B) และเลือดที่ใช้สารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต เกล็ดเลือดมีการกระจายตัวดี ไม่พบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด ขณะที่เม็ดเลือดขาวมีรูปร่างและการติดสีปกติ (Fig. 1C)

ผลของสารกันเลือดแข็งที่มีต่อจำนวนเกล็ดเลือดเมื่อตรวจวิเคราะห์ที่เวลาต่าง ๆ

การศึกษาเปรียบเทียบการใช้สารกันเลือดแข็ง 3 ชนิด คือ อีทีเอ โซเดียมซิเตรต และแมกนีเซียมซัลเฟต ต่อจำนวนเกล็ดเลือด เมื่อตรวจวิเคราะห์ที่เวลา 0 นาที 30 นาที 60 นาที 120 นาที และ 240 นาที เมื่อได้รับตัวอย่างเลือดด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ Sysmex รุ่น XN-3000 โดยตรวจนับจำนวนเกล็ดเลือดทั้งแบบ PLT-I และ PLT-O ได้ผลดังนี้

ผลการตรวจนับจำนวนเกล็ดเลือดแบบ PLT-I ของตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดอีทีเอ โซเดียมซิเตรต และแมกนีเซียมซัลเฟต เมื่อวิเคราะห์ที่เวลาต่าง ๆ พบค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดแตกต่างกัน ดังนี้ เมื่อตรวจวิเคราะห์ที่เวลา 0 นาที ค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดในตัวอย่างเลือดที่เก็บในสารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต (186.33 ± 57.76) $\times 10^3/\mu\text{L}$ มีค่าสูงกว่าตัวอย่างเลือดที่เก็บในสารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรต (119.30 ± 44.99) $\times 10^3/\mu\text{L}$ และอีทีเอ (83.87 ± 34.75) $\times 10^3/\mu\text{L}$ โดยผลการตรวจวิเคราะห์ที่เวลา 30 นาที 60 นาที 120 นาที และ 240 นาที สอดคล้องกับการ

ตรวจนับจำนวนเกล็ดเลือดที่เวลา 0 นาที นั่นคือค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดแบบ PLT-I ในตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต มีค่าสูงกว่าตัวอย่างเลือดในสารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรต และอีทีเออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Fig. 2A) ทั้งนี้พบว่าตัวอย่างเลือดที่เก็บในสารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต จำนวน 30 ราย มีค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดมากกว่าตัวอย่างเลือดที่เก็บในสารกันเลือดแข็งชนิดอีทีเอทุกราย คิดเป็นร้อยละ 100 ขณะที่ตัวอย่างเลือดที่เก็บในสารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรตมีค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดมากกว่าตัวอย่างเลือดที่เก็บในสารกันเลือดแข็งชนิดอีทีเอจำนวน 19 ราย คิดเป็นร้อยละ 63.33

การเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดระหว่างตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็ง 3 ชนิด พบว่าตัวอย่างเลือดในสารกันเลือดแข็งต่างชนิดกันมีค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคิดเป็นร้อยละ 67.30, $F(2, 58) = 59.61$ ($p < 0.001$, Partial $\eta^2 = 0.673$) ค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดโดยรวมของตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต (183.89 ± 57.20) $\times 10^3/\mu\text{L}$ สูงกว่าตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรต (114.23 ± 43.94) $\times 10^3/\mu\text{L}$ และอีทีเอ (77.41 ± 32.90) $\times 10^3/\mu\text{L}$

การทดสอบความแตกต่างรายคู่พบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกคู่ ดังนี้ คู่สารกันเลือดแข็งชนิดอีทีเอกับชนิดโซเดียมซิเตรต มีค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดแตกต่างกันเท่ากับ -36.820 ($p < 0.003$, $d = -0.43$) คู่สารกันเลือดแข็งชนิดอีทีเอกับชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต มีค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดแตกต่างกันเท่ากับ -106.480 ($p < 0.001$, $d = -1.24$) และคู่สารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรตกับชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต มีค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดแตกต่างกันเท่ากับ -69.660 ($p < 0.001$, $d = -0.81$)

การเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือด เมื่อตรวจวิเคราะห์ที่เวลา 0 นาที 30 นาที 60 นาที 120 นาที และ 240 นาที พบว่าเมื่อตรวจวิเคราะห์ที่เวลาแตกต่างกันมีค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คิดเป็นร้อยละ 29.30, $F(2, 58) = 12.01$ ($p < 0.001$, Partial $\eta^2 = 0.293$) โดยพบว่าเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดอีดีทีเอ มีค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คิดเป็นร้อยละ 15.50, $F(1.59, 46.03) = 5.34$ ($p = 0.013$, Partial $\eta^2 = 0.155$) ซึ่งค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดต่ำลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กล่าวคือค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดเมื่อตรวจที่เวลา 0 นาที (83.87 ± 34.75) $\times 10^3/\mu\text{L}$ สูงกว่าที่เวลา 30 นาที (77.93 ± 34.97) $\times 10^3/\mu\text{L}$ เท่ากับ 5.933 ($p = 0.002$, $d = 0.41$) สูงกว่าที่เวลา 60 นาที (75.27 ± 34.50) $\times 10^3/\mu\text{L}$ เท่ากับ 8.600 ($p = 0.001$, $d = 0.60$) สูงกว่าที่เวลา 120 นาที (74.90 ± 33.45) $\times 10^3/\mu\text{L}$ เท่ากับ 8.967 ($p = 0.008$, $d = 0.62$) และสูงกว่าที่เวลา 240 นาที (75.07 ± 31.63) $\times 10^3/\mu\text{L}$ เท่ากับ 8.800 ($p = 0.023$, $d = 0.61$) แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดอีดีทีเอควรตรวจวิเคราะห์จำนวนเกล็ดเลือดทันทีที่ได้รับตัวอย่างเลือด

ตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรตมีค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คิดเป็นร้อยละ 21.40, $F(4, 116) = 7.91$ ($p = 0.002$, Partial $\eta^2 = 0.214$) ค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดเมื่อตรวจที่เวลา 0 นาที (119.30 ± 44.99) $\times 10^3/\mu\text{L}$ สูงกว่าที่เวลา 120 นาที (112.70 ± 44.54) $\times 10^3/\mu\text{L}$ เท่ากับ 6.600 ($p = 0.049$, $d = 0.46$) และสูงกว่าที่เวลา 240 นาที (111.43 ± 43.67) $\times 10^3/\mu\text{L}$ เท่ากับ 7.867 ($p = 0.020$, $d = 0.55$) และผลการตรวจนับจำนวนเกล็ดเลือดที่เวลา 0 นาที สูงกว่าที่เวลา 30 นาที (114.40 ± 44.20)

$\times 10^3/\mu\text{L}$ เท่ากับ 4.900 ($p = 0.164$, $d = 0.34$) และสูงกว่าที่เวลา 60 นาที (113.30 ± 43.77) $\times 10^3/\mu\text{L}$ เท่ากับ 6.000 ($p = 0.107$, $d = 0.42$) อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่า ตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรตควรตรวจวิเคราะห์จำนวนเกล็ดเลือดภายใน 60 นาทีที่ได้รับตัวอย่างเลือด

ตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟตมีค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดแตกต่างกัน คิดเป็นร้อยละ 11.30, $F(1.68, 48.57) = 3.68$ ($p = 0.065$, Partial $\eta^2 = 0.113$) โดยค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดต่ำลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น แต่ความแตกต่างไม่ถึงระดับนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) กล่าวคือ ค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดที่เวลา 0 นาที เท่ากับ $186.33 \pm 57.75 \times 10^3/\mu\text{L}$ ที่เวลา 30 นาที เท่ากับ $184.27 \pm 56.11 \times 10^3/\mu\text{L}$ ที่เวลา 60 นาที เท่ากับ $183.20 \pm 57.52 \times 10^3/\mu\text{L}$ ที่เวลา 120 นาที เท่ากับ $183.17 \pm 57.34 \times 10^3/\mu\text{L}$ และที่เวลา 240 นาที เท่ากับ $182.47 \pm 57.80 \times 10^3/\mu\text{L}$ แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟตสามารถตรวจวิเคราะห์จำนวนเกล็ดเลือดภายใน 240 นาทีที่ได้รับตัวอย่างเลือด

ผลการตรวจนับจำนวนเกล็ดเลือดแบบ PLT-O ของตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็ง 3 ชนิด คือ อีดีทีเอ โซเดียมซิเตรต และแมกนีเซียมซัลเฟต เมื่อตรวจวิเคราะห์ที่เวลาต่าง ๆ พบค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดแตกต่างกัน ดังนี้ เมื่อตรวจนับจำนวนเกล็ดเลือด PLT-O ที่เวลา 0 นาที ค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดในตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต (187.80 ± 56.96) $\times 10^3/\mu\text{L}$ มีค่าสูงกว่าตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรต (118.77 ± 44.46) $\times 10^3/\mu\text{L}$ และอีดีทีเอ (85.70 ± 32.09) $\times 10^3/\mu\text{L}$ ตามลำดับ เช่นเดียวกับการตรวจวิเคราะห์ที่เวลา 30 นาที 60 นาที

120 นาที และ 240 นาที ให้ผลสอดคล้องกับการตรวจนับจำนวนเกล็ดเลือดที่เวลา 0 นาที นั่นคือค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดแบบ PLT-O ในตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต

มีค่าสูงกว่าตัวอย่างเลือดในสารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรต และอีทีเอ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Fig. 2B)

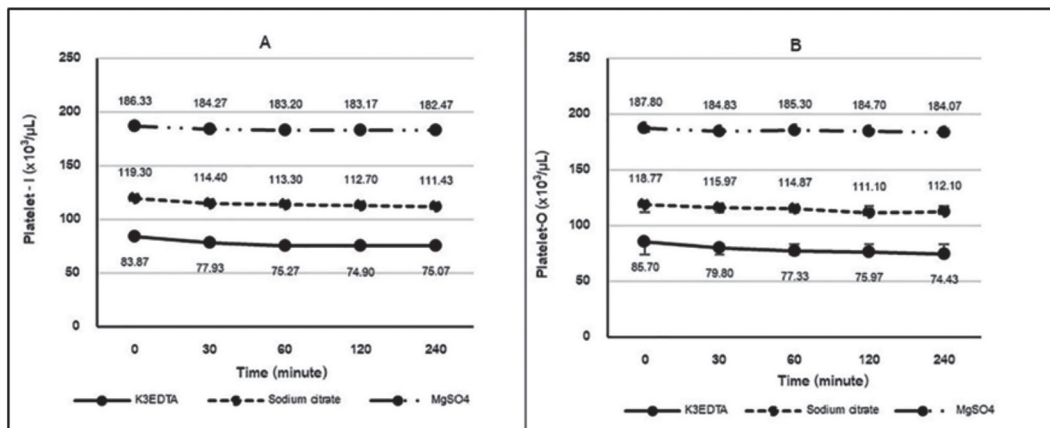


Fig. 2 (A-B) The effect of anticoagulants and analysis time on platelet counts measured by impedance method (PLT-I) and optical method (PLT-O), Sysmex XN-3000 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan). (A) Platelet-I ($\times 10^3/\mu\text{L}$) and (B) Platelet-O ($\times 10^3/\mu\text{L}$).

การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดระหว่างตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็ง 3 ชนิด พบว่าตัวอย่างเลือดในสารกันเลือดแข็งต่างชนิดกันมีค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คิดเป็นร้อยละ 68.40, $F(2, 58) = 62.75$ ($p < 0.001$, Partial $\eta^2 = 0.684$) โดยค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดโดยรวมของตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต (185.34 ± 57.29) $\times 10^3/\mu\text{L}$ สูงกว่าตัวอย่างเลือดที่ใส่ในสารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรต (114.56 ± 42.83) $\times 10^3/\mu\text{L}$ และอีทีเอ (78.65 ± 31.63) $\times 10^3/\mu\text{L}$

การทดสอบความแตกต่างรายคู่พบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกคู่ ดังนั้น คู่สารกันเลือดแข็งชนิดอีทีเอกับชนิดโซเดียมซิเตรต มีค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดแตกต่างกัน เท่ากับ -35.913 ($p < 0.003$, $d = -0.43$)

คู่สารกันเลือดแข็งชนิดอีทีเอกับชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต พบค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดแตกต่างกันเท่ากับ -106.693 ($p < 0.001$, $d = -1.27$) และคู่สารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรตกับชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต มีค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดแตกต่างกันเท่ากับ -70.780 ($p < 0.001$, $d = -0.84$)

การเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือด เมื่อตรวจวิเคราะห์ที่เวลา 0 นาที 30 นาที 60 นาที 120 นาที และ 240 นาที พบว่าเมื่อตรวจวิเคราะห์ที่เวลาแตกต่างกันมีค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คิดเป็นร้อยละ 25.00, $F(2, 58) = 9.66$ ($p < 0.001$, Partial $\eta^2 = 0.250$) โดยตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดอีทีเอมีค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคิดเป็นร้อยละ 17.50, $F(1.59, 46.22) = 6.13$ ($p = 0.007$, Partial $\eta^2 = 0.175$) ตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดอีทีเอ

มีค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดต่ำลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กล่าวคือ ค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดที่เวลา 0 นาที $(85.70 \pm 32.09) \times 10^3/\mu\text{L}$ สูงกว่าที่เวลา 30 นาที $(79.80 \pm 34.14) \times 10^3/\mu\text{L}$ เท่ากับ 5.900 ($p = 0.003$, $d = 0.38$) สูงกว่าที่เวลา 60 นาที $(77.33 \pm 33.70) \times 10^3/\mu\text{L}$ เท่ากับ 8.367 ($p = 0.001$, $d = 0.54$) สูงกว่าที่เวลา 120 นาที $(75.97 \pm 32.47) \times 10^3/\mu\text{L}$ เท่ากับ 9.733 ($p = 0.003$, $d = 0.63$) และสูงกว่าที่เวลา 240 นาที $(74.43 \pm 31.51) \times 10^3/\mu\text{L}$ เท่ากับ 11.267 ($p = 0.007$, $d = 0.73$) แสดงให้เห็นว่า ตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดฮีพารินได้รับตัวอย่างเลือด

ตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรต มีค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคิดเป็นร้อยละ 10.20, $F(1.99, 57.74) = 3.28$ ($p = 0.045$, Partial $\eta^2 = 0.102$) ค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดที่เวลา 0 นาที (118.77 ± 44.46) สูงกว่าที่เวลา 30 นาที (115.97 ± 43.22) เท่ากับ 2.800 ($p = 0.304$, $d = 0.21$) และสูงกว่าที่เวลา 60 นาที (114.87 ± 43.59) เท่ากับ 3.900 ($p = 0.178$, $d = 0.30$) อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แต่สูงกว่าที่เวลา 120 นาที (111.10 ± 42.58) เท่ากับ 7.667 ($p = 0.043$, $d = 0.58$) และสูงกว่าที่เวลา 240 นาที (112.10 ± 44.16) เท่ากับ 6.667 ($p = 0.026$, $d = 0.50$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นั่นคือ ตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรต มีค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 120 นาที และ 240 นาที แสดงให้เห็นว่า ตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรตควรตรวจวิเคราะห์จำนวนเกล็ดเลือดภายในเวลา 60 นาทีที่ได้รับตัวอย่างเลือด

ตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต มีค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดแตกต่างกัน คิดเป็นร้อยละ 13.50, $F(1.92, 55.57) = 4.51$

($p = 0.059$, Partial $\eta^2 = 0.135$) โดยค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดต่ำลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น แต่ความแตกต่างไม่ถึงระดับนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) กล่าวคือ ค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดที่เวลา 0 นาที เท่ากับ $187.80 \pm 56.96 \times 10^3/\mu\text{L}$ ที่เวลา 30 นาที เท่ากับ $184.83 \pm 56.49 \times 10^3/\mu\text{L}$ ที่เวลา 60 นาที เท่ากับ $185.30 \pm 57.81 \times 10^3/\mu\text{L}$ ที่เวลา 120 นาที เท่ากับ $184.70 \pm 57.90 \times 10^3/\mu\text{L}$ และที่เวลา 240 นาที เท่ากับ $184.07 \pm 57.60 \times 10^3/\mu\text{L}$ แสดงให้เห็นว่า ตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟตสามารถตรวจวิเคราะห์จำนวนเกล็ดเลือดภายในเวลา 240 นาทีที่ได้รับตัวอย่างเลือด

การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดแบบ PLT-I และแบบ PLT-O เมื่อตรวจที่เวลา 0 นาที ในตัวอย่างเลือดที่ใส่ในสารกันเลือดแข็งชนิดฮีพาริน พบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือด PLT-O $(85.70 \pm 32.09) \times 10^3/\mu\text{L}$ สูงกว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือด PLT-I $(83.87 \pm 34.75) \times 10^3/\mu\text{L}$ ในตัวอย่างเลือดที่ใส่ในสารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรต ค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือด PLT-O $(118.77 \pm 44.46) \times 10^3/\mu\text{L}$ ต่ำกว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือด PLT-I $(119.30 \pm 44.99) \times 10^3/\mu\text{L}$ และในตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟตค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือด PLT-O $(187.80 \pm 56.96) \times 10^3/\mu\text{L}$ สูงกว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือด PLT-I $(186.33 \pm 57.76) \times 10^3/\mu\text{L}$ (Fig. 3A-C) เมื่อตรวจที่เวลา 30 นาที 60 นาที 120 นาที และ 240 นาที พบว่าตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดฮีพาริน (Fig. 3A) ตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรต (Fig. 3B) และตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต (Fig. 3C) ค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือด PLT-O มีแนวโน้มสูงกว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือด PLT-I เล็กน้อย ทั้งนี้ไม่ได้วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ

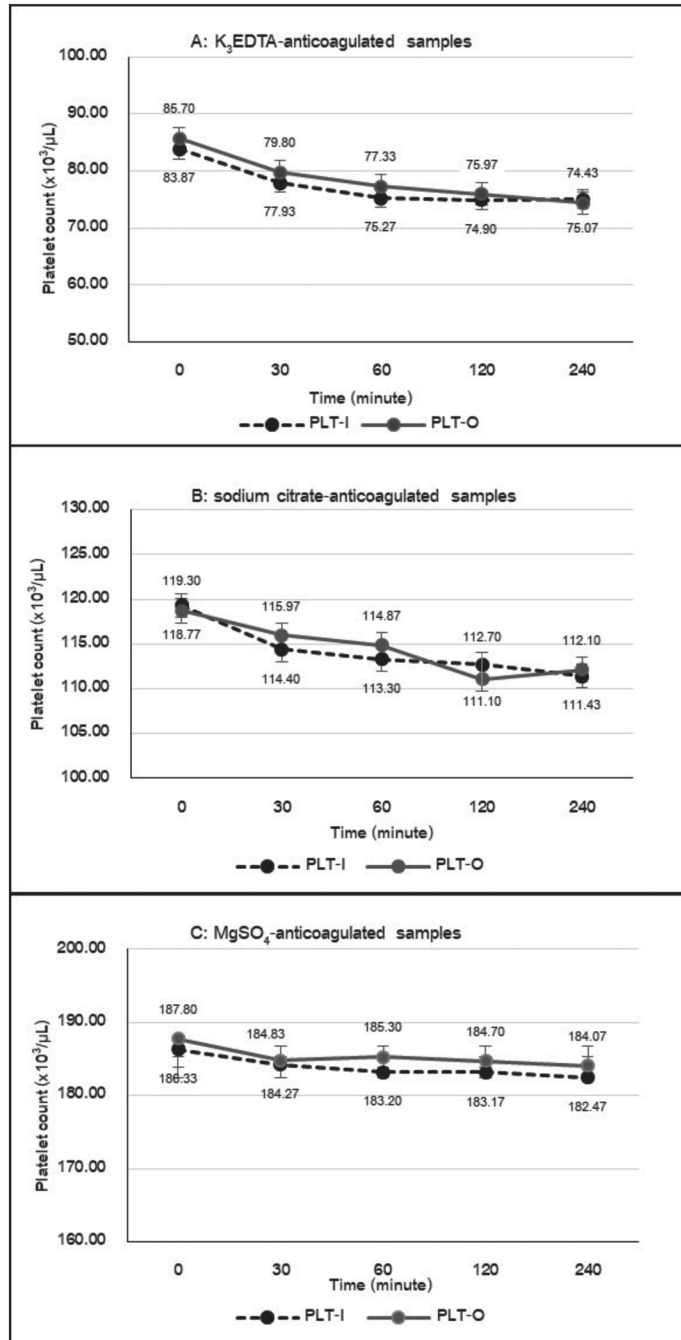


Fig. 3 (A-C) Comparison of mean platelet counts measured by Sysmex XN-3000 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) in K₂EDTA-anticoagulated blood samples (A), sodium citrate-anticoagulated blood samples (B) and MgSO₄-anticoagulated blood samples (C) when analyzed at 0 min, 30 min, 60 min, 120 min and 240 min, respectively. PLT-I = Impedance method and PLT-O = Optical method.

ผลของสารกันเลือดแข็งที่มีต่อค่าพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยาเมื่อตรวจวิเคราะห์ที่เวลาต่าง ๆ

ค่าพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยาที่ทำการศึกษา ได้แก่ ค่า MPV, PDW, P-LCR จำนวนเม็ดเลือดแดง และจำนวนเม็ดเลือดขาว พบว่าสารกันเลือดแข็งมีผลต่อค่าพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยาเมื่อตรวจวิเคราะห์ที่เวลาต่าง ๆ ดังนี้

ผลของสารกันเลือดแข็งต่อค่าเฉลี่ย MPV เมื่อตรวจวิเคราะห์ที่เวลา 0 นาที ในตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็ง 3 ชนิด คือ อีดีทีเอ โซเดียมซิเตรต และแมกนีเซียมซัลเฟต พบว่าค่าเฉลี่ย MPV ในตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดอีดีทีเอ (11.82 ± 1.07) fL มีค่าสูงกว่าตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรต (10.84 ± 0.96) fL และแมกนีเซียมซัลเฟต (10.00 ± 0.97) fL ตามลำดับ เมื่อตรวจวิเคราะห์ที่เวลา 30 นาที 60 นาที 120 นาที และ 240 นาที ให้ผลสอดคล้องกับการตรวจที่เวลา 0 นาที นั่นคือ ค่าเฉลี่ย MPV ในตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดอีดีทีเอมีค่าสูงกว่าตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรต และตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต ดังแสดงใน Fig. 4A การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย MPV ระหว่างตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็ง 3 ชนิด เมื่อตรวจวิเคราะห์ที่เวลาต่าง ๆ พบว่าตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งต่างชนิดกันมีค่าเฉลี่ย MPV แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คิดเป็นร้อยละ 64.40, $F(2, 58) = 39.83$ ($p < 0.001$, Partial $\eta^2 = 0.644$) ผลการวิเคราะห์พบค่าเฉลี่ย MPV โดยรวมของตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดอีดีทีเอ (11.90 ± 0.99) fL สูงกว่าตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรต (10.96 ± 0.97) fL และตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต (10.16 ± 0.89) fL ตามลำดับ ผลการทดสอบความแตกต่างรายคู่ พบค่าเฉลี่ย MPV ของทุกคู่แตกต่าง

กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนี้ คู่สารกันเลือดแข็งชนิดอีดีทีเอกับชนิดโซเดียมซิเตรต มีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.932 ($p < 0.001$, $d = 0.58$) คู่สารกันเลือดแข็งชนิดอีดีทีเอกับชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต มีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.732 ($p < 0.001$, $d = 1.07$) และคู่สารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรตกับชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต มีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.800 ($p < 0.001$, $d = 0.49$)

ระยะเวลาการตรวจวิเคราะห์มีผลทำให้ค่าเฉลี่ย MPV แตกต่างกัน คิดเป็นร้อยละ 14.10, $F(4, 116) = 3.616$ ($p = 0.033$, Partial $\eta^2 = 0.141$) การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย MPV ภายในตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดอีดีทีเอและสารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรต พบว่าค่าเฉลี่ย MPV มีค่าสูงขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น โดยความแตกต่างของค่าเฉลี่ย MPV ในแต่ละช่วงเวลาเปรียบเทียบกับที่เวลา 0 นาที ไม่ถึงระดับนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.079$, $p = 0.495$) ขณะที่ตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต มีค่าเฉลี่ย MPV ในแต่ละช่วงเวลาแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คิดเป็นร้อยละ 27.20, $F(4, 116) = 8.20$ ($p = 0.010$, Partial $\eta^2 = 0.272$) โดยพบว่าตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟตมีค่าเฉลี่ย MPV สูงขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น และพบว่าค่าเฉลี่ย MPV ที่เวลา 120 นาที และ 240 นาที แตกต่างจากค่าเฉลี่ย MPV ที่เวลา 0 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กล่าวคือ ค่าเฉลี่ย MPV ที่เวลา 0 นาที (10.00 ± 0.97) ต่ำกว่าที่เวลา 120 นาที (10.33 ± 0.78) เท่ากับ -0.333 ($p = 0.001$, $d = -0.65$) และต่ำกว่าที่เวลา 240 นาที (10.33 ± 0.86) เท่ากับ -0.337 ($p = 0.001$, $d = -0.66$) ขณะที่ค่าเฉลี่ย MPV ที่เวลา 30 นาที (10.07 ± 1.03) fL และ 60 นาที (10.09 ± 0.93) fL แตกต่างจากค่าเฉลี่ย MPV ที่

เวลา 0 นาที อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.453$ และ $p = 0.293$ ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่า ตัวอย่างเลือดที่ใช้แมกนีเซียมซัลเฟตเป็นสารกันเลือดแข็งควรตรวจวิเคราะห์ค่า MPV ภายในเวลา 60 นาทีที่ได้รับตัวอย่างเลือด

ผลของสารกันเลือดแข็งต่อค่าเฉลี่ย PDW เมื่อตรวจวิเคราะห์ที่เวลา 0 นาที ในตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็ง 3 ชนิด คือ อีทีอีเอ ชนิดโซเดียมซิเตรต และชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต พบว่าค่าเฉลี่ย PDW ในตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดอีทีอีเอ (16.12 ± 3.87)% มีค่าสูงกว่า ตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรต (12.30 ± 2.35)% และแมกนีเซียมซัลเฟต (10.86 ± 2.16)% ตามลำดับ เมื่อตรวจวิเคราะห์ที่เวลา 30 นาที 60 นาที 120 นาที และ 240 นาที ผลการวิเคราะห์สอดคล้องกับการตรวจที่เวลา 0 นาที นั่นคือ ค่าเฉลี่ย PDW ในตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดอีทีอีเอ มีค่าสูงกว่าตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรต และตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต ดังแสดงใน Fig. 4B การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย PDW ระหว่างสารกันเลือดแข็ง 3 ชนิด เมื่อตรวจวิเคราะห์ที่เวลาต่าง ๆ พบว่าตัวอย่างเลือดในสารกันเลือดแข็งต่างชนิดกันมีค่าเฉลี่ย PDW แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คิดเป็นร้อยละ 62.50, $F(2, 58) = 48.28$ ($p < 0.001$, Partial $\eta^2 = 0.625$) ผลการวิเคราะห์พบค่าเฉลี่ย PDW โดยรวมของตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดอีทีอีเอ (16.43 ± 2.79)% สูงกว่าตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรต (12.75 ± 2.19)% และตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต (11.35 ± 1.75)% ผลการทดสอบความแตกต่างรายคู่ พบค่าเฉลี่ย PDW แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกคู่ ดังนี้ คู่สารกันเลือดแข็งชนิดอีทีอีเอกับชนิดโซเดียมซิเตรต มีความแตกต่าง

ของค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.683 ($p < 0.001$, $d = 0.93$) คู่สารกันเลือดแข็งชนิดอีทีอีเอกับชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต มีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเท่ากับ 5.087 ($p < 0.003$, $d = 0.26$) และคู่สารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรตกับชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต มีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.403 ($p = 0.003$, $d = 0.26$)

ระยะเวลาตรวจวิเคราะห์มีผลทำให้ค่าเฉลี่ย PDW แตกต่างกัน คิดเป็นร้อยละ 17.90, $F(2.35, 68.29) = 6.34$ ($p = 0.002$, Partial $\eta^2 = 0.179$) การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย PDW ภายในตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดอีทีอีเอและสารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรต พบว่าค่าเฉลี่ย PDW สูงขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น และความแตกต่างของค่าเฉลี่ย PDW ในแต่ละช่วงเวลาเปรียบเทียบกับที่เวลา 0 นาที ไม่ถึงระดับนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.102$, $p = 0.228$) ในขณะที่ตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต มีผลทำให้ค่าเฉลี่ย PDW แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คิดเป็นร้อยละ 35.90, $F(1.98, 57.40) = 16.21$ ($p = 0.002$, Partial $\eta^2 = 0.359$) โดยพบว่าตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต มีค่าเฉลี่ย PDW สูงขึ้นอย่างต่อเนื่องตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น และพบว่าค่าเฉลี่ย PDW ที่เวลา 60 นาที 120 นาที และ 240 นาที แตกต่างจากค่าเฉลี่ย PDW ที่เวลา 0 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กล่าวคือ ค่าเฉลี่ย PDW ที่เวลา 0 นาที (10.86 ± 2.15) ต่ำกว่าที่เวลา 60 นาที (11.48 ± 2.03) เท่ากับ -0.617 ($p = 0.001$, $d = -0.86$) ต่ำกว่าที่เวลา 120 นาที (11.68 ± 2.06) เท่ากับ -0.820 ($p = 0.001$, $d = -1.14$) และต่ำกว่าที่เวลา 240 นาที (11.66 ± 1.90) เท่ากับ -0.803 ($p = 0.001$, $d = -1.11$) แสดงให้เห็นว่า ตัวอย่างเลือดที่ใช้แมกนีเซียมซัลเฟตเป็นสารกันเลือดแข็งควรตรวจวิเคราะห์ค่า PDW

ภายใน 30 นาทีที่ได้รับตัวอย่างเลือด

ผลของสารกันเลือดแข็งต่อค่าเฉลี่ย P-LCR เมื่อตรวจวิเคราะห์ที่เวลา 0 นาที ในตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็ง 3 ชนิด คือ อีดีทีเอ ชนิดโซเดียม-ซิเตรต และชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต พบค่าเฉลี่ย P-LCR ในตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดอีดีทีเอ (38.33 ± 11.21)% มีค่าสูงกว่าตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรต (30.46 ± 9.19)% และตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต (24.59 ± 6.47)% ผลการตรวจวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย P-LCR ที่เวลา 30 นาที 60 นาที 120 นาที และ 240 นาที ให้ผลสอดคล้องกับการตรวจที่เวลา 0 นาที กล่าวคือ ค่าเฉลี่ย P-LCR ในตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดอีดีทีเอ มีค่าสูงกว่าตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรต และตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต (Fig. 4C) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย P-LCR พบว่าชนิดของสารกันเลือดแข็งมีผลทำให้ค่าเฉลี่ย P-LCR แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คิดเป็นร้อยละ 59.70 , $F(2, 58) = 32.60$ ($p < 0.001$, Partial $\eta^2 = 0.597$) ผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบค่าเฉลี่ย P-LCR โดยรวมของตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดอีดีทีเอ (39.44 ± 9.24)% สูงกว่าตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรต (32.00 ± 8.78)% และตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต (26.70 ± 6.54)% ผลการทดสอบความแตกต่างรายคู่พบค่าเฉลี่ย P-LCR แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกคู่ ดังนั้น คู่สารกันเลือดแข็งชนิดอีดีทีเอกับชนิดโซเดียมซิเตรต มีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเท่ากับ 7.447 ($p = 0.002$, $d = 0.49$) คู่สารกันเลือดแข็งชนิดอีดีทีเอกับชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต มีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเท่ากับ 12.745 ($p < 0.001$, $d =$

0.84) และคู่สารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรตกับชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต มีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเท่ากับ 5.298 ($p < 0.001$, $d = 0.35$)

ระยะเวลาตรวจวิเคราะห์มีผลทำให้ค่าเฉลี่ย P-LCR แตกต่างกัน คิดเป็นร้อยละ 22.20 , $F(4, 116) = 6.27$ ($p = 0.003$, Partial $\eta^2 = 0.222$) การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย P-LCR ภายในตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดอีดีทีเอและชนิดโซเดียมซิเตรต พบว่า ค่าเฉลี่ย P-LCR สูงขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น โดยความแตกต่างของค่าเฉลี่ย P-LCR ในแต่ละช่วงเวลาเปรียบเทียบกับที่เวลา 0 นาที มีความแตกต่างกันไม่ถึงระดับนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.073$, $p = 0.113$) ในขณะที่ตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟตมีผลทำให้ค่าเฉลี่ย P-LCR แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คิดเป็นร้อยละ 46.60 , $F(1.97, 57.41) = 19.17$ ($p = 0.001$, Partial $\eta^2 = 0.466$) โดยพบว่าตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต มีค่าเฉลี่ย P-LCR สูงขึ้นอย่างต่อเนื่องตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น และพบว่าค่าเฉลี่ย P-LCR ที่เวลา 60 นาที 120 นาที และ 240 นาที แตกต่างจากค่าเฉลี่ย P-LCR ที่เวลา 0 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กล่าวคือ เลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต มีค่าเฉลี่ย P-LCR เวลา 0 นาที (24.59 ± 6.47) ต่ำกว่าเวลา 60 นาที (25.99 ± 6.30) เท่ากับ -2.061 ($p = 0.001$, $d = -0.63$) ต่ำกว่าเวลา 120 นาที (28.20 ± 5.57) เท่ากับ -3.613 ($p = 0.001$, $d = -1.10$) และ ต่ำกว่าเวลา 240 นาที (28.05 ± 5.51) เท่ากับ -3.461 ($p < 0.001$, $d = -1.06$) แสดงให้เห็นว่า ตัวอย่างเลือดที่ใช้แมกนีเซียมซัลเฟตเป็นสารกันเลือดแข็งควรตรวจวิเคราะห์ค่า P-LCR ภายใน 30 นาทีที่ได้รับตัวอย่างเลือด

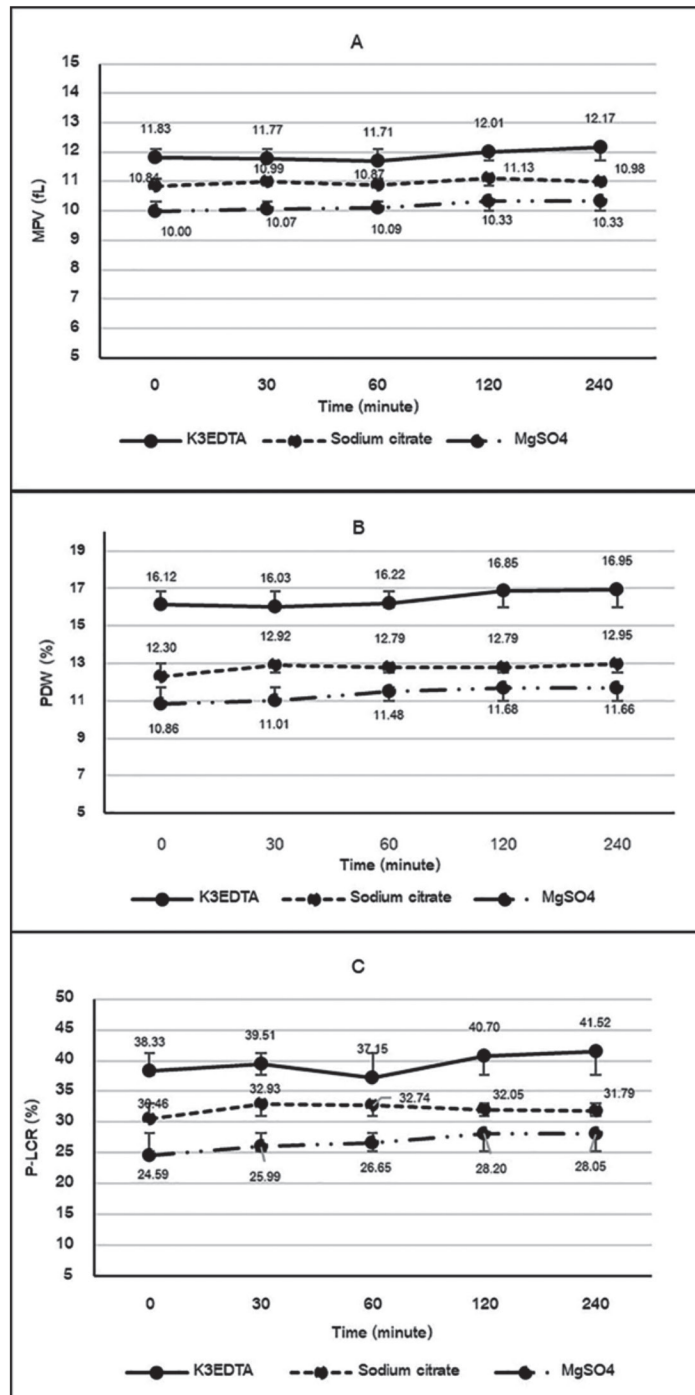


Fig. 4 (A-C) The effect of anticoagulants and analysis time on platelet parameters analyzed by Sysmex XN-3000 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan). (A) MPV (fL), (B) PDW (%) and (C) P-LCR (%)

ผลของสารกันเลือดแข็งต่อค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดแดงในตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็ง 3 ชนิด คือ อีดีทีเอ โซเดียมซิเตรต และแมกนีเซียมซัลเฟต เมื่อตรวจวิเคราะห์ที่เวลา 0 นาที พบค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดแดงในตัวอย่างเลือดที่เก็บในสารกันเลือดแข็งชนิดอีดีทีเอ $(4.40 \pm 0.82) \times 10^6/\mu\text{L}$ สูงกว่าตัวอย่างเลือดที่เก็บในสารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรต $(4.15 \pm 0.78) \times 10^6/\mu\text{L}$ และแมกนีเซียมซัลเฟต $(4.32 \pm 0.80) \times 10^6/\mu\text{L}$ เมื่อตรวจวิเคราะห์ที่เวลา 30 นาที 60 นาที 120 นาที และ 240 นาที ให้ผลสอดคล้องกับการตรวจที่เวลา 0 นาที นั่นคือ ค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดแดงในตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดอีดีทีเอมีค่าสูงกว่าตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรต และตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต (Fig. 5A) การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดแดงระหว่างตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็ง 3 ชนิด เมื่อตรวจวิเคราะห์ที่เวลาต่างๆ พบว่าตัวอย่างเลือดในสารกันเลือดแข็งต่างชนิดมีค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดแดงแตกต่างกัน คิดเป็นร้อยละ 32.30, $F(1.21, 35.09) = 13.85$ ($p < 0.001$, Partial $\eta^2 = 0.323$) ผลการวิเคราะห์พบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดแดงโดยรวมของตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดอีดีทีเอ $(4.40 \pm 0.82) \times 10^6/\mu\text{L}$ สูงกว่าตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรต $(4.15 \pm 0.78) \times 10^6/\mu\text{L}$ และตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต $(4.33 \pm 0.79) \times 10^6/\mu\text{L}$

ผลการทดสอบความแตกต่างรายคู่ พบว่าคู่สารกันเลือดแข็งชนิดอีดีทีเอกับชนิดโซเดียมซิเตรตมีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดแดงเท่ากับ 0.253 ($p < 0.001$, $d = 0.46$) คู่สารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรตกับชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต มี

ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเท่ากับ -0.184 ($p = 0.003$, $d = -0.33$) โดยทั้งสองคู่มีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดแดงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และคู่สารกันเลือดแข็งชนิดอีดีทีเอกับชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต มีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.069 ($p = 0.121$, $d = 0.13$) ซึ่งแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดแดงภายในตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดอีดีทีเอ โซเดียมซิเตรต และแมกนีเซียมซัลเฟต เมื่อตรวจวิเคราะห์ที่เวลาต่างๆ (0, 30, 60, 120 และ 240 นาที) พบว่าตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดอีดีทีเอ โซเดียมซิเตรต และแมกนีเซียมซัลเฟต มีค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดแดงแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเวลา 0 นาที ($p = 0.747$, $p = 0.710$, $p = 0.148$)

ผลของสารกันเลือดแข็งต่อค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดขาวในตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็ง 3 ชนิด คือ อีดีทีเอ โซเดียมซิเตรต และแมกนีเซียมซัลเฟต เมื่อตรวจวิเคราะห์ที่เวลา 0 นาที พบค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดขาวในตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดอีดีทีเอ $(8.46 \pm 4.70) \times 10^3/\mu\text{L}$ สูงกว่าตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรต $(8.11 \pm 4.72) \times 10^3/\mu\text{L}$ แต่ต่ำกว่าตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต $(8.48 \pm 4.75) \times 10^3/\mu\text{L}$ เมื่อตรวจวิเคราะห์ที่เวลา 30 นาที 60 นาที 120 นาที และ 240 นาที ให้ผลสอดคล้องกับการตรวจที่เวลา 0 นาที นั่นคือ ค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดขาวในตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดอีดีทีเอมีค่าสูงกว่าตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรต แต่ต่ำกว่าตัวอย่างเลือดที่เก็บในสารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต (Fig. 5B) การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดขาวระหว่างตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็ง

3 ชนิด เมื่อตรวจวิเคราะห์ที่เวลาต่าง ๆ พบว่าตัวอย่างเลือดในสารกันเลือดแข็งต่างชนิดกันมีค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดขาวแตกต่างกันคิดเป็นร้อยละ 49.10, $F(2, 58) = 28.00$ ($p < 0.001$, Partial $\eta^2 = 0.491$) ผลการวิเคราะห์พบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดขาวโดยรวมของตัวอย่างเลือดที่ได้สารกันเลือดแข็งชนิดอีทีเอ (8.38 ± 4.72) $\times 10^3/\mu\text{L}$ สูงกว่าตัวอย่างเลือดที่ได้ในสารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรต (8.06 ± 4.73) $\times 10^3/\mu\text{L}$ แต่ต่ำกว่าตัวอย่างเลือดที่ได้สารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต (8.46 ± 4.74) $\times 10^3/\mu\text{L}$

ผลการทดสอบความแตกต่างรายคู่ พบว่าคู่สารกันเลือดแข็งชนิดอีทีเอกับชนิดโซเดียมซิเตรตมีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.317 ($p < 0.001$, $d = 0.65$) คู่สารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรตกับชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต มีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเท่ากับ -0.401 ($p < 0.001$, $d = -0.82$) โดยทั้งสองคู่มีค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดขาวแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และคู่สารกันเลือดแข็งชนิดอีทีเอกับชนิดแมกนีเซียมซัลเฟตมีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเท่ากับ -0.084 ซึ่งแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทาง

สถิติ ($p = 0.244$, $d = -0.17$) ผลวิเคราะห์ทางสถิติยังพบว่า ตัวอย่างเลือดที่ได้สารกันเลือดแข็งชนิดอีทีเอและชนิดแมกนีเซียมซัลเฟตเมื่อตรวจวิเคราะห์ที่เวลาต่าง ๆ มีค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดขาวแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.601$, $p = 0.244$) ในขณะที่เลือดที่ได้สารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรตมีค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดขาวแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คิดเป็นร้อยละ 7.90, $F(4, 116) = 2.48$ ($p = 0.048$, Partial $\eta^2 = 0.079$) โดยค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดขาวที่เวลา 60 นาที 120 นาที และ 240 นาที แตกต่างจากค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดขาวที่เวลา 0 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กล่าวคือค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดขาวที่เวลา 0 นาที (8.11 ± 4.72) สูงกว่าที่เวลา 60 นาที (8.07 ± 4.77) เท่ากับ 0.066 ($p = 0.024$, $d = 0.60$) สูงกว่าที่เวลา 120 นาที (8.03 ± 4.72) เท่ากับ 0.077 ($p = 0.046$, $d = 0.70$) และสูงกว่าที่เวลา 240 นาที (8.04 ± 4.70) เท่ากับ 0.076 ($p = 0.013$, $d = 0.69$) ดังนั้นตัวอย่างเลือดที่ได้สารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรตควรตรวจวิเคราะห์จำนวนเม็ดเลือดขาวภายใน 30 นาทีที่ได้รับตัวอย่างเลือด

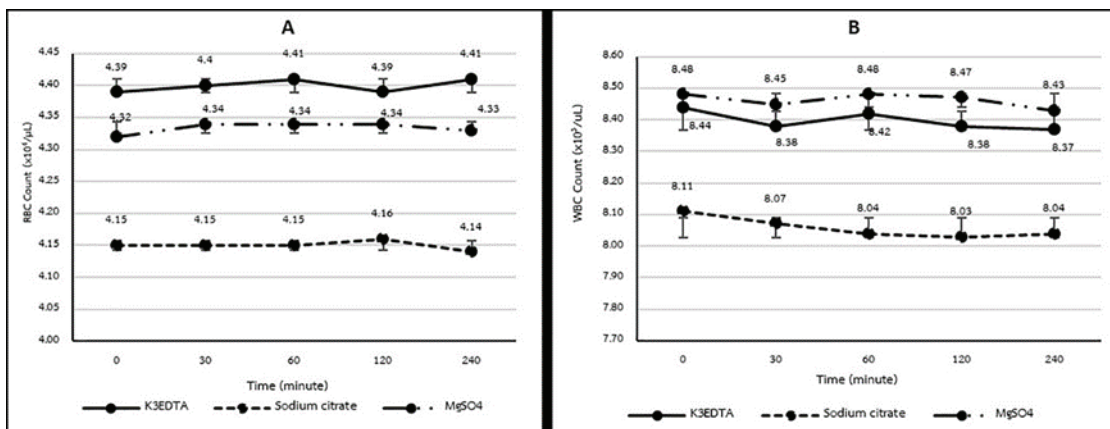


Fig. 5 (A-B) The effect of anticoagulants and analysis time on red blood cell (A) and white blood cell (B) measured by Sysmex XN-3000 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan).

วิจารณ์

งานวิจัยนี้ศึกษาผลของสารกันเลือดแข็ง 3 ชนิด คือ อีดีทีเอ โซเดียมซิเตรต และแมกนีเซียมซัลเฟต ต่อจำนวนเกล็ดเลือดและค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ทางโลหิตวิทยาในผู้ป่วยนอกที่มารับบริการตรวจความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (complete blood count) และตรวจพบภาวะ EDTA-PTCP ที่ศูนย์การแพทย์ปัญญานันทภิกขุ ชลประทาน จำนวน 30 ราย ซึ่งพบว่าตัวอย่างส่วนใหญ่เป็นเพศชายมากกว่าเพศหญิง และมีอายุเฉลี่ยมากกว่า 50 ปี สอดคล้องกับการทบทวนวรรณกรรมของ Lardinois และคณะ ในปี ค.ศ. 2021⁽²¹⁾ ที่รายงานว่า ภาวะ EDTA-PTCP มักพบในเพศชายที่มีอายุตั้งแต่ 50 ปีขึ้นไป นอกจากนี้ยังพบว่า ร้อยละ 63.33 ของตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้ มีโรคประจำตัว ประกอบด้วย โรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน โรคมะเร็ง โรคไต และโรคหัวใจ ซึ่งเป็นโรคที่มีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดภาวะ EDTA-PTCP^(7-8, 22-23) อย่างไรก็ตามการศึกษากลับครั้งนี้เป็นการศึกษาในหลอดทดลอง (*in vitro study*) โรคต่างๆ เหล่านี้จึงไม่น่าจะมีผลต่อการศึกษากลับครั้งนี้

ภาวะ EDTA-PTCP มีผลทำให้จำนวนเกล็ดเลือดที่นับได้จากเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติต่ำกว่าความเป็นจริง ดังในการศึกษากลับครั้งนี้ที่พบว่า ค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดในตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งอีดีทีเอมีค่าต่ำกว่าตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งโซเดียมซิเตรตและแมกนีเซียมซัลเฟต เนื่องจากสารกันเลือดแข็งชนิดอีดีทีเอกระตุ้นให้เกิดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดในหลอดทดลอง หรือเหนียวน้ำให้เกล็ดเลือดเกาะบนผิวของเม็ดเลือดขาว (platelet satellitism) ทำให้จำนวนเกล็ดเลือดต่ำกว่าความเป็นจริง⁽²⁴⁾ ในการศึกษากลับนี้ยังพบอีกว่า ในตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งอีดีทีเอ มีค่าเฉลี่ย MPV, PDW และ P-LCR สูงกว่าตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งโซเดียมซิเตรตและแมกนีเซียมซัลเฟต แสดงว่า

ภาวะ EDTA-PTCP มีผลทำให้ค่าเฉลี่ย MPV, PDW และ P-LCR สูงขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดทำให้ตรวจวัดค่า MPV ได้สูงขึ้น และการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดย่อมมีขนาดเล็กใหญ่แตกต่างกัน ส่งผลให้ค่าเฉลี่ย PDW สูงขึ้น รวมทั้งค่าเฉลี่ย P-LCR เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่า สารกันเลือดแข็งอีดีทีเอทำให้เกิดเกล็ดเลือดบวมส่งผลให้ค่า MPV, PDW และ P-LCR สูงขึ้นด้วย⁽²⁵⁾ การพบภาวะเกล็ดเลือดต่ำโดยไม่ทราบว่าเป็นภาวะ EDTA-PTCP ร่วมกับมีพารามิเตอร์ของเกล็ดเลือดที่เปลี่ยนแปลงไปจากปกติ อาจนำไปสู่การวินิจฉัยโรคที่ผิดพลาดว่าเป็นโรคต่างๆ ที่สำคัญทางคลินิกได้⁽²⁶⁾

ในการศึกษากลับนี้เลือกใช้สารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรต และแมกนีเซียมซัลเฟต เพื่อประเมินประสิทธิภาพในการป้องกัน EDTA-PTCP เนื่องจากปฏิกิริยาการจับกับแคลเซียมไอออนของโซเดียมซิเตรตเป็นแบบย้อนกลับได้ (reversible Ca^{2+} binding) จึงช่วยลดการกระตุ้นเกล็ดเลือดและลดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด⁽¹⁾ ส่วนแมกนีเซียมซัลเฟตมีคุณสมบัติในการยับยั้งไฟบริโนเจนในกระบวนการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดและรักษาความสมบูรณ์ของโครงสร้างไกลโคโปรตีน GPIIb-IIIa complex ที่อยู่บนผิวของเกล็ดเลือด จึงช่วยการป้องกันการ EDTA-PTCP⁽²⁷⁾ ซึ่งผลการศึกษพบว่า ตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งแมกนีเซียมซัลเฟตมีค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดสูงกว่าตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรตและอีดีทีเอตามลำดับ เป็นการยืนยันว่าแมกนีเซียมซัลเฟตมีประสิทธิภาพในการป้องกันการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดในผู้ที่พบภาวะ EDTA-PTCP ได้ดีกว่าสารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรต สอดคล้องกับการศึกษาของ Mannuß และคณะ ในปี ค.ศ. 2020⁽²⁸⁾ และ Soulard และคณะ ในปี ค.ศ. 2023⁽²⁹⁾ ที่พบว่าสารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟตมีประสิทธิภาพ

ในการป้องกันการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดในผู้ที่พบภาวะ EDTA-PTCP ได้ดีกว่าสารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรต การที่ตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรตมีค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดต่ำกว่าตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟตนั้น เนื่องจากสารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรตสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดหรือเกิดการเกาะของเกล็ดเลือดบนผิวของเม็ดเลือดขาวได้ คล้ายกับสารกันเลือดแข็งชนิดอีทีเอ⁽¹¹⁾ แต่ปฏิกิริยาเป็นแบบย้อนกลับได้ดังกล่าวไว้ข้างต้นแล้ว

การตรวจนับจำนวนเกล็ดเลือดที่เวลาต่าง ๆ พบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดต่ำลงตามระยะเวลาที่เพิ่ม ตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดอีทีเอ ควรตรวจนับจำนวนเกล็ดเลือดทันทีที่ได้รับตัวอย่างเลือด ทั้งนี้เนื่องจาก ภาวะ EDTA-PTCP เกิดขึ้นแบบ time-dependent ซึ่งจำนวนเกล็ดเลือดเริ่มลดลงตั้งแต่ 1 นาทีหลังจากเจาะเก็บตัวอย่างเลือดจนถึง 4 ชั่วโมงหลังจากนั้น⁽²¹⁾ ขณะที่ตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรตควรตรวจนับจำนวนเกล็ดเลือดภายในเวลา 60 นาทีที่ได้รับตัวอย่างเลือด และตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟตสามารถใช้ตรวจนับจำนวนเกล็ดเลือดได้นานถึง 240 นาที (4 ชั่วโมง) ซึ่งเป็นไปตามประสิทธิภาพในการป้องกันการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดที่แตกต่างกันของสารกันเลือดแข็งทั้ง 2 ชนิด ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น นอกจากนี้ยังพบว่าระยะเวลาการตรวจวิเคราะห์ มีผลให้ค่าพารามิเตอร์ของเกล็ดเลือดเปลี่ยนแปลง โดยตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดอีทีเอ โซเดียมซิเตรต และแมกนีเซียมซัลเฟต มีค่าเฉลี่ย MPV, PDW และ P-LCR สูงขึ้น เมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ MannuS และคณะ ในปี ค.ศ. 2016⁽²⁵⁾ และตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟต พบว่าเมื่อ

ระยะเวลาเพิ่มขึ้น ค่าพารามิเตอร์ของเกล็ดเลือดเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยค่า MPV ควรตรวจวิเคราะห์ภายใน 60 นาทีที่ได้รับตัวอย่างเลือด และค่า PDW และ P-LCR ควรตรวจวิเคราะห์ภายในเวลา 30 นาทีที่ได้รับตัวอย่างเลือด ในขณะที่ตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดอีทีเอ และโซเดียมซิเตรต ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ของเกล็ดเลือดในแต่ละช่วงเวลา ที่ตรวจวิเคราะห์เปรียบเทียบกับเวลา 0 นาทีที่ได้รับตัวอย่างเลือด มีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ จึงควรมีการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติในการรักษาสภาพเกล็ดเลือดของสารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟตเปรียบเทียบกับอีทีเอและโซเดียมซิเตรตต่อไป อย่างไรก็ตามการศึกษานี้มีข้อจำกัดในเรื่องระยะเวลาการตรวจวิเคราะห์ที่เริ่มนับเวลาดังแต่ตัวอย่างเลือดมาถึงห้องปฏิบัติการ แต่การศึกษานี้ ๑ ที่อ้างอิง นับเวลาดังแต่เจาะเก็บตัวอย่างเลือด

ในการศึกษานี้ยังได้เปรียบเทียบการตรวจนับจำนวนเกล็ดเลือดแบบ PLT-I และ PLT-O พบว่าให้ผลสอดคล้องกัน คือ ตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟตมีค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดสูงกว่าตัวอย่างเลือดในสารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรต และอีทีเอ ตามลำดับ และการตรวจนับจำนวนเกล็ดเลือดแบบ PLT-O ที่เวลาต่าง ๆ พบว่าให้ผลตรงกับการตรวจนับจำนวนเกล็ดเลือดแบบ PLT-I คือ เมื่อได้รับตัวอย่างเลือดแล้ว ตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดอีทีเอควรตรวจนับจำนวนเกล็ดเลือดทันที ตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรตควรตรวจนับจำนวนเกล็ดเลือดภายในเวลา 60 นาที และตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟตสามารถตรวจนับจำนวนเกล็ดเลือดได้ภายในเวลา 240 นาที ทั้งนี้จำนวนเกล็ดเลือดที่ตรวจนับแบบ PLT-O มีแนวโน้มสูงกว่าการนับจำนวนเกล็ดเลือดแบบ PLT-I ซึ่งการ

นับจำนวนเกล็ดเลือดแบบ PLT-O ใช้หลักการออปติคัลร่วมกับหลักการฟลูออเรสเซนซ์ โฟลไซโตเมทรีเพื่อย้อมสีอาร์เอ็นเอภายในเซลล์ แล้ววัดการกระจายแสงที่เกิดขึ้นแปรผันตามขนาดของเซลล์และอาร์เอ็นเอภายในเซลล์ จึงสามารถแยกเกล็ดเลือดและอนุภาคที่ไม่ใช่เกล็ดเลือดออกจากกันได้ การนับจำนวนเกล็ดเลือดแบบ PLT-O จึงมีความแม่นยำมากกว่า^(25, 30) แต่มีค่าใช้จ่ายสูงกว่าเมื่อเทียบกับการตรวจนับจำนวนเกล็ดเลือดแบบ PLT-I

นอกจากจำนวนเกล็ดเลือดและพารามิเตอร์ของเกล็ดเลือดแล้ว ในการศึกษาครั้งนี้ยังได้ตรวจนับจำนวนเม็ดเลือดแดงและจำนวนเม็ดเลือดขาวด้วย ซึ่งพบว่าในตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งอีดีทีเอซึ่งคาดว่าจะมีภาวะ EDTA-PTCP เกิดขึ้น มีค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดแดงสูงกว่าตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งแมกนีเซียมซัลเฟตและโซเดียมซิเตรตตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากหลักการตรวจนับจำนวนเกล็ดเลือดและจำนวนเม็ดเลือดแดงของเครื่องตรวจวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ Sysmex รุ่น XN-3000 ที่อาศัยหลักการ electrical impedance method วัดความต่างศักย์ที่เกิดขึ้นแปรผันตามขนาดของเซลล์ ดังนั้นเมื่อเกล็ดเลือดเกาะกลุ่มกันมีขนาดใกล้เคียงกับเม็ดเลือดแดง ทำให้เครื่องตรวจวิเคราะห์นับเป็นเม็ดเลือดแดง ส่งผลให้จำนวนเม็ดเลือดแดงสูงได้⁽³¹⁾ สำหรับตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งโซเดียมซิเตรตที่ได้ค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดแดงต่ำที่สุด และแตกต่างจากค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดแดงจากตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งอีดีทีเอและตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งแมกนีเซียมซัลเฟตนั้น คล้ายกับการศึกษาของ Akorsu และคณะ ในปี ค.ศ. 2023⁽³²⁾ ที่พบว่าตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรตตรวจนับจำนวนเม็ดเลือดแดงได้ต่ำกว่าตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งเฮปารินและอีดีทีเอ

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับจำนวนเม็ดเลือดขาวนั้นพบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดขาวจากตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งแมกนีเซียมซัลเฟตมีค่าสูงที่สุด แต่แตกต่างจากค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดขาวจากตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งอีดีทีเออย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดขาวต่ำในตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งอีดีทีเออาจเกิดจากเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลเกาะกลุ่มกัน ทำให้เครื่องตรวจวิเคราะห์นับจำนวนเม็ดเลือดขาวได้ต่ำกว่าความจริง⁽³³⁻³⁴⁾ และค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดขาวในตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งโซเดียมซิเตรตที่ได้ค่าต่ำที่สุดเช่นเดียวกับค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งนี้อาจมีสาเหตุจากคุณสมบัติของสารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรตที่อยู่ในรูปสารละลาย ทำให้ตัวอย่างเลือดถูกเจือจาง มีผลให้จำนวนเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวต่ำกว่าตัวอย่างเลือดในสารกันเลือดแข็งอีดีทีเอและแมกนีเซียมซัลเฟต แม้ในการศึกษานี้ได้คูณค่าที่ตรวจวัดได้ด้วย dilution factor คือ 1.1 แล้วก็ตาม แต่มีรายงานว่า dilution factor ที่เหมาะสมควรเป็น 1.17 หรืออาจสูงถึง 1.25^(21, 35) นอกจากนี้ยังพบว่าตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งโซเดียมซิเตรตควรตรวจนับจำนวนเม็ดเลือดขาวภายใน 30 นาทีเมื่อได้รับตัวอย่างเลือด เนื่องจากตัวอย่างเลือดในสารกันเลือดแข็งโซเดียมซิเตรตมีความคงตัวน้อย ไม่เหมาะสำหรับใช้ตรวจทางโลหิตวิทยาอื่น ๆ นอกเหนือจากการทดสอบการแข็งตัวของเลือด (coagulation test) และการวัดอัตราการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง (erythrocyte sedimentation rate)⁽³⁵⁾ อาจอธิบายได้จากการศึกษาในคนที่พบว่าตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรตมีจำนวนเม็ดเลือดขาวต่ำกว่าตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งอีดีทีเออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ⁽³²⁾

สรุป

การศึกษาครั้งนี้พบว่าสารกันเลือดแข็งชนิดแมกนีเซียมซัลเฟตมีประสิทธิภาพในการแก้ไขการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดจากสารกันเลือดแข็งอีดีทีเอได้ดีกว่าสารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรต และในกรณีที่ต้องการตรวจค่า MPV, PDW และ P-LCR เมื่อได้รับตัวอย่างเลือดแล้วควรตรวจวิเคราะห์ภายในเวลา 30 นาที ผลจากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการเลือกสารกันเลือดแข็งเพื่อใช้สำหรับประเมินจำนวนเกล็ดเลือดในผู้ที่ตรวจพบภาวะ EDTA-PTCP และใช้เป็นข้อมูลสำหรับการศึกษาเพื่อบ่งชี้ภาวะ EDTA-PTCP ในประชากรไทย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณครอบครัวของผู้วิจัย หัวหน้าห้องปฏิบัติการ หัวหน้าสาขาพยาธิวิทยาคลินิกและกายวิภาค และนักเทคนิคการแพทย์รวมทั้งเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่ได้สนับสนุนให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนางานในห้องปฏิบัติการต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Schuff-Werner P, Mansour J, Gropp A. Pseudo-thrombocytopenia (PTCP). A challenge in the daily laboratory routine? J Lab Med 2020; 44: 295-304.
- Nopparatana C, Chawakul D, Nakkarabundit N. Prevalence and problem-solving method of EDTA-dependent pseudothrombocytopenia at Songklanagarind hospital. Sonhkla Med J 2015; 53: 293-303.
- Dabadie M, Valli N, Jacobin MJ, *et al.* Characterisation, cloning and sequencing of a conformation-dependent monoclonal antibody to the alpha IIb beta3 integrin: Interest for use in thrombus detection. Platelets 2001; 12: 395-405.
- Lippi G, Plebani M. EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: further insights and recommendations for prevention of a clinically threatening artifact. Clin Chem Lab Med 2012; 50: 128-5.
- Mithoowani S, Arnold DM. Immune Thrombocytopenia [monograph on the Internet]. Consultative Hemostasis and Thrombosis; 2019 [cited 2022 dec 12]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978032346202000008X>.
- Wahed A, Dasgupta A. Sources of Errors in Hematology and Coagulation [monograph on the Internet]. Hematology and Coagulation; 2015 [cited 2022 Dec 10]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/book/9780128002414/hematology-and-coagulation>.
- Isik A, Balcik OS, Akdeniz D, Cipil H, Uysal S, Kosar A. Relationship between some clinical situations, autoantibodies, and pseudothrombocytopenia. Clin Appl Thromb Hemost 2012; 18: 645-9.

8. ACOG practice bulletin: Thrombocytopenia in pregnancy. Number 6, September 1999. Clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists. American College of Obstetricians and Gynecologists. *Int J Gynaecol Obstet* 1999; 67: 117-28.
9. Li H, Wang B, Ning L, Luo Y, Xiang S. Transient appearance of EDTA dependent pseudothrombocytopenia in a patient with 2019 novel coronavirus pneumonia. *Platelets* 2020; 31: 825-6.
10. Sahin M, Savci U, Sahin H. Preoperative evaluation of EDTA-dependent pseudothrombocytopenia before lumbar disc herniation surgery: A case report. *Int J Med Biochem* 2018; 1: 77-9.
11. Zhong L, Chadha J, Ameri A. A curious case of pseudothrombocytopenia due to in vitro agglutination. *Case Rep Hematol* [serial on the Internet]. 2020 Feb [cited 2023 May 18]; 3. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7040393/pdf/CRIHEM2020-6236350.pdf>.
12. Dima F, Salvagno GL, Danese E, Veneri D, Lippi G. An unusual case of sodium citrate-dependent artifactual platelet count. *Interv Med Appl Sci* 2019; 11: 193-6.
13. Kovacs F, Varga M, Pataki Z, Rigo E. Pseudothrombocytopenia with multiple anticoagulant sample collection tubes. *Interv Med Appl Sci* 2016; 8: 181-3.
14. Gawaz M, Ott I, Reininger AJ, Neumann FJ. Effects of magnesium on platelet aggregation and adhesion. Magnesium modulates surface expression of glycoproteins on platelets in vitro and ex vivo. *Thromb Haemost* 1994; 72: 912-8.
15. Schuff-Werner P, Steiner M, Fenger S, *et al.* Effective estimation of correct platelet counts in pseudothrombocytopenia using an alternative anticoagulant based on magnesium salt. *Br J Haematol* 2013; 162: 684-92.
16. Choccalingam C, Radha RKN, Snigdha N. Estimation of platelet counts and other hematological parameters in pseudothrombocytopenia using alternative anticoagulant: magnesium sulfate. *Clin Med Insights Blood Disord* 2017; 10: 1-6.
17. Lwanga SK, Lemeshow S. Sample size determination in health studies: a practical manual. World Health Organization 1991.
18. Darlean W, Nakashima MO. Platelet Count Stability in Sodium Citrate-Anticoagulated Whole Blood Samples. *Am J Clin Pathol* 2018; 149: S84-5.
19. Sukamolson S. Effect size: Practical Significance. *Pasaa Paritat J* 2010; 25: 26-38. (in Thai)
20. Cohen J. Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences. Hillsdale NJ: Lawrence Earlbaum Associates 1988.

21. Lardinois B, Favresse J, Chatelain B, Lippi G, Mullier F. Pseudothrombocytopenia-A review on causes, occurrence and clinical implications. *J Clin Med* 2021; 10: 594.
22. Bao Y, Wang J, Wang A, Bian J, Jin Y. Correction of spurious low platelet counts by optical fluorescence platelet counting of BC-6800 hematology analyzer in EDTA-dependent pseudothrombocytopenia patients. *Transl Cancer Res* 2020; 9: 166-72.
23. Beyan C, Kaptan K, Ifran A. Pseudothrombocytopenia after changing insulin therapy in a case with insulin-dependent diabetes mellitus: a first case report. *Am J Hematol* 2010; 85: 909-10.
24. Zandecki M, Genevieve F, Gerard J, Godon A. Spurious counts and spurious results on haematology analysers: a review. Part I: platelets. *Int J Lab Hematol* 2007; 29: 4-20.
25. Mannuß S, Schuff-Werner P, Dreißiger K, Kohlschein P. Magnesium sulfate as an alternative in vitro anticoagulant for the measurement of platelet parameters? *Am J Clin Pathol* 2016; 145: 806-14.
26. Pogorzelska K, Kretowska A, Krawczuk-Rybak M, Sawicka-Zukowska M. Characteristics of platelet indices and their prognostic significance in selected medical condition - a systematic review. *Adv Med Sci* 2020; 65: 310-5.
27. Scavone M, Bossi E, Podda GM and Cattaneo M. $MgSO_4$ anticoagulant prevents pseudothrombocytopenia by preserving the integrity of the platelet GPIIb-IIIa complex. *Br J Haematol* 2021; 192: e144-8.
28. Mannuß S, Schuff-Werner P, Dreißiger K, Burstein C. Inhibition of agonist-induced platelet aggregation by magnesium sulfate warrants its use as an alternative in vitro anticoagulant in pseudothrombocytopenia. *Platelets* 2020; 31: 680-4.
29. Soulard M, Croix P, Cohen P. Comparison of platelet count results on the Sysmex XN between citrate or $MgSO_4$ and K_2 EDTA anticoagulants. *Int J Lab Hematol* 2023; 45: 20-2.
30. Tantanate C, Khawawisetsut L, Pattanapanyasat K. Performance evaluation of automated impedance and optical fluorescence platelet counts compared with international reference method in patients with Thalassemia. *Arch Pathol Lab Med* 2017; 141: 830-6.

31. Uaprasert N, Polprasert J. Diagnostic approach in hematology: Laboratory interpretation and clinical correlation. 2nd ed. Bangkok: Faculty of Medicine, Chulalongkorn University; 2017. (in Thai)
32. Akorsu EE, Adjabeng LB, Sulleymana MA, Kwadzokpui PK. Variations in the full blood count parameters among apparently healthy humans in the Ho municipal-ity using ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), sodium citrate and lithium heparin anticoagulants: A laboratory-based cross-sectional analytical study. Heliyon [serial on the Internet]. 2023 Jun [cited 2023 Sep 3]; 9(6). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10300364/pdf/main.pdf>
33. Zandecki M, Genevieve F, Gerard J, Godon A. Spurious counts and spurious results on haematology analysers: a review. Part II: white blood cells, red blood cells, haemoglobin, red cell indices and reticulocytes. *Int J Lab Hematol* 2007; 29: 21-41.
34. Gulati G, Uppal G, Gong J. Unreliable Automated Complete Blood Count Results: Causes, Recognition, and Resolution. *Ann Lab Med* 2022; 42: 515-30.
35. Kubiak A, Ziółkowska E, Korycka-Wołowicz A. The diagnostic pitfalls and challenges associated with basic hematological tests. *Acta Haematol Pol* 2022; 53: 104-11.

Antioxidant and Antiglycation Activities of Pigmented Thai Rice Husk Extracts

Sasichay Rakchim¹ 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

Diabetes is one of the non-communicable diseases (NCDs) group which are the leading cause of death worldwide. High levels of blood glucose may induce the glycation of sugars and proteins both inside and outside the cell, leading to the formation of advanced glycosylation end products (AGEs), thereby reducing the elasticity of blood vessels and promoting more oxidation in the cells. Nowadays, there is growing interest in natural health care and more research has begun on rice, an important economic crop in Thailand, in the treatment of diabetes and its complications. However the study of the rice husks is still not very extensive. This work aimed to study the antioxidant activity by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay and the antiglycation property by *in vitro* BSA-glucose assay in crude extracts from 4 types of Thai rice husks containing pigments: Khao Dawk Mali Rice, Sangyod Rice, Riceberry Rice, and Black Sticky Rice. The rice husks were extracted by 2 methods: extraction with 70% ethanol (maceration) and extraction by decoction. The results showed that the anti-oxidant and antiglycation activities were significantly higher in ethanolic extracts than in the decoction extracts ($p < 0.05$). Black Sticky Rice husk extract had the highest anti-oxidant activity with $IC_{50} = 139.76 \pm 52.07 \mu\text{g/mL}$, when compared to the standard substance butylated hydroxytoluene (BHT) ($IC_{50} = 161.38 \pm 33.75 \mu\text{g/mL}$). Moreover, it also had the highest antiglycation effect, with $IC_{50} = 234.69 \pm 29.02 \mu\text{g/mL}$, when compared to aminoguanidine (AG) ($IC_{50} = 430.23 \pm 6.03 \mu\text{g/mL}$), which is used as AGE formation inhibitor. These may correspond to the highest amount of the total phenolic compounds content ($60.60 \pm 3.57 \text{ mg GAE/g}$) and the total anthocyanin content

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

Received: 21 April 2023

Revised: 3 June 2023

Accepted: 12 June 2023

(2.064 ± 0.2 mg/L) in Black Sticky Rice husk extract. This study may provide information for the development of drugs and dietary supplements for diabetic patients.

Keywords: Anthocyanin, Antioxidant, Antiglycation, Diabetes, Pigmented Thai rice husk

ฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระและการต้านไกลเคชั่นของสารสกัดจากกล้วยข้าวไทยที่มีรงควัตถุ

ศศิฉาย รักนิม¹ และ กัญญาณัฐ เปี่ยมงาม^{2*}

¹บัณฑิตศึกษา สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี

²ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี

บทคัดย่อ

โรคเบาหวานเป็นโรคไม่ติดต่อเรื้อรังซึ่งเป็นสาเหตุอันดับต้นในการเสียชีวิตของคนทั่วโลก น้ำตาลในเลือดที่สูงจะเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาไกลเคชั่นระหว่างน้ำตาลกับโปรตีนทั้งภายในและภายนอกเซลล์จนทำให้เกิดสาร advanced glycosylation end products (AGEs) ทำให้ความยืดหยุ่นของหลอดเลือดลดลง และเกิดออกซิเดชันในเซลล์มากขึ้น ปัจจุบันเริ่มมีการศึกษาการใช้ข้าวซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของไทยในการรักษาโรคเบาหวานอย่างกว้างขวางขึ้น แต่การศึกษาในส่วนของกล้วยข้าวยังมีไม่มาก งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay และฤทธิ์ต้านการเกิดไกลเคชั่นด้วยวิธี *In-vitro* BSA-glucose assay ในสารสกัดหยาบจากกล้วยข้าวไทยที่มีรงควัตถุ 4 ชนิดคือ ข้าวหอมมะลิ ข้าวสังข์หยด ข้าวไรซ์เบอร์รี่ และข้าวเหนียวดำ โดยเปรียบเทียบผลจากการสกัดด้วย 2 วิธีคือ สกัดด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 และสกัดด้วยการต้มในน้ำพบว่า การสกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านการเกิดไกลเคชั่นได้ดีกว่าการต้มอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยสารสกัดจากกล้วยข้าวเหนียวดำมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระดีที่สุด มีค่า $IC_{50} = 139.76 \pm 52.07$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งมีฤทธิ์ดีกว่าสารมาตรฐานบิวทิเลตไฮดรอกซีโทลูอิน (BHT) ($IC_{50} = 161.38 \pm 33.75$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และมีฤทธิ์ต้านการเกิดไกลเคชั่นดีที่สุด มีค่า $IC_{50} = 234.69 \pm 29.02$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีฤทธิ์ดีกว่าอะมิโนกัวนิดีน (AG) ที่ใช้เป็นสารต้านไกลเคชั่น ($IC_{50} = 430.23 \pm 6.03$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (60.60 ± 3.57 มิลลิกรัม gallic acid equivalent (GAE) ต่อกรัม) และปริมาณแอนโทไซยานินรวม (2.064 ± 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่พบสูงสุดในสารสกัดจากกล้วยข้าวเหนียวดำ ผลการศึกษาดังกล่าวอาจเป็นแนวทางในการนำไปพัฒนาเป็นยาและอาหารเสริมสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวาน

คำสำคัญ: ต้านอนุมูลอิสระ ต้านไกลเคชั่น โรคเบาหวาน กล้วยข้าวไทยที่มีรงควัตถุ แอนโทไซยานิน

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

รับบทความ: 21 เมษายน 2566

แก้ไขบทความ: 3 มิถุนายน 2566

รับตีพิมพ์บทความ: 12 มิถุนายน 2566

บทนำ

โรคเบาหวานเป็นหนึ่งในกลุ่มโรค non-communicable diseases (NCDs) ที่สำคัญและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี สาเหตุของโรคเกิดจากปัจจัยเสี่ยงด้านพฤติกรรมและปัจจัยเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับกลุ่มอาการเมแทบอลิก เช่น ความดันโลหิตสูง โรคอ้วน สมาพันธ์เบาหวานนานาชาติ (The International Diabetes Federation: IDF) รายงานสถานการณ์โรคเบาหวานในภาคพื้นแปซิฟิกตะวันตก ในปี พ.ศ. 2564 ว่าประเทศไทยมีผู้เป็นโรคเบาหวาน 6.1 ล้านคน ซึ่งมากเป็นอันดับ 4 รองจาก จีน อินโดนีเซีย และญี่ปุ่น⁽¹⁾

การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าระดับน้ำตาลในเลือดที่สูงขึ้นจะส่งผลให้ร่างกายเพิ่มกระบวนการไกลโคไลซิส เพื่อรักษาสสมดุลของน้ำตาลในเลือด โดยออกซิเจนที่ถูกใช้ไปในกระบวนการนี้จะเปลี่ยนไปเป็นน้ำและออกซิเจนที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระ ซึ่งทำให้เกิดภาวะ oxidative stress และมีการกระตุ้นการสร้าง protein kinase C และกระบวนการไกลโคซิเลชันระหว่างน้ำตาลกับโปรตีนทั้งภายในและภายนอกเซลล์จนทำให้เกิดสาร advanced glycosylation end products (AGEs) สาร AGEs นี้เป็นสารพิษที่ไม่ละลายน้ำและอยู่ในร่างกายเป็นเวลานาน นอกจากนี้ สาร AGEs จะจับกับอีลาสตินและคอลลาเจนทำให้ความยืดหยุ่นของหลอดเลือดลดลง เกิดการทำลายเนื้อเยื่อในร่างกาย และมีสารอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น ซึ่งทำให้ร่างกายสร้างสารต้านอนุมูลอิสระมากขึ้นเพื่อกำจัดอนุมูลอิสระเหล่านั้น เมื่อเกิดสารซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนขึ้นภายในเซลล์ เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (SOD) จะเปลี่ยนอนุมูลอิสระเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งจะถูกลดลงเป็นออกซิเจนและน้ำโดยการเร่งของเอนไซม์คาตาเลสและกลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส แต่เมื่อมีการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระมากขึ้น ยีนที่สร้างเอนไซม์เหล่านี้จะเริ่มมีการเปลี่ยนแปลง

ทำให้สร้างเอนไซม์ได้น้อยลงส่งผลให้มีสารอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น ทำให้เกิดผลกระทบต่อร่างกายโดยเฉพาะในผู้ป่วยโรคเบาหวาน นั่นคือ ทำให้มีการเพิ่มปริมาณกรดไขมันและโฮโมซิสเตอีนในเลือด และเกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน ซึ่งส่งผลให้ผู้เป็นโรคเบาหวานมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงเป็นเวลานาน ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้ยาก และเสี่ยงต่อการเกิดโรคแทรกซ้อนจากโรคเบาหวาน^(2, 3)

การวิจัยเกี่ยวกับสารสกัดจากธรรมชาติที่ช่วยในการรักษาโรคเบาหวานและอาการแทรกซ้อนของโรคเบาหวาน เริ่มมีการศึกษาในข้าวซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของไทยและมีการส่งออกมากเป็นอันดับสองของโลกรองจากประเทศอินเดียในปี พ.ศ. 2561⁽⁴⁾ ได้แก่ การศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากข้าวไทย⁽⁵⁾ การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลิกในกลีบรำข้าวและเมล็ดข้าว⁽⁶⁾ การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและคุณลักษณะของโพลีฟีนอลจากกลีบข้าวพื้นเมืองล้านนาและความสัมพันธ์กับคุณสมบัติของเมล็ดข้าว⁽⁷⁾ และการเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและแอนโทไซยานินในกลุ่มข้าวดิบและข้าวสุก 4 ชนิด เป็นต้น⁽⁸⁾ นอกจากนี้การศึกษาเกี่ยวกับข้าวต่างสีพบว่ามีความสัมพันธ์ที่แตกต่างกัน เช่น การศึกษาสารโพลีฟีนอลอิสระและองค์ประกอบทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระของข้าวสายพันธุ์ที่มีสีและไม่มีสีของประเทศไต้หวัน⁽⁹⁾ หรือการศึกษาความสามารถในการต้านไกลโคซิเลชันและการต้านอนุมูลอิสระของข้าวไทย 15 สายพันธุ์ ซึ่งพบว่าข้าวที่มีสีจะมีคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการต้านไกลโคซิเลชันมากกว่าข้าวที่ไม่มีสี⁽¹⁰⁾ แต่การศึกษาในกลีบซึ่งเป็นส่วนที่มีมูลค่าน้อยยังมีไม่มาก ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำส่วนกลีบของข้าวหอมมะลิ ข้าวสังข์หยด ข้าวไรซ์เบอร์รี่ และข้าวเหนียวดำ ซึ่งเป็นข้าวไทยที่มีสีแตกต่างกัน

มาศึกษาฤทธิ์การยับยั้งออกซิเดชันและไกลเคชั่นในผู้ป่วยโรคเบาหวาน เพื่อนำความรู้ที่ได้ไปใช้ในการส่งเสริมสุขภาพด้านอาหารในการป้องกันและบรรเทาภาวะแทรกซ้อนของโรคเบาหวาน หรือต่อยอดไปสู่การพัฒนาการรักษาโรคเบาหวานในอนาคต

วัสดุและวิธีการ

1. การเตรียมสารสกัดจากกลีบ

กลีบข้าว 4 ชนิด ที่นำมาทดสอบ ได้แก่ กลีบข้าวหอมมะลิ (*Oryza sativa* L. cv. Khao Hom Mali 105) จากจังหวัดศรีสะเกษ กลีบข้าวสังข์หยด (*Oryza sativa* L. cv. Sangyod) จากจังหวัดพัทลุง กลีบข้าวเหนียวดำ (*Oryza sativa* var. glutinosa) จากจังหวัดขอนแก่น และกลีบข้าวไรซ์เบอร์รี่ (*Oryza sativa* L. cv. Riceberry) จากจังหวัดพิจิตร ซึ่งมีแหล่งที่มาจากเกษตรกรผู้ปลูกและสีข้าวเองโดยตรง และไม่มีการปนเปื้อนจากกลีบข้าวชนิดอื่น นำกลีบที่ล้างทำความสะอาดและทำให้แห้งแล้วมาบด และนำไปสกัดด้วย 2 วิธี คือ (1) การสกัดด้วยเอทานอล นำกลีบ 5 กรัม หมักในเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นกรองแยกกากและนำส่วนของเหลวมาทำให้แห้งด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงระเหยสารแบบสุญญากาศ (Vacufuge Concentrator system)

(2) การสกัดด้วยการต้ม นำกลีบ 5 กรัม ต้มในน้ำปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปกรองและทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งด้วยหลักการแช่เยือกแข็งภายใต้สุญญากาศ (Freeze Dryer, dry LABCONCO Freeze Dry System) เก็บสารสกัดที่ -20 องศาเซลเซียส

2. การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งออกซิเดชันโดยวิธี DPPH assay

ทดสอบสารสกัดด้วยวิธี DPPH assay⁽¹¹⁾ โดยนำสารสกัดจากกลีบของข้าวหอมมะลิ ข้าวสังข์หยด ข้าวเหนียวดำ และข้าวไรซ์เบอร์รี่ ที่สกัดด้วยเอทานอลและสกัดด้วยการต้ม ที่ความเข้มข้น 1, 5, 25, 50, 100, 250, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระที่มีสีม่วง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยมี butylated hydroxytoluene (BHT) เป็นสารมาตรฐาน นำไปไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร นำค่าที่วัดได้มาลบด้วยค่า sample blank ของสารสกัดจากกลีบแต่ละชนิดเพื่อลดการรบกวนจากสีของกลีบ แล้วนำมาคำนวณค่าร้อยละการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (%radical scavenging) โดยใช้สมการ

$$\text{ค่าร้อยละการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ} = [(AB - AA) / AB] \times 100$$

เมื่อ AA = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารที่ทดสอบผสมกับ DPPH

AB = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลาย DPPH

3. การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric

วิธี Folin-Ciocalteu colorimetric ดัดแปลงจากวิธีของ Chan SW, พ.ศ. 2552⁽¹²⁾ โดยการนำสารสกัดจากกลีบข้าวที่มีความเข้มข้น

1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตรใส่ลงใน 96 well plate เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu เข้มข้นร้อยละ 10 (โดยปริมาตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น

ร้อยละ 7.5 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าที่วัดได้มาลบด้วยค่า sample blank ของสารสกัดจากแกลบ แต่ละชนิดเพื่อลดการรบกวนจากสีของแกลบ นำค่าที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก และคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

4. การหาปริมาณแอนโทไซยานิน โดยวิธี pH differential

การหาปริมาณแอนโทไซยานินโดยวิธี pH

$$A = (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}1.0} - (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}4.5}$$

แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณแอนโทไซยานินจากสูตร

$$\text{ปริมาณแอนโทไซยานิน (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = (A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 1000) / \epsilon \times l$$

เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ใส่บัฟเฟอร์

MW = 449.2 กรัมต่อโมล (ค่ามวลโมเลกุลของ ไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์)

ϵ = 26,900 ลิตรต่อโมลต่อเซนติเมตร

l = 1 เซนติเมตร (ความกว้างของคิวเวต)

DF = 10 (dilution factor)

5. การทดสอบความสามารถการต้านไกลโคเจน ด้วยวิธี *In-vitro* BSA-glucose assay

ทดสอบความสามารถการต้านไกลโคเจน ด้วยวิธี *In-vitro* BSA-glucose assay⁽¹⁴⁾ โดยเตรียม bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ที่ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซไลน์ (PBS) เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 แล้วเติมสารสกัดจากแกลบของข้าวหอมมะลิ ข้าวสังข์หยด ข้าวเหนียวดำและข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

differential ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน AOAC, พ.ศ. 2548⁽¹³⁾ เตรียมสารสกัดจากแกลบความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สองชุด ชุดที่หนึ่งนำมาทำปฏิกิริยากับสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์บัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.025 โมลาร์ พีเอช 1.0 และชุดที่สองนำมาทำปฏิกิริยากับสารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.4 โมลาร์ พีเอช 4.5 ในอัตราส่วน 1:10 โดยใส่สารสกัดจากแกลบ 100 ไมโครลิตร ต่อสารละลายบัฟเฟอร์ 900 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร และ 700 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้สูตร

และอะมิโนกัวนิติน ซึ่งเป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) บ่มไว้เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส วัดค่าการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนซ์โดยสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น excitation เท่ากับ 370 นาโนเมตร และความยาวคลื่น emission เท่ากับ 440 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณร้อยละการยับยั้งการเกิดไกลโคเจนและหาค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการเกิดไกลโคเจนได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ตามสมการ

$$\text{ร้อยละการยับยั้งการเกิดไกลเคชั่น} = (A_c - A_s) / A_c \times 100$$

เมื่อ A_c = ค่าการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนซ์ของปฏิกิริยาที่ไม่มีสารสกัด

A_s = ค่าการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนซ์ของปฏิกิริยาที่มีสารสกัด

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยการหาค่าเฉลี่ย (Mean) $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยใช้ค่า standard deviation (SD) วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลด้วย ANOVA จากการทำการทดลอง 3 ซ้ำ (triplicate) และทำ 3 การทดลองแยกกันอย่างอิสระ คำนวณค่าความแตกต่างทางสถิติโดย t -test ($p < 0.05$)

ผลการศึกษา

1. ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay

DPPH assay เป็นวิธีทดสอบความสามารถการยับยั้งออกซิเดชันโดยการทำปฏิกิริยาทดสอบกับ DPPH ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่เสถียรและเป็นสารละลายสีม่วง ดูดกลืนแสงได้ที่มีความยาวคลื่นประมาณ 520 นาโนเมตร ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับสารที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระทำให้ DPPH ได้รับไฮโดรเจนอะตอม สารละลายจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระของกล้วยข้าว 4 ชนิด พบว่า การสกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 ให้สารที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมากกว่าวิธีการต้ม โดยพบว่าค่า IC_{50} ของสารสกัดจากกล้วยข้าวหอมมะลิ ข้าวสังข์หยด และข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่สกัดด้วยเอทานอล และการต้ม มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน BHT พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกล้วยข้าวเหนียวดำมีประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด ทั้งจากการสกัดด้วยเอทานอล (IC_{50}

= 139.76 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) และที่สกัดด้วยการต้ม (IC_{50} = 182.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) รองลงมาคือ สารสกัดจากกล้วยข้าวสังข์หยด กล้วยข้าวไรซ์เบอร์รี่ และกล้วยข้าวหอมมะลิ ตามลำดับ ยิ่งกว่านั้น สารสกัดจากกล้วยข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยเอทานอลมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าสารมาตรฐาน BHT โดยมีค่า IC_{50} ที่ต่ำกว่า ค่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน BHT ผลการทดสอบทางสถิติพบว่าสารสกัดจากกล้วยข้าวเหนียวดำที่สกัดทั้งสองวิธีมีค่า IC_{50} ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน BHT แสดงว่าสารสกัดจากกล้วยข้าวเหนียวดำที่สกัดทั้งสองวิธีมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเทียบเคียงได้กับสารมาตรฐาน BHT (Table 1)

2. ผลการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ผลการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric assay หลักการที่สารประกอบฟีนอลิกแตกตัวได้เป็นไอออนลบของฟีนอเลท ไอออนลบดังกล่าวจะรีดิวซ์สารละลาย Folin-Ciocalteu เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนฟอสโฟทังสติก-ฟอสโฟโมลิบดีนิกซึ่งมีสีน้ำเงินและดูดกลืนแสงได้ที่มีความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ทำให้สามารถวัดปริมาณของสารประกอบทั้งหมดที่มีหมู่ไฮดรอกซิลในโมเลกุลได้⁽¹⁵⁾ ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากกล้วยของข้าวหอมมะลิ ข้าวสังข์หยด ข้าวเหนียวดำ และข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ

70 และสกัดด้วยการต้ม เทียบกับค่ามาตรฐานของ กรดแกลลิก (Fig. 1) พบว่าแกลบที่สกัดด้วยเอทานอล มีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงกว่าแกลบที่สกัดด้วยการต้มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยสารสกัดเอทานอลจากแกลบของข้าวเหนียวดำมีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุด คือ มีปริมาณฟีนอลิกรวมเทียบเท่ากับ 60.60 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักตัวอย่างแห้ง 1 กรัม ส่วนแกลบของข้าวเหนียวดำที่สกัดด้วยการต้ม มีปริมาณฟีนอลิกรวมเทียบเท่ากับ 45.54 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักตัวอย่างแห้ง 1 กรัม ตามด้วย แกลบข้าวสังข์หยด แกลบข้าวหอมมะลิและแกลบข้าวไรซ์เบอร์รี่ ตามลำดับ (Table 2)

3. ผลการหาปริมาณแอนโทไซยานินโดยวิธี pH differential

การหาปริมาณแอนโทไซยานินโดยวิธี pH differential เป็นการวัดปริมาณแอนโทไซยานินในรูปโมโนเมอร์ทั้งหมดโดยอาศัยหลักการการเปลี่ยนโครงสร้างของแอนโทไซยานินเมื่อค่าพีเอชเปลี่ยน โดยที่พีเอช 1.0 แอนโทไซยานินจะอยู่ในรูปออกซิเนียมซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีสี ส่วนที่พีเอช 4.5 แอนโทไซยานินจะอยู่ในรูปเฮมิคัตอลซึ่งไม่มีสี วิธีนี้ใช้การวัดค่าการดูดกลืนแสงของแอนโทไซยานินที่พีเอช 1.0 หักลบด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่พีเอช 4.5 เพื่อลดการรบกวนจากสารอื่น ๆ⁽¹³⁾ ซึ่งผลการหาปริมาณแอนโทไซยานินโดยวิธี pH differential พบว่าสารสกัดจากแกลบที่สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 มีปริมาณแอนโทไซยานินรวมมากกว่าสารสกัดจากแกลบที่สกัดด้วยการต้มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยสารสกัดจากแกลบข้าวเหนียวดำมีปริมาณแอนโทไซยานินรวมสูงที่สุด ตามด้วยสารสกัดจากแกลบข้าวไรซ์เบอร์รี่ แกลบข้าวหอมมะลิ และแกลบข้าวสังข์หยด ตามลำดับ (Table 3)

4. ผลการทดสอบความสามารถการต้านไกลเซชันด้วยวิธี *In-vitro* BSA-glucose assay

ผลการทดสอบความสามารถการต้านไกลเซชันด้วยวิธี *In-vitro* BSA-glucose assay โดยใช้ BSA จากถั่ววัวที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับอัลบูมินในเลือดของมนุษย์ทำปฏิกิริยากับน้ำตาลกลูโคสจนเกิดกระบวนการไกลเซชัน แล้ววัดปริมาณ AGEs ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปกโทรโฟลูอโรมิเตอร์ พบว่าสารสกัดแกลบที่สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 มีความสามารถยับยั้งการเกิดไกลเซชันได้มากกว่าสารสกัดแกลบที่สกัดด้วยการต้มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยสารสกัดจากแกลบข้าวเหนียวดำมีความสามารถยับยั้งการเกิดไกลเซชันได้มากที่สุด รองลงมาคือแกลบข้าวไรซ์เบอร์รี่ แกลบข้าวสังข์หยด และแกลบข้าวหอมมะลิ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน AG พบว่าสารสกัดจากแกลบข้าวเหนียวดำและแกลบข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่สกัดด้วยเอทานอล มีความสามารถยับยั้งการเกิดไกลเซชันได้มากกว่าสารมาตรฐาน AG อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่สารสกัดเอทานอลจากแกลบข้าวสังข์หยดและสารสกัดด้วยน้ำจากแกลบข้าวเหนียวดำ มีความสามารถยับยั้งการเกิดไกลเซชันได้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากสารมาตรฐาน AG ส่วนสารสกัดจากแกลบชนิดอื่นสามารถยับยั้งการเกิดไกลเซชันได้น้อยกว่าสารมาตรฐาน AG อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (Table 4)

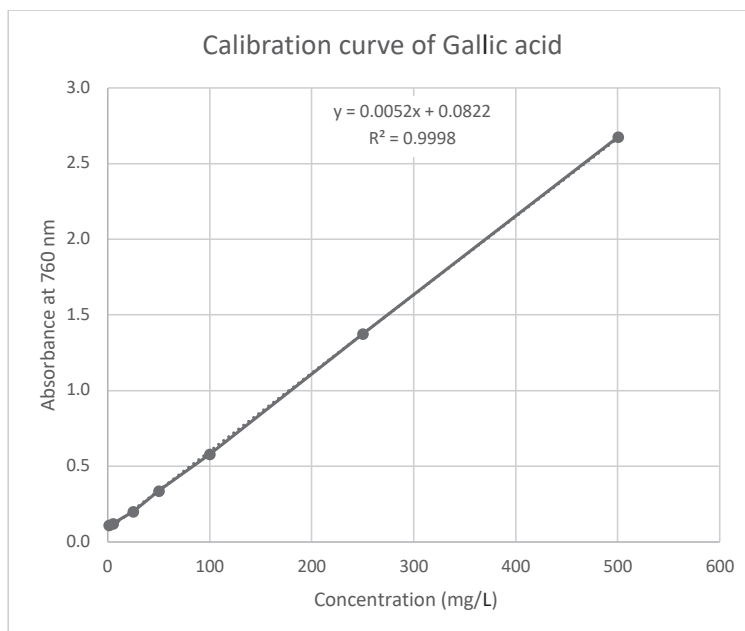


Fig. 1 Calibration curve of standard gallic acid for determination of total phenolic contents. Gallic acid at the concentrations of 1, 5, 25, 50, 100, 250, 500 and 1,000 mg/L was used as a standard for determination of total phenolic contents by using the Folin–Ciocalteu colorimetric method.

Table 1 Antioxidant activity of rice husk extract by DPPH assay (IC_{50} values).

Rice husk extract	IC_{50} (μ g/mL) Extract with 70% ethanol	IC_{50} (μ g/mL) Extract with decoction	p value ^a	p value ^b	p value ^c
Khao Dawk Mali rice husk	510.44 $\pm$ 68.68	731.20 $\pm$ 68.85	0.027	0.001	< 0.001
Sangyod rice husk	333.64 $\pm$ 9.21	488.69 $\pm$ 71.40	0.020	0.001	0.002
Riceberry rice husk	481.85 $\pm$ 26.90	571.27 $\pm$ 17.44	0.008	< 0.001	< 0.001
Black sticky rice husk	139.76 $\pm$ 52.07	182.02 $\pm$ 45.30	0.349	0.579	0.561
BHT	161.38 $\pm$ 33.7				

All analyses are from 3 independent experiments with triplicate measurements. Data were presented as mean $\pm$ SD. Statistical analysis of differences was performed using independent sample *t*-tests, and the statistically significant difference was at $p < 0.05$. BHT, butylated hydroxytoluene; ^aindicates the p value among data of different extraction methods in the same type of extracts; ^bindicates the p value among the different types of 70% ethanolic extract data compared with the BHT; ^cindicates the p value among the different types of decoction extract data compared with the BHT.

Table 2 Total phenolic contents of rice husk extract by Folin–Ciocalteu colorimetric assay.

Rice husk extract	Total phenolic contents (mg GAE/ g) 70% ethanol extract	Total phenolic contents (mg GAE/ g) extract with decoction	<i>P</i> value
Khao Dawk Mali rice husk	37.72 ± 1.66	20.03 ± 3.39	0.001
Sangyod rice husk	53.55 ± 4.43	30.47 ± 7.77	0.011
Riceberry rice husk	28.42 ± 3.51	19.58 ± 0.19	0.048
Black sticky rice husk	60.60 ± 3.57	45.54 ± 2.31	0.004

All analyses are from 3 independent experiments with triplicate measurements. Data were presented as mean ± SD. Statistical analysis of differences was performed using independent sample *t*-tests, and the statistically significant difference was at $p < 0.05$. *P* value shows statistical differences analysis of data in different extraction methods in the same type of extracts.

Table 3 Total anthocyanin of rice husk extract by pH differential assay.

Rice husk extract	Total anthocyanin (mg/L) 70% ethanol extract	Total anthocyanin (mg/L) extract with decoction	<i>P</i> value
Khao Dawk Mali rice husk	1.129 ± 0.14	0.518 ± 0.16	0.008
Sangyod rice husk	0.603 ± 0.23	0.174 ± 0.07	0.037
Riceberry rice husk	1.711 ± 0.43	0.633 ± 0.10	0.042
Black sticky rice husk	2.064 ± 0.20	0.8791 ± 0.10	0.003

All analyses are from 3 independent experiments with triplicate measurements. Data were presented as mean ± SD. Statistical analysis of differences was performed using independent sample *t*-tests, and the statistically significant difference was at $p < 0.05$. *P* value shows statistical differences analysis of data in different extraction methods in the same type of extracts.

Table 4 Inhibition of advanced glycation end products of rice husk extract by *In-vitro* BSA-glucose assay.

Rice husk extract	IC ₅₀ (µg/mL) Extract with 70% ethanol	IC ₅₀ (µg/mL) Extract with decoction	P value ^a	P value ^b	P value ^c
Khao Dawk Mali rice	689.31 ± 58.08**	725.47 ± 31.83**	0.327	0.002	< 0.001
Sangyod rice husk	394.23 ± 49.62	641.258 ± 7.95**	0.001	0.280	< 0.001
Riceberry rice husk	258.55 ± 16.89**	515.82 ± 21.67**	0.001	0.006	0.001
Black sticky rice husk	234.69 ± 29.02**	440.88 ± 12.93	0.000	< 0.001	0.167
Aminoguanidine (AG)	430.23 ± 6.03				

All analyses are from 3 independent experiments with triplicate measurements. Data were presented as mean ± SD. Statistical analysis of differences was performed using independent sample *t*-tests, and the statistically significant difference was at $p < 0.05$. ^aindicates the *P* value among data of different extraction methods in the same type of extracts; ^bindicates the *P* value among the different types of 70% ethanolic extract data compared with AG; ^cindicates the *P* value among the different types of decoction extract data compared with AG.

วิจารณ์

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การต้านไกลเคชั่นกับความเข้มข้นของปริมาณแอนโทไซยานินในกลบที่มีรงควัตถุโดยเปรียบเทียบกลบข้าว 4 ชนิด นอกจากนี้ยังศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดจากการสกัดด้วยวิธีที่ต่างกันภายในข้าวชนิดเดียวกัน โดยการสกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 และการสกัดด้วยการต้ม จากงานวิจัยนี้พบว่าสารสกัดจากเอทานอลมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำ เนื่องจากสารจำพวก โพลีฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และควิโนน เป็นสารที่มีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและเป็นสารที่มีขั้วจึงสกัดออกมาในเอทานอลได้มากกว่าในน้ำ^(16, 17) ข้อดีของการสกัดด้วยเอทานอล คือ ไม่ยุ่งยากและไม่ต้องผ่านความร้อนที่อาจไปทำลายสารสำคัญบางชนิดของพืชที่นำมาทดสอบ แต่ข้อเสียคือใช้เวลาในการ

หมักนาน ส่วนข้อดีของการต้มคือ ทำได้ง่าย ไม่ยุ่งยากใช้เวลาไม่นาน แต่ข้อเสียคือความร้อนอาจทำลายสารสำคัญบางชนิดได้ ซึ่งเราสามารถนำองค์ความรู้นี้ไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์หรือเครื่องสำอางบำรุงสุขภาพได้ โดยผลการวิจัยพบว่ากลบที่สกัดด้วยเอทานอลมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านไกลเคชั่นและมีปริมาณแอนโทไซยานินมากกว่ากลบชนิดเดียวกันที่สกัดด้วยการต้มอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารส่วนใหญ่ที่พบในพืชมีคุณสมบัติเป็นสารที่มีขั้ว ทำให้ละลายได้ดีในแอลกอฮอล์ โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกเป็นวงแหวนแอโรแมติกที่มีหมู่ไฮดรอกซิล ดังนั้นเมื่อสารละลาย DPPH ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระมาดิ้งไฮโดรเจนอะตอมของสารประกอบฟีนอลิก ทำให้สารละลาย DPPH จะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองดังที่เห็นจากงานวิจัยของ Pietta และคณะ⁽¹⁸⁾

ผลการวิจัยพบว่ากลีบของข้าวเหนียวดำมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด รองลงมาคือกลีบข้าวสังข์หยด กลีบข้าวหอมมะลิ และกลีบข้าวไรซ์เบอร์รี่ ตามลำดับ สอดคล้องกับงานวิจัยของHuang และคณะ ในปี พ.ศ. 2555⁽⁹⁾ ส่วนผลการหาปริมาณแอนโทไซยานินโดยวิธี pH differential พบว่าสารสกัดจากกลีบข้าวเหนียวดำมีปริมาณแอนโทไซยานินมากที่สุด รองลงมาคือกลีบข้าวไรซ์เบอร์รี่ กลีบข้าวหอมมะลิและกลีบข้าวสังข์หยด สอดคล้องกับงานวิจัยของ ชัยวิน และคณะ ปี พ.ศ. 2563 ที่ระบุว่าสีของเปลือกข้าวที่มีสีดำหรือแดงจะมีปริมาณแอนโทไซยานินมากกว่าเปลือกข้าวที่มีสีน้ำตาลอ่อน เนื่องจากมีสารฟีนอลิกหลักคือ anthocyanin cyanidin-3-O-b-D-glucoside และ peonidin-3-O-b-D-glucoside⁽⁸⁾

ส่วนผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งไกลเคชั่น พบว่ากลีบข้าวเหนียวดำมีความสามารถในการยับยั้งไกลเคชั่นมากที่สุด รองลงมาคือกลีบข้าวไรซ์เบอร์รี่ กลีบข้าวสังข์หยดและกลีบข้าวหอมมะลิ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Daiponmak และคณะ ในปี พ.ศ. 2557 ที่ศึกษาความสามารถการต้านไกลเคชั่นและการต้านอนุมูลอิสระของข้าวไทย 15 สายพันธุ์ โดยมีข้าวสีม่วง 9 ชนิด ข้าวสีขาว 4 ชนิด และข้าวสีแดง 2 ชนิด และพบว่าข้าวสีม่วงพันธุ์ข้าวกำไ้ (ข้าวกำหรือข้าวเหนียวดำ) มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด และการยับยั้งสาร AGE สูงที่สุด รองลงมาคือข้าวกลุ่มสีแดง และข้าวกลุ่มสีขาว ตามลำดับ และยังพบว่าปริมาณฟีนอลิกรวมและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์กับความสามารถการต้านไกลเคชั่น เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกจะป้องกันการสร้าง AGE โดยกำจัดสารอนุมูลอิสระในขณะที่เกิดไกลเคชั่นและยังยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนด้วย⁽¹⁰⁾ นอกจากนี้

Wan Ju Yeh และคณะ ในปี พ.ศ. 2560 ได้ศึกษาความสามารถและกลไกของสารโพลีฟีนอลในการต้านไกลเคชั่น พบว่าสารโพลีฟีนอลสามารถต้านไกลเคชั่นได้หลายทาง เช่น ยับยั้งการเกิด ROS ในระหว่างไกลเคชั่น ยับยั้ง Schiff base และ Amadori products ทำลายพิษของสารเมธิลไกลออกซัลด้วยเอนไซม์ไกลออกซิเลส หรือยับยั้งการจับกันระหว่าง AGE และตัวรับ (receptor for advanced glycation end products; RAGE) ซึ่งจะช่วยป้องกันการเกิดภาวะ oxidative stress และการสร้าง ROS ที่จะไปกระตุ้นการอักเสบ⁽¹⁹⁾

สรุป

จากการศึกษาพบว่ากลีบที่สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านไกลเคชั่นได้มากกว่ากลีบที่สกัดด้วยวิธีต้มเนื่องจากแอลกอฮอล์เป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารที่มีขั้วได้ดีกว่าน้ำจึงเป็นไปได้ว่าสารสำคัญที่ออกฤทธิ์จะเป็นสารที่มีขั้ว ในขณะที่กลีบข้าวเหนียวดำที่มีสีเข้มที่สุดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านไกลเคชั่นได้มากกว่ากลีบข้าวหอมมะลิ กลีบข้าวสังข์หยด และกลีบข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่มีสีอ่อน เนื่องจากมีสารฟีนอลิกและแอนโทไซยานินมากกว่า ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกมีความสำคัญในการยับยั้งไกลเคชั่น อันเป็นกระบวนการที่เกิดในโรคเบาหวานและนำไปสู่ภาวะแทรกซ้อนจากโรคเบาหวานได้ ดังนั้นจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจในการศึกษาว่าสารใดเป็นสารหลักที่ออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระต่อไป นอกจากนี้ระยะของกลีบข้าวที่นำมาศึกษาและแหล่งที่มาของกลีบก็อาจมีผลต่อการทดลองแตกต่างกัน ซึ่งสามารถนำไปต่อยอดในการศึกษาต่อไป รวมถึงเป็นแนวทางในการพัฒนาเป็นยาอาหารเสริม ตลอดจนผลิตภัณฑ์บำรุงสุขภาพต่าง ๆ ในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 10th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2021.
2. Wacharapat P. Changes of pulpal and periapical tissue in a patient with diabetes mellitus. Songklanakarin Dent J 2014; 2: 20-37. (in Thai)
3. Asmat U, Abad K, Ismail K. Diabetes mellitus and oxidative stress-A concise review. Saudi Pharm J 2016; 24: 547-53.
4. Thai Rice Exporters Association. Report on rice export situation Trends and direction of rice exports in 2019 [cited 2020 Jan 2]. Available from: <http://www.thai-riceexporters.or.th/Press%20release/2019/TREA%20Press%20Release%20Thai%20Rice%20Situation%20&%20Trend%20Year%202019-30012019.pdf>.
5. Semsang N, Keawlangkar N, Chanthachai W. Antioxidant capacities and phenolic compounds of the husk, bran and endosperm of Thai rice [cited 2020 Jan 13]. Available from: http://www.research.cmru.ac.th/research59/ris/download.php?download_file=article&no=545
6. Butsat S, Siriamornpun S. Antioxidant capacities and phenolic compounds of the husk, bran and endosperm of Thai rice. Food Chem 2010; 119: 606-13.
7. Wisetkomolmat J, Arjin C, Hongsibsong S, *et al.* Antioxidant activities and characterization of polyphenols from selected northern Thai rice husks: relation with seed attributes. Rice Sci 2023; 30: 148-59.
8. Petchlert C, Sangprathum T. Comparison of phenolic and anthocyanin content among four differences of raw and cooked rice. Naresaun Phayao J 2020; 13: 36-41. (in Thai)
9. Shao-Hua Huang, Lean-Teik Ng. Quantification of polyphenolic content and bioactive constituents of some commercial rice varieties in Taiwan. J Food Compos Anal 2012; 26: 122-7.
10. Daiponmak W, Senakun C, Siriamornpun S. Antiglycation capacity and antioxidant activities of different pigmented Thai rice. Int J Food Sci 2014; 49: 1805-10.
11. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 1958; 29: 1199-200.
12. Chan SW, Lee CY, Yap CF, Wan Alda WM, Ho CW. Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut (*Citrus hystrix*) peels. Int Food Res J 2009; 16: 203-13.
13. Lee J, Durst RW, Wrolstad RE, *et al.* Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. J AOAC Int 2005; 88: 1269-78.

14. Piumngam K. *In vitro* study of antioxidant, anti-glycation and anti-inflammatory effect of Thai medicinal plants for Diabetic Patients. J Med Tech Assoc Thailand 2020; 48: 7504-18. (in Thai)
15. Ford L, Theodoridou K, Sheldrake G, Walsh P. A critical review of analytical methods used for the chemical characterisation and quantification of phlorotannin compounds in brown seaweeds. Phytochem Anal 2019; 30: 587-99.
16. Radoslaw P, Henryk Z, Danuta C, Krzysztof G. Antioxidant activity of ethanolic and aqueous extracts of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. J Ethnopharmacol 2006; 104: 18-23.
17. Mustarichie R, Runadi D, Ramdhani D. The antioxidant activity and phytochemical screening of ethanol extract, fractions of water, ethyl acetate and n-hexane from mistletoe tea (*Scurrula atropurpureabl. dans*). Asian J Pharm Clin Res 2017; 10: 343-7.
18. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. J Nat Prod 2000; 63: 1035-42.
19. Wan-Ju Y, Shih-Min H, Wei-Hwa L, Chi-Hao W. Polyphenols with antiglycation activity and mechanisms of action: A review of recent findings. J Food Drug Anal 2017; 25: 84-92.

Study of Genetic Diversity and Genetic Relationship of Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Subunit 1 (*cox I*) Gene of *Plasmodium knowlesi* in Thailand

Tuvaporn Suvanla^{1, 3} and Dujdow Songthamwat^{1, 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

³Division of Vector Borne Diseases, Department of Disease Control, Ministry of Public Health, Nonthaburi Province, Thailand

Abstract

Malaria affects 40% of people worldwide. *Plasmodium knowlesi* is found in *Macaca fascicularis* in Southeast Asian countries and can be transmitted to humans. Cytochrome c oxidase subunit 1 gene (*cox I*) is an important mitochondrial DNA encoding important protein subunits in the cellular respiratory process. *Cox I* is commonly used to identify species and study the evolution of living beings. The objective of this research is to study of genetic diversity and genetic relationship of Mitochondrial *cox I* gene of *Plasmodium knowlesi* in Thailand. In this research, forty DNA samples were collected from 11 provinces in Thailand and confirmed as *P. knowlesi*. *Cox I* gene was used as the DNA target for amplification by PCR. The phylogenetic tree was constructed from nucleotides sequence data of *cox I* gene to classify *P. knowlesi* cluster in Thailand by using the Maximum Parsimony method. The correlations between clusters and patient data, residential area, and parasite density were analyzed. The results showed that the phylogenetic tree can divide *P. knowlesi* into 13 clusters (Cluster I-XIII). Cluster I (8 isolates), Cluster II (7 isolates), Cluster III (3 isolates), Cluster IV (1 isolate), Cluster V (4 isolates), Cluster VI (1 isolate), Cluster VII (3 isolates), Cluster VIII (1 isolate), Cluster IX (1 isolate), Cluster X (3 isolates), Cluster XI (2 isolates), Cluster XII (1 isolate), and Cluster XIII (5 isolates). There were more males infected with *P. knowlesi* (35 males) than females (5 females). The age group infected with *P. knowlesi* < 40 years old was 15 persons and age group ≥ 40 years old

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

was 25 persons. Thirty-nine persons are Thai and 1 person is Myanmar. Twenty-six patients from 33 patients have parasite density $< 10,000$ / μ L of blood and 7 patients have parasite density $\geq 10,000$ / μ L of blood. In conclusion, *P. knowlesi* were divided into 13 clusters. The parasites in the same clusters are similar in genetics and most isolates in different areas have different nucleotide sequences. This research is preliminary data of molecular epidemiology of *P. knowlesi* in Thailand. This data can be applied in public health and planning for malaria control and malaria eradication in Thailand.

Keywords: Cluster, *Cox1*, Maximum Parsimony (MP), Phylogenetic tree, *P. knowlesi*

การศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ ยีน Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Subunit 1 (*cox1*) ของเชื้อ *Plasmodium knowlesi* ในประเทศไทย

สุวพร สุวรรณลา^{1, 3} และ ดุจดาว ทรงธรรมวัฒน์^{1, 2*}

¹บัณฑิตศึกษา สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี

²ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี

³กองโรคติดต่อภายในแบบลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี

บทคัดย่อ

ผู้ติดเชื้อมาลาเรียทั่วโลกมีประมาณร้อยละ 40 ของประชากรโลก *Plasmodium knowlesi* เป็นเชื้อมาลาเรียที่พบในลิงแสมที่อาศัยในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และสามารถติดต่อมาสู่คน ยีน cytochrome c oxidase subunit 1 (*cox1*) เป็นยีนที่อยู่ในไมโทคอนเดรีย ซึ่งสร้างโปรตีนที่มีความสำคัญในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ และนิยมนำมาใช้ในการระบุชนิดและศึกษาทางด้านวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน *cox1* ของเชื้อ *Plasmodium knowlesi* ในประเทศไทย งานวิจัยนี้ใช้ตัวอย่าง DNA ของเชื้อ *P. knowlesi* จำนวน 40 ตัวอย่างจาก 11 จังหวัดในประเทศไทยมาศึกษาด้วยเทคนิค PCR โดยมี *cox1* เป็นยีนเป้าหมาย หลังจากนั้น นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cox1* มาสร้างต้นไม้สายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ด้วยวิธี Maximum Parsimony ในการแบ่งกลุ่ม *P. knowlesi* ในประเทศไทย และวิเคราะห์ร่วมกับประวัติผู้ป่วย ลิ่นที่อยู่อาศัย อาชีพ และความหนาแน่นของเชื้อเพื่อหาความสัมพันธ์กับกลุ่มของเชื้อ ผลการวิจัยสามารถแบ่งกลุ่มเชื้อ *P. knowlesi* ได้เป็น 13 คลัสเตอร์ (I-XIII) ได้แก่ Cluster I (8 ไอโซเลต), II (7 ไอโซเลต), III (3 ไอโซเลต), IV (1 ไอโซเลต), V (4 ไอโซเลต), VI (1 ไอโซเลต), VII (3 ไอโซเลต), VIII (1 ไอโซเลต), IX (1 ไอโซเลต), X (3 ไอโซเลต), XI (2 ไอโซเลต), XII (1 ไอโซเลต) และ XIII (5 ไอโซเลต) พบเพศชายติดเชื้อ *P. knowlesi* มากกว่าเพศหญิง โดยเป็นเพศชาย 35 คน เพศหญิง 5 คน กลุ่มอายุการติดเชื้อ *P. knowlesi* แบ่งเป็นกลุ่มอายุน้อยกว่า 40 ปี 15 คน และมากกว่าหรือเท่ากับ 40 ปีขึ้นไป 25 คน สัญชาติไทย 39 คน สัญชาติพม่า 1 คน ผู้ป่วยที่มีข้อมูลความหนาแน่นของเชื้อจำนวนทั้งหมด 33 คน มีความหนาแน่นของเชื้อในเลือดน้อยกว่า 10,000 ต่อไมโครลิตร จำนวน 26 คน และกลุ่มผู้ป่วยที่มีความหนาแน่นของเชื้อในเลือดมากกว่าหรือเท่ากับ 10,000 ต่อไมโครลิตร จำนวน 7 คน สรุปผลการจำแนกเชื้อ *P. knowlesi* พบว่ามี 13 คลัสเตอร์ เชื้อในแต่ละคลัสเตอร์มีความใกล้เคียงกันทางด้านพันธุศาสตร์และเชื้อส่วนใหญ่ในพื้นที่ต่างกันั้นก็มีลำดับ

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

นิวคลีโอไทด์ของยีนที่แตกต่างกันออกไป ผลการวิจัยนี้เป็นข้อมูลทางระบาดวิทยาทางชีวโมเลกุลเบื้องต้นของเชื้อ *P. knowlesi* ที่แพร่ในแต่ละพื้นที่ในประเทศไทย ซึ่งมีประโยชน์ต่องานทางด้านสาธารณสุข การวางแผนควบคุมและกำจัดโรคมลาเรียในประเทศไทย

คำสำคัญ: คลัสเตอร์, *Cox1*, Maximum Parsimony (MP), ต้นไม้สายวิวัฒนาการ, *P. knowlesi*

บทนำ

Plasmodium knowlesi เป็นเชื้อมาลาเรียที่พบในลิงแสม (*Macaca fascicularis*) ที่อาศัยในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และสามารถติดต่อสู่คนได้โดยมียุงก้นปล่องหลายสายพันธุ์เป็นพาหะนำเชื้อ *P. knowlesi* เป็นเชื้อมาลาเรียที่ติดต่อกับคนเป็นลำดับที่ 5^(1,2) ความรุนแรงของโรคของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. knowlesi* ขึ้นกับหลายปัจจัย และมีอาการแสดงคือ อาการไข้รุนแรง อาการแทรกซ้อน เช่น ไตวายและเม็ดเลือดแดงแตก อาการและภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงเกิดได้เนื่องจากเชื้อชนิดนี้มีระยะ erythrocytic cycle สั้นเพียง 24 ชั่วโมง *P. knowlesi* จะแบ่งตัวในเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยและแตกออกเพื่อเข้าสู่เม็ดเลือดแดงเซลล์ใหม่ทุกวัน จึงทำให้ผู้ป่วยที่ไม่ได้รับการรักษามีอาการและภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงใกล้เคียงกับการติดเชื้อ *P. falciparum* รายงานการติดเชื้อ *P. knowlesi* ในคนครั้งแรกที่รัฐซาราวัก ประเทศมาเลเซีย หลังจากนั้นพบการติดเชื้อในหลายประเทศในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ ประเทศจีน มาเลเซีย เมียนมา เวียดนาม สิงคโปร์ อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และบรูไน พื้นที่ในประเทศไทยที่พบการติดเชื้อ *P. knowlesi* คือ จังหวัดชายแดน โดยเฉพาะบริเวณที่เป็นภูเขาสูง ป่าทึบ และมีแหล่งน้ำถาวรอันเป็นแหล่งแพร่พันธุ์ของยุงก้นปล่อง จังหวัดที่พบผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. knowlesi* ส่วนใหญ่ ได้แก่ จังหวัดชายแดนไทย-มาเลเซีย ชายแดนไทย-กัมพูชา และชายแดนไทย-เมียนมา รายงานในประเทศไทยพบเชื้อมาลาเรียชนิดนี้ในคน ได้แก่ ตาก ประจวบคีรีขันธ์ ยะลานคราวิาส จันทบุรี⁽³⁾ ระนอง⁽⁴⁾ และสระบุรี⁽⁵⁾

Cytochrome c oxidase subunit 1 gene (*cox1*) คือยีนที่พบในไมโทคอนเดรียซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์มีความแตกต่างในสิ่งมีชีวิตต่างชนิดมากกว่าใน

ชนิดเดียวกัน การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทำได้ง่าย เนื่องจากมีการ insertion และการ deletion ของนิวคลีโอไทด์น้อย จึงสามารถนำยีน *cox1* มาใช้ระบุชนิดและจำแนกชนิดความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด⁽⁶⁻⁸⁾ ปี ค.ศ. 1989 ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับ mitochondrial DNA (mtDNA) พบว่ามีความเหมาะสมที่จะเป็น genetic marker สำหรับการศึกษาทางสายวิวัฒนาการ (phylogenetic) เพราะว่า mitochondrial genes มีวิวัฒนาการที่รวดเร็วกว่า nuclear gene นอกจากนี้ mtDNA ไม่ได้มีการรวมตัวกันใหม่ จึงง่ายต่อการสืบทอดทางพันธุกรรมจากแม่สู่ลูก⁽⁹⁾ การศึกษาในประเทศไทยมาเลเซียเกี่ยวกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cox1* ของ *P. knowlesi* แต่ละไอโซเลท พบว่าสามารถแยกความแตกต่างของที่มาของเชื้อได้โดยเปรียบเทียบกับเชื้อที่มาจากประเทศมาเลเซีย ในปี ค.ศ. 1960, รัฐซาราวัก บนเกาะบอร์เนียวและประเทศไทย ซึ่งผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า *cox1* เป็นตัวบ่งชี้ที่เหมาะสมสำหรับการศึกษา phylogenetic ของ *P. knowlesi*⁽⁶⁾ การศึกษาที่ประเทศสิงคโปร์ได้มีการนำยีน *cox1* มาใช้ในการแยกกลุ่ม *P. knowlesi* โดยสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ เชื้อจากประเทศสิงคโปร์ มาเลเซีย (รัฐซาราวัก) และไทยโดยใช้การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *cox1* ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมในแต่ละพื้นที่ได้⁽⁷⁾

ปัจจุบันการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *P. knowlesi* ที่ตำแหน่งยีน *cox1* และความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. knowlesi* กับกลุ่มของ *P. knowlesi* ในประเทศไทยยังมีไม่มากนัก งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *P. knowlesi* ในประเทศไทย โดยแบ่งกลุ่มด้วยต้นไม้สายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ของยีน *cox1*

และหาความสัมพันธ์ของข้อมูลผู้ป่วยกับกลุ่ม *P. knowlesi* โดยข้อมูลผู้ป่วยประกอบด้วย เพศ อายุ parasite density ในเลือด ถิ่นที่อยู่อาศัย อาชีพ และเชื้อชาติ ซึ่งจะเป็นข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับกลุ่มของ *P. knowlesi* ที่พบในประเทศไทยและข้อมูลของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. knowlesi* ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในทางระบาดวิทยา

วัสดุและวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่าง DNA ที่เหลือจากการส่งมาตรวจยืนยันเชื้อ *P. knowlesi* มาวิเคราะห์ด้วยวิธี real-time PCR ที่ศูนย์อ้างอิงทางห้องปฏิบัติการโรคติดต่อมาโดยแมลง กองโรคติดต่อมาโดยแมลง กรมควบคุมโรค โดย DNA ดังกล่าวสกัดมาจากหูดเลือดแห้งบนกระดากกรอง โดยใช้ชุดสกัด Qiagen DNA mini kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีในคู่มือของชุดน้ำยาแล้วนำดีเอ็นเอที่สกัดได้เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยเก็บรวบรวมตั้งแต่ เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2561 - ตุลาคม พ.ศ. 2564 งานวิจัยนี้ผ่านการรับรองจริยธรรมการวิจัยในคนของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ เลขที่หนังสือรับรอง COE No. 014/2564 การรับรองความปลอดภัยทางชีวภาพของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ เลขที่หนังสือรับรอง 079/2564 และการขออนุญาตจากผู้อำนวยการกองโรคติดต่อมาโดยแมลงเพื่อขอใช้ DNA ที่เหลือจากการส่งมาตรวจยืนยันเชื้อ *P. knowlesi* ที่ศูนย์อ้างอิงทางห้องปฏิบัติการโรคติดต่อมาโดยแมลง กองโรคติดต่อมาโดยแมลง กรมควบคุมโรค เลขที่หนังสือรับรอง สธ0411.5/68

2. การทำปฏิกิริยา PCR ต่อยีน *cox1*

การทำ PCR สำหรับยีน *cox1* ใช้ primer PK COX1F (5'-GACATTACCTGTAT-

TAAC-3') และ PK COX1R (5'-GGTA-AGAATGTTAAACA-3') ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Fong *et al.*, 2011⁽⁶⁾ โดยยีน *cox1* ที่ใช้เป็น reference sequence ในการออกแบบ primer ดังนี้ โดยมี GenBank accession number แสดงในวงเล็บ *P. knowlesi* mosquito isolate (AY722797), *P. knowlesi* monkey isolate (AB444106), *P. knowlesi* human isolate (AB444108) Sarawak, Borneo, *P. knowlesi* KH45 (EU880446), *P. knowlesi* KH176 (EU880454), *P. knowlesi* KH229 (EU880458), *P. knowlesi* KH381 (EU880465), *P. knowlesi* KH433 (EU880468), *P. knowlesi* LT4 (EU880474), *P. knowlesi* LT48 (EU880485), *P. knowlesi* LT15 (EU880476), *P. knowlesi* LT53 (EU880489), *P. knowlesi* LT57 (EU880498) และ Thailand *P. knowlesi* A1 (AY598141) ตำแหน่งที่ 3,901-4,561 ความยาว 660 bp โดยใช้ น้ำยา Alltaq Master mix (Qiagen, Germany) ในการเตรียมปฏิกิริยารวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย Alltaq Master mix 5 ไมโครลิตร Primer PK COX1F ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร Primer PK COX1R ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร Master mix tracer 0.16 ไมโครลิตร Rnase-free water 7.84 ไมโครลิตร DNA 5 ไมโครลิตร และใช้ PCR conditions ดังนี้ Initial denaturation 95 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที Denaturation 95 องศาเซลเซียส นาน 5 วินาที Annealing 55 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที และ Extension 72 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที ส่วนกรณีที่ทำ PCR เพื่อใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) จะเตรียมปฏิกิริยาในปริมาตรรวม 100 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง PCR (Biorad T100 thermal cycler, USA)

3. การแยก DNA ด้วยวิธี Gel electrophoresis

นำ PCR Product ที่ได้มาแยกบน agarose gel โดยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gel ในบัฟเฟอร์ 1% TBE และใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที โดยใช้ SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, USA) ในการย้อมแถบ PCR Product แล้วนำไปถ่ายภาพและวิเคราะห์ผลเจลโดยใช้เครื่อง Gel documentation system

4. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cox1* (DNA sequencing)

หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี dye terminator โดยส่ง PCR product ไปทำ DNA sequencing แล้วนำผล *cox1* sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบกับในแต่ละไอโซเลท รวมทั้งเปรียบเทียบกับข้อมูล *cox1* sequence ของเชื้อ *P. knowlesi* ใน GenBank โดยใช้โปรแกรม ClustalW จากโปรแกรม Bioedit เวอร์ชัน 7.2 (<https://bioedit.software.informer.com>)

5. การสร้าง Phylogenetic tree

สร้าง phylogenetic tree โดยใช้วิธี Maximum Parsimony (MP) จากโปรแกรม MEGA เวอร์ชัน 11 (<https://www.megasoftware.net/>) ที่ระดับความเชื่อมั่น 1,000 bootstraps

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistic)

ผลการวิจัย

ตัวอย่างเชื้อ *P. knowlesi* ทั้งหมด 40 ตัวอย่าง เก็บจาก 11 จังหวัดในประเทศไทย ได้แก่ ชุมพร สุราษฎร์ธานี ระนอง สงขลา พังงา ยะลา สตูล ตรัง จันทบุรี ราชบุรี และอุทัยธานี (Fig. 1)

การเพิ่มปริมาณยีน *cox1* โดยอาศัยปฏิกิริยา PCR

ผลการทำ PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน *cox1* ของเชื้อ *P. knowlesi* พบ PCR product ขนาดประมาณ 660 bp ดังแสดงใน Fig. 2

นำผล DNA sequencing ของยีน *cox1* ของเชื้อ *P. knowlesi* ไปทำ multiple nucleotide alignment โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cox1* ของเชื้อ *P. knowlesi* ไอโซเลทที่ 1-41 แต่ไม่ได้นำไอโซเลทที่ 27 มาใช้ในการทำ multiple alignment ด้วย เพราะผล sequence ที่ได้ไม่ชัดเจน และ outgroup ลำดับเบสตำแหน่งที่ 1-600 โดยใช้โปรแกรม ClustalW จากโปรแกรม Bioedit เวอร์ชัน 7.2 (<https://bioedit.software.informer.com>) โดยได้แสดงผลการทำ multiple nucleotide alignment ของตำแหน่งที่ 1-100 ไว้ดังแสดงใน Fig. 3 ซึ่งเห็นได้ว่าแต่ละไอโซเลทของเชื้อ *P. knowlesi* ในคลัสเตอร์เดียวกันมีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์สูง

นำผล multiple nucleotide alignment มาสร้าง phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม MEGA 11 ด้วยวิธี Maximum Parsimony (MP) ในการคำนวณความเชื่อมั่น 1,000 bootstraps ได้ผลดังแสดงใน Fig. 3 สามารถแบ่ง *P. knowlesi* ได้เป็น 13 คลัสเตอร์ (คลัสเตอร์ I-XIII) โดยคลัสเตอร์ I พบ 8 ตัวอย่าง (OQ779218, OQ779214, OQ779198, OQ779207, OQ779229, OQ779225, OQ779210 และ OQ779230) คลัสเตอร์ II พบ 7 ตัวอย่าง (OQ779206, OQ779208, OQ779228, OQ779226, OQ779223, OQ779209 และ OQ779222) คลัสเตอร์ III พบ 3 ตัวอย่าง (OQ779201, OQ779212 และ OQ779213) คลัสเตอร์ IV พบ 1 ตัวอย่าง (OQ779196) คลัสเตอร์ V พบ 4 ตัวอย่าง (OQ779205, OQ779211, OQ779219 และ OQ779221) คลัสเตอร์ VI พบ

1 ตัวอย่าง (OQ779203) คลัสเตอร์ VII พบ 3 ตัวอย่าง (OQ779193, OQ779215 และ OQ779217) คลัสเตอร์ VIII พบ 1 ตัวอย่าง (OQ779200) คลัสเตอร์ IX พบ 1 ตัวอย่าง (OQ779199) คลัสเตอร์ X พบ 3 ตัวอย่าง (OQ779194, OQ779197 และ OQ779216) คลัสเตอร์ XI พบ 2 ตัวอย่าง (OQ779191 และ OQ779192) คลัสเตอร์ XII พบ 1 ตัวอย่าง (OQ779224) คลัสเตอร์ XIII พบ 5 ตัวอย่าง (OQ779195, OQ779202, OQ779204, OQ779220 และ OQ779223) โดย *P. knowlesi* แต่ละคลัสเตอร์มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกันแต่แตกต่างจากนอกกลุ่ม คือ เชื้อ *P. fragile*, *P. vivax*, *P. cynomolgi*, *P. inui*, *P. fieldi* และ *P. coatneyi* จากการศึกษาข้อมูลของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. knowlesi* พบเพศชายติดเชื้อ *P. knowlesi* มากกว่าเพศหญิง โดยแยกเป็นเพศชาย จำนวน 35 คน เพศหญิง จำนวน 5 คน คิดเป็นร้อยละ 87.5 และ 12.5 ตามลำดับ คลัสเตอร์ที่พบในเพศชาย ได้แก่ คลัสเตอร์ I, II, III, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII และ XIII ส่วนคลัสเตอร์ที่พบในเพศหญิง ได้แก่ คลัสเตอร์ I, II, III, VII, XI และ XIII คลัสเตอร์ที่พบร่วมกันในเพศชายและหญิง คือ คลัสเตอร์ I, II, III, VII, XI และ XIII กรณีแบ่งกลุ่มอายุที่มีการติดเชื้อ *P. knowlesi* เป็นกลุ่มอายุน้อยกว่า 40 ปี และกลุ่มอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 40 ปี กลุ่มอายุน้อยกว่า 40 ปี มีจำนวน 15 คน (ร้อยละ 37.5) โดยมีช่วงอายุตั้งแต่ 19-38 ปี มีค่ามัธยฐาน (median) อยู่ที่ 32 ปี และอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 40 ปี มีจำนวน 25 คน (ร้อยละ 62.5) โดยมีช่วงอายุตั้งแต่ 40-78 ปี มีค่ามัธยฐาน (median) อยู่ที่ 52 ปี คลัสเตอร์ที่พบในกลุ่มอายุน้อยกว่า 40 ปี ได้แก่ คลัสเตอร์ I, II, III, IV, V, VI และ VII กลุ่มอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 40 ปี อยู่ในคลัสเตอร์ I, II, III, V, VI, VII, VIII, X,

XI, XII และ XIII คลัสเตอร์ที่พบทั้งสองกลุ่มร่วมกัน ได้แก่ I, II, III, V, VI และ VII กรณีแบ่งตามสัญชาติ จะแบ่งเป็นผู้ป่วยสัญชาติไทย 39 คน (ร้อยละ 97.5) โดยคลัสเตอร์ที่พบในผู้ป่วยสัญชาติไทย ได้แก่ คลัสเตอร์ I, II, III, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII และ XIII และสัญชาติพม่า 1 คน (ร้อยละ 2.5) คลัสเตอร์ที่พบในผู้ป่วยสัญชาติพม่า ได้แก่ คลัสเตอร์ IV

ในการศึกษาครั้งนี้ มีผู้ป่วยที่มีข้อมูลความหนาแน่นของเชื้อ จำนวน 33 คนจากผู้ป่วยทั้งหมด 40 คน โดยแบ่งเป็นกลุ่มผู้ป่วยที่มีความหนาแน่นของเชื่อน้อยกว่า 10,000 ต่อไมโครลิตรจำนวน 26 คน (ร้อยละ 78.8) มีช่วงความหนาแน่นของเชื้อ 512-8,557 ต่อไมโครลิตรของเลือด มีค่ามัธยฐาน (median) อยู่ที่ 4,166 ต่อไมโครลิตรของเลือด อยู่ในคลัสเตอร์ I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, X, XI, XII และ XIII และพบกลุ่มผู้ป่วยที่มีความหนาแน่นของเชื้อในเลือดมากกว่าหรือเท่ากับ 10,000 ต่อไมโครลิตร จำนวน 7 คน (ร้อยละ 21.2) โดยมีช่วงความหนาแน่นของเชื้อในเลือดตั้งแต่ 10,000-98,716 ต่อไมโครลิตร มีค่ามัธยฐาน (median) อยู่ที่ 11,804 ต่อไมโครลิตร อยู่ในคลัสเตอร์ I, II, V และ XIII อยู่ในคลัสเตอร์ร่วมกัน ได้แก่ I, II, V และ XIII ดังแสดงใน Table 1.

จากการศึกษาแหล่งที่มาของเชื้อ *P. knowlesi* พบว่ามาจาก 11 จังหวัดในประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดสงขลา (n=10) คิดเป็นร้อยละ 25 พบผู้ป่วยติดเชื้อ *P. knowlesi* อยู่ในคลัสเตอร์ I, II, III, VII, X และ XI จังหวัดชุมพร (n=9) คิดเป็นร้อยละ 22.5 พบผู้ป่วยติดเชื้อ *P. knowlesi* อยู่ในคลัสเตอร์ I, V, VII, VIII และ XIII จังหวัดตราด (n=7) คิดเป็นร้อยละ 17.5 พบผู้ป่วยติดเชื้อ *P. knowlesi* อยู่ในคลัสเตอร์ I, II, III, IV, IX และ XIII จังหวัดระนอง (n=5) คิดเป็นร้อยละ 12.5 พบ

ผู้ป่วยติดเชื้อ *P. knowlesi* อยู่ในคลัสเตอร์ I, VII, X, XII และ XIII จังหวัดพังงา (n = 3) คิดเป็นร้อยละ 7.5 พบผู้ป่วยติดเชื้อ *P. knowlesi* อยู่ในคลัสเตอร์ I และ II จังหวัดยะลา (n = 1) คิดเป็นร้อยละ 2.5 พบผู้ป่วยติดเชื้อ *P. knowlesi* อยู่ในคลัสเตอร์ III จังหวัดสตูล (n = 1) คิดเป็นร้อยละ 2.5 พบผู้ป่วยติดเชื้อ *P. knowlesi* อยู่ในคลัสเตอร์ XI จังหวัดสุราษฎร์ธานี (n = 1) คิดเป็นร้อยละ 2.5 พบผู้ป่วยติดเชื้อ *P. knowlesi* อยู่ในคลัสเตอร์ VI จังหวัดจันทบุรี (n = 1) คิดเป็นร้อยละ 2.5 พบผู้ป่วยติดเชื้อ *P. knowlesi* อยู่ในคลัสเตอร์ II จังหวัดอุทัยธานี (n = 1) คิดเป็นร้อยละ 2.5 พบผู้ป่วยติดเชื้อ *P. knowlesi* อยู่ในคลัสเตอร์ V และจังหวัดราชบุรี (n = 1) คิดเป็นร้อยละ 2.5 พบผู้ป่วยติดเชื้อ *P. knowlesi* อยู่ในคลัสเตอร์ I ดังแสดงใน Table 2. และ Fig. 1

ผู้ป่วยประกอบอาชีพทำสวนยางเป็นส่วนใหญ่ (n = 21) คิดเป็นร้อยละ 52.5 และติดเชื้อ *P. knowlesi* อยู่ในคลัสเตอร์ I, II, III, IV, VII, IX, X, XI และ XIII อาชีพทำสวนผลไม้ (n = 8) คิดเป็นร้อยละ 20.0 ติดเชื้อ *P. knowlesi* อยู่ในคลัสเตอร์ I, II, V, VII, VIII และ XIII อาชีพรับจ้าง (n = 4) คิดเป็นร้อยละ 10.0 อยู่ในคลัสเตอร์ I, II และ XII อาชีพทหาร/ตำรวจ (n = 1) คิดเป็นร้อยละ 2.5 ติดเชื้อ *P. knowlesi* อยู่ในคลัสเตอร์ V อาชีพพระ/สามเณร (n = 1) คิดเป็นร้อยละ 2.5 ติดเชื้อ *P. knowlesi* อยู่ในคลัสเตอร์ V อาชีพทำไร่อื่นๆ (n = 1) คิดเป็นร้อยละ 2.5 ติดเชื้อ *P. knowlesi* อยู่ในคลัสเตอร์ X และอาชีพอื่นๆ (n = 4) คิดเป็นร้อยละ 10.0 ติดเชื้อ *P. knowlesi* อยู่ในคลัสเตอร์ I และ VI ดังแสดงใน Table 3.

ผลการทำ phylogenetic tree ของเชื้อ *P. knowlesi* โดยใช้ยีน *cox1* เป็นอินโฟรมาเทียบข้อมูลจาก GenBank (Fig. 3) พบว่า *cox1* จากการศึกษาที่มีความคล้ายคลึงกับ Accession number KT900795.1 Peninsular Malaysia ลำดับเบสตำแหน่งที่ 401-1061 และ KT900794.1 Peninsular Malaysia ลำดับเบสตำแหน่งที่ 401-1061 และเมื่อนำมาเทียบกับตัวอย่างจากการศึกษาของ Fong และคณะ ในปี ค.ศ. 2010⁽⁶⁾ ได้แก่ PkUMMC1, PkUMMC5, PkUMMC9 และยีน *cox1* ที่ใช้เป็น reference sequence คือ *P. knowlesi* mosquito isolate (GenBank accession number AY722797), *P. knowlesi* monkey isolate (AB444106), *P. knowlesi* human isolate (AB444108), *P. knowlesi* KH45 (EU880446), *P. knowlesi* KH176 (EU880454), *P. knowlesi* KH229 (EU880458), *P. knowlesi* KH381 (EU880465), *P. knowlesi* KH433 (EU880468), *P. knowlesi* LT4 (EU880474), *P. knowlesi* LT48 (EU880485), *P. knowlesi* LT15 (EU880476), *P. knowlesi* LT53 (EU880489), *P. knowlesi* LT57 (EU880498) และ *P. knowlesi* A1, Thailand (AY598141) รวมทั้ง Accession number KT900795.1 Peninsular Malaysia ลำดับเบสตำแหน่งที่ 401-1061 และ KT900794.1 Peninsular Malaysia ลำดับเบสตำแหน่งที่ 401-1061 ซึ่งจัดกลุ่มได้ 12 คลัสเตอร์ คือ คลัสเตอร์ I-XII โดยคลัสเตอร์ I-II คือคลัสเตอร์ที่พบใหม่ในประเทศไทยซึ่งมาจากภาคใต้ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย คลัสเตอร์ III เป็นตัวอย่างจากจังหวัดสงขลาและสตูล ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายคลึงกับการศึกษาของ Fong จากเชื้อ

P. knowlesi บริเวณเพนินซูล่า ประเทศมาเลเซีย⁽⁶⁾ คลัสเตอร์ IV เป็นเชื้อ *P. knowlesi* ที่มาจากรัฐซาราวัก บริเวณเกาะบอร์เนียว ประเทศมาเลเซีย คลัสเตอร์ V และ VI เป็นเชื้อ *P. knowlesi* ที่พบบริเวณเพนินซูล่า ประเทศมาเลเซีย คลัสเตอร์ VII-X คือคลัสเตอร์ที่พบในประเทศไทย โดยคลัสเตอร์ที่

VII-X เป็นคลัสเตอร์ที่พบใหม่ในประเทศไทยในงานวิจัยนี้ และคลัสเตอร์ XII มาจากภาคใต้ของประเทศไทย ได้แก่ ชุมพร ระนอง และภาคตะวันออก ได้แก่ ตราด มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายคลึงกับบริเวณเพนินซูล่า ประเทศมาเลเซีย ดังแสดงใน Fig. 5

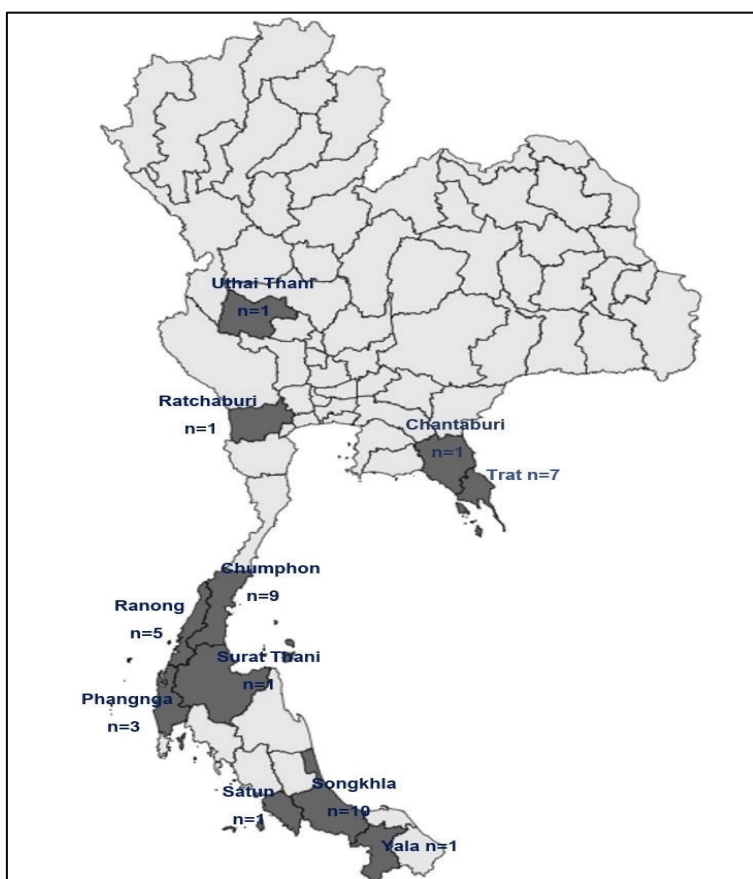


Fig. 1 The collection sites of *P. knowlesi*.

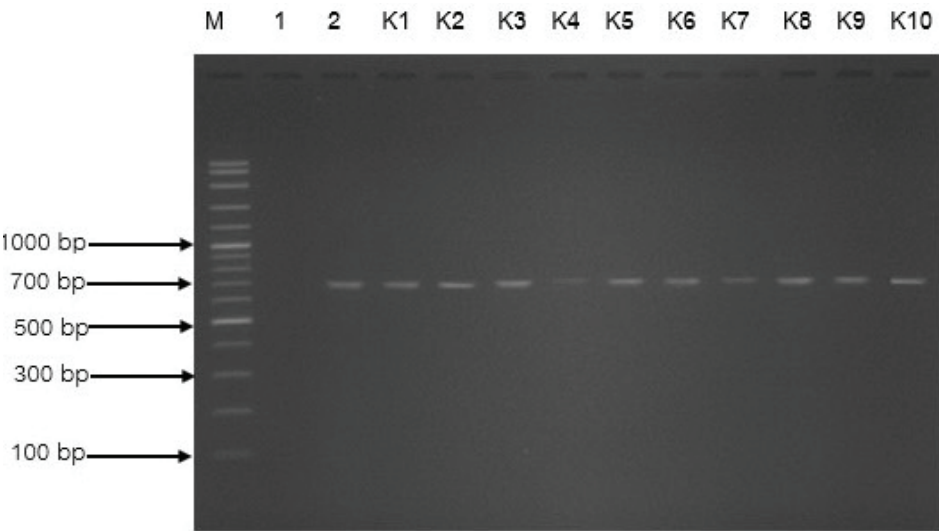


Fig. 2 PCR results of *cox1* gene of *P. knowlesi* in agarose gel electrophoresis. Lane M: 100 bp DNA ladder; Lane 1: Negative control; Lane 2: Positive control; Lane K1-K10: Patient isolates PK1-PK10.



Fig. 3 The results of multiple nucleotides alignment of *cox1* sequences of *P. knowlesi* using the ClustalW program from BioEdit program isolate 1-41 with outgroup base position 1-100 using the ClustalW program from BioEdit program ClustalW version 7.2 (<https://bioedit.software.informer.com>). Conserved nucleotides sequences are shown as a dot. GenBank accession numbers were shown in parenthesis.

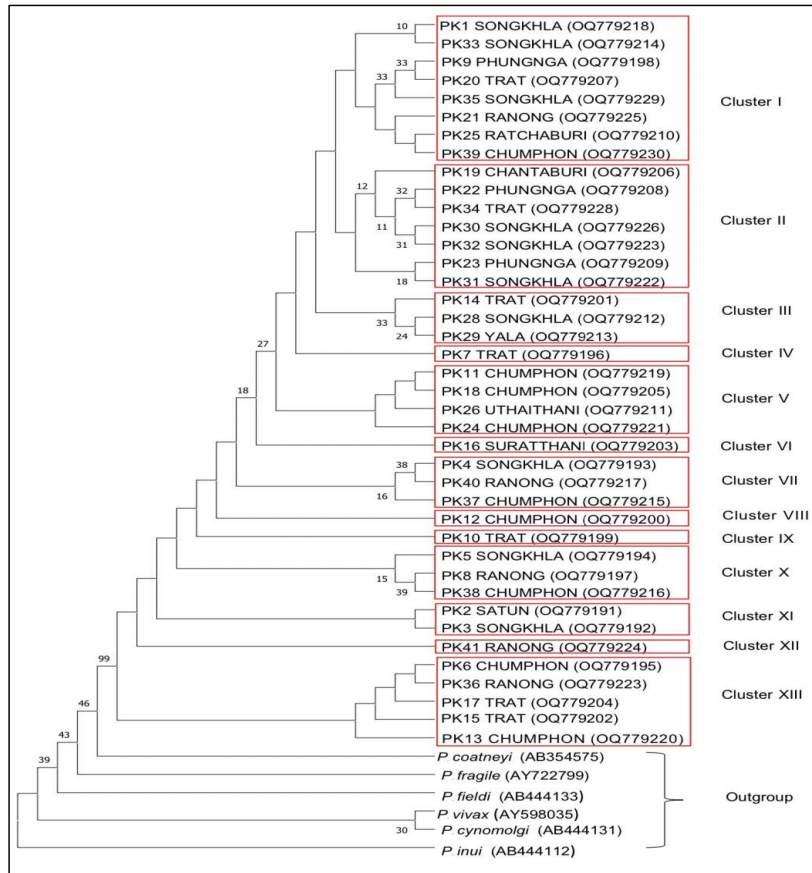


Fig. 4 The phylogenetic tree of *cox1* gene of *P. knowlesi*. The *P. knowlesi* isolates can be divided into 13 clusters by Maximum Parsimony (MP) method using MEGA 11 program (1,000 bootstraps) (<http://www.megasoftware.net/bugs.php>.) GenBank accession numbers were shown in parenthesis as following PK1 (OQ779218), PK2 (OQ779191), PK3 (OQ779192), PK4 (OQ779193), PK5 (OQ779194), PK6 (OQ779195), PK7 (OQ779196), PK8 (OQ779197), PK9 (OQ779198), PK10 (OQ779199), PK11 (OQ779219), PK12 (OQ779200), PK13 (OQ779220), PK14 (OQ779201), PK15 (OQ779202), PK16 (OQ779203), PK17 (OQ779204), PK18 (OQ779205), PK19 (OQ779206), PK20 (OQ779207), PK21 (OQ779225), PK22 (OQ779208), PK23 (OQ779209), PK24 (OQ779221), PK25 (OQ779210), PK26 (OQ779211), PK28 (OQ779212), PK29 (OQ779213), PK30 (OQ779226), PK31 (OQ779222), PK32 (OQ779223), PK33 (OQ779214), PK34 (OQ779228), PK35 (OQ779229), PK36 (OQ779223), PK37 (OQ779215), PK38 (OQ779216), PK39 (OQ779230), PK40 (OQ779217) and PK41 (OQ779224). Outgroup consist of *P. coatneyi* (AB354575), *P. fragile* (AY722799), *P. fieldi* (AB444133), *P. vivax* (AY598035), *P. cynomolgi* (AB444131) and *P. inui* (AB444112).

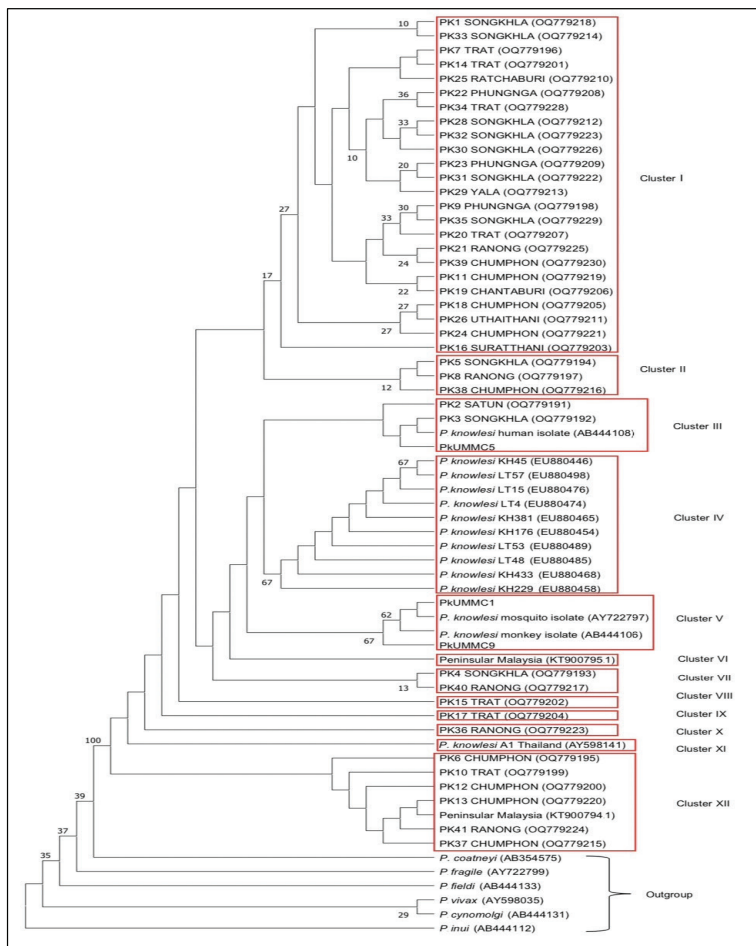


Fig. 5 The phylogenetic tree of *cox1* genes of *P. knowlesi* in this study and *cox1* genes of *P. knowlesi* in GenBank database from Peninsular, Malaysia (PkUMMC1, PkUMMC5, PkUMMC9, *P. knowlesi* mosquito isolate (AY722797), *P. knowlesi* monkey isolate (AB444106), *P. knowlesi* human isolate (AB444108) Sarawak, Borneo, *P. knowlesi* KH45 (EU880446), *P. knowlesi* KH176 (EU880454), *P. knowlesi* KH229 (EU880458), *P. knowlesi* KH381 (EU880465), *P. knowlesi* KH433 (EU880468), *P. knowlesi* LT4 (EU880474), *P. knowlesi* LT48 (EU880485), *P. knowlesi* LT15 (EU880476), *P. knowlesi* LT53 (EU880489), *P. knowlesi* LT57 (EU880498) and Thailand *P. knowlesi* A1 (AY598141). The *P. knowlesi* isolates can be divided into 12 clusters when compared with GenBank accession number from Peninsular Malaysia, Sarawak, Borneo, and Thailand with outgroup. Outgroup consist of *P. coatneyi* (AB354575), *P. fragile* (AY722799), *P. fieldi* (AB444133), *P. vivax* (AY598035), *P. cynomolgi* (AB444131) and *P. inui* (AB444112) by Maximum Parsimony (MP) method using MEGA 11 program (1,000 bootstraps) (<http://www.megasoftware.net/bugs.php>).

Table 1 Cluster of *P. knowlesi* and patients' data (gender, age group, nationality, and parasite density).

Variable	n (%)	Cluster
Gender		
Male	35 (87.5)	I, II, III, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII
Female	5 (12.5)	I, II, III, VII, XI, XIII
Age group (years)		
< 40	15 (37.5)	I, II, III, IV, V, VI, VII
≥ 40	25 (62.5)	I, II, III, V, VI, VII, VIII, X, XI, XII, XIII
Nationality		
Thai	39 (97.5)	I, II, III, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII
Burmese	1 (2.5)	IV
Parasite density/1 µl of blood		
<10,000	26 (78.8)	I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, X, XI, XII, XIII
≥10,000	7 (21.2)	I, II, V, XIII

Table 2 Cluster of *P. knowlesi* and patients' residential area.

Cluster	Residential area (Province)	n (%)
I, II, III, VII, X, XI	Songkhla	10 (25.0)
I, V, VII, VIII, XIII	Chumphon	9 (22.5)
I, II, III, IV, IX, XIII	Trat	7 (17.5)
I, VII, X, XII, XIII	Ranong	5 (12.5)
I, II	Phangnga	3 (7.5)
III	Yala	1 (2.5)
XI	Satun	1 (2.5)
VI	Surat Thani	1 (2.5)
II	Chanthaburi	1 (2.5)
V	Uthai Thani	1 (2.5)
I	Ratchaburi	1 (2.5)

Table 3 Cluster of *P. knowlesi* and patients' occupations.

Cluster	Occupations	n (%)
I, II, III, IV, VII, IX, X, XI, XIII	Rubber plantations	21 (52.5)
I, II, V, VII, VIII, XIII	Orchards	8 (20.0)
I, II, XII	Employed	4 (10.0)
V	Soldiers/Police	1 (2.5)
V	Monks/Novices	1 (2.5)
X	Other farming	1 (2.5)
I, VI	Other	4 (10.0)

วิจารณ์

สรุปผลการศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการจัดจำแนกเชื้อ *P. knowlesi* ได้ 13 คลัสเตอร์และพบว่าไอโซเลท ซึ่งอยู่ในคลัสเตอร์ที่แบ่งตาม phylogenetic tree ของแต่ละพื้นที่ของเชื้อ *P. knowlesi* มาจาก 11 จังหวัดในประเทศไทย คลัสเตอร์ I (8 ไอโซเลท) แต่ละไอโซเลทเป็นยีนที่มีแหล่งที่มาจากหลายจังหวัดในภาคใต้ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย คลัสเตอร์ II (7 ไอโซเลท) III (3 ไอโซเลท) และ XIII (5 ไอโซเลท) เป็นยีนที่มีแหล่งที่มาจากคนละจังหวัดในภาคใต้และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย คลัสเตอร์ V (4 ไอโซเลท) เป็นยีนที่มีแหล่งที่มาจากคนละจังหวัดในภาคกลางและภาคใต้ของประเทศไทย ซึ่งเมื่อศึกษาจากประวัติการเดินทางของผู้ป่วยพบว่าผู้ป่วยในคลัสเตอร์ V มีการเดินทางไปจังหวัดชุมพรและกลับมาที่จังหวัดอุทัยธานี ซึ่งเป็นไปได้ว่าอาจมีการได้รับเชื้อ *P. knowlesi* ที่จังหวัดชุมพรและมาตรวจพบเชื้อที่โรงพยาบาลในจังหวัดอุทัยธานี จึงทำให้ยีนมีความคล้ายคลึงกันมากและจัดอยู่ในคลัสเตอร์เดียวกัน

คลัสเตอร์ VII (3 ไอโซเลท) X (3 ไอโซเลท) และ XI (2 ไอโซเลท) เป็นยีนที่มีความใกล้เคียงกันมาก และมีการระบาดจากพื้นที่หนึ่งไปยังอีกพื้นที่หนึ่งที่มีบริเวณติดต่อกันทางภาคใต้ของประเทศไทย คลัสเตอร์ IV, VI และ XII (1 ไอโซเลท) เป็นยีนที่พบเพียงจังหวัดเดียว

การศึกษาครั้งนี้พบเพศชายติดเชื้อ *P. knowlesi* มากกว่าเพศหญิง เนื่องจากการศึกษาที่ผ่านมา เพศชายมีอาชีพหรือกิจกรรมที่ต้องเข้าไปในป่ามากกว่าเพศหญิงซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในประเทศไทยของยุทธศิลป์ และคณะ ในปี ค.ศ. 2015⁽⁹⁾ การจำแนกกลุ่มตามอายุผู้ป่วยจำแนกเป็นกลุ่มอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 40 ปี ติดเชื้อ *P. knowlesi* มากกว่ากลุ่มอายุน้อยกว่า 40 ปี ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของยุทธศิลป์ และคณะ ในปี ค.ศ. 2015 พบว่าผู้ป่วยกลุ่มอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 45 ปี มีความเสี่ยงติดเชื้อมาลาเรียมากกว่าอายุน้อยกว่า 45 ปี เนื่องจากผู้ป่วยกลุ่มอายุนี้อาจมีอาชีพหรือกิจกรรมที่ต้องเข้าไปในป่าซึ่งมีโอกาสเสี่ยงในการติดเชื้อมาลาเรีย⁽⁹⁾ ในการศึกษาครั้งนี้พบผู้ป่วยติดเชื้อ *P. knowlesi* เป็นผู้ป่วยสัญชาติไทย 39 คน ติดเชื้อ *P. knowlesi*

มากกว่าสัณฐานวิทยาที่มี 1 คน ซึ่งไม่สามารถนำมาหา
นัยสำคัญทางสถิติระหว่างเชื้อชาติกับความหนาแน่น
ของเชื้อ (parasite density) ได้ สาเหตุเนื่องจากจำนวน
ตัวอย่างมีความแตกต่างกันมาก เช่นเดียวกับการศึกษา
ในประเทศไทยของฉวีพจน์ กำจร และ พิชัยณรงค์ ในปี
ค.ศ. 2004 เรื่องการติดเชื้อมาลาเรียในกลุ่มประชากร
อพยพตามแนวชายแดนไทย-เมียนมา ซึ่งผลการศึกษา
พบว่ากลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาส่วนใหญ่เป็นชาวไทยใหญ่
และชาวเมียนมาโดยพบว่าไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ
เนื่องจากจำนวนคนในกลุ่มตัวอย่างแตกต่างกันมาก⁽¹⁰⁾
การศึกษาปัจจัยทางอาชีพพบว่าตัวอย่างที่ใช้ศึกษา
ประกอบกิจกรรมต่าง ๆ ที่จำเป็นต้องเข้าไปในป่าเป็น
ส่วนใหญ่ ได้แก่ ทำสวนยาง (n = 21) ทำสวนผลไม้
(n = 8) อาชีพทหาร/ตำรวจ (n = 1) อาชีพพระ/
สามเณร (n = 1) อาชีพทำไร่อื่น ๆ (n = 1) ซึ่งกิจกรรม
ส่วนใหญ่พบว่าเป็นปัจจัยที่ทำให้มีความเสี่ยงติดเชื้อ
P. knowlesi ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ
Srichuen และ Pongsiri ในประเทศไทย ซึ่งพบว่า
ผู้ที่ติดเชื้อไข้มาลาเรียส่วนใหญ่ประกอบอาชีพที่ต้อง
นอนพักค้างคืนหรือเข้าไปในป่ามีความสัมพันธ์กับการ
ติดเชื้อไข้มาลาเรีย^(11, 12) การหาความสัมพันธ์ระหว่าง
ข้อมูลของผู้ป่วยกับความหนาแน่นของเชื้อ มีผู้ป่วยที่
มีข้อมูลความหนาแน่นของเชื้อ จำนวนทั้งหมด 33 คน
โดยแบ่งเป็นกลุ่มผู้ป่วยที่มีความหนาแน่นของเชื้อในเลือด
น้อยกว่า 10,000 ต่อไมโครลิตร (n = 26) และ
พบกลุ่มผู้ป่วยที่มีความหนาแน่นของเชื้อในเลือด
มากกว่าหรือเท่ากับ 10,000 ต่อไมโครลิตร (n = 7)
ซึ่งอยู่ในคลัสเตอร์ I, II, V และ XIII

ผลการทำ phylogenetic tree ของเชื้อ *P. knowlesi* โดยใช้ยีน *cox1* เป็นยีนเป้าหมายเทียบกับข้อมูลจาก GenBank พบว่า *cox1* จากการศึกษา
มีความคล้ายคลึงกับ Accession number
KT900795.1 Peninsular Malaysia และ
KT900794.1 Peninsular Malaysia และเมื่อนำมา

เทียบกับตัวอย่างจากการศึกษาของ Fong และคณะ
ในปี ค.ศ. 2010 จัดกลุ่มได้ 12 คลัสเตอร์
พบคลัสเตอร์ใหม่ในประเทศไทยซึ่งมาจากภาคใต้
ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงของประเทศไทย
คลัสเตอร์ III เป็นตัวอย่างจากจังหวัดสงขลาและ
จังหวัดสตูลมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายคลึงกับเชื้อ
P. knowlesi ในบริเวณเพนินซูลา ประเทศ
มาเลเซีย⁽⁶⁾ สำหรับคลัสเตอร์ I, II และ VII-X คือ
คลัสเตอร์ที่พบใหม่ในประเทศไทย และคลัสเตอร์
XII ตัวอย่างจากภาคใต้ในประเทศไทยคือ จังหวัด
ชุมพร ระนอง และภาคตะวันออกเฉียงคือ จังหวัดตราด
มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายคลึงกับบริเวณเพนินซูลา
มาเลเซีย (KT900794.1 Peninsular Malaysia)
ลำดับของนิวคลีโอไทด์ของยีน *cox1* ในแต่ละ
คลัสเตอร์มีความใกล้เคียงกันมากทางด้านพันธุศาสตร์
และบางคลัสเตอร์มีลักษณะคล้ายคลึงกับยีน *cox1*
ของเชื้อ *P. knowlesi* ที่มาจากประเทศมาเลเซีย ซึ่ง
สอดคล้องกับรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ในประเทศไทย
ที่พบเชื้อ *P. knowlesi* ในทางภาคใต้และภาค
ตะวันออกเฉียงของประเทศไทยโดยเฉพาะชายแดนไทย-
มาเลเซีย^(3, 13-16)

ในการวิจัยนี้ พบเชื้อ *P. knowlesi*
บางไอโซเลท มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cox1*
ใกล้เคียงกับ *P. knowlesi* ที่มาจากประเทศมาเลเซีย
และสอดคล้องกับการศึกษาของ Fong และคณะ ซึ่ง
รายงานว่ายีน *cox1* เหมาะสมสำหรับที่จะนำมา
ศึกษา phylogenetic ของเชื้อ *P. knowlesi*
และสามารถแยกความแตกต่างของที่มาของเชื้อ *P. knowlesi*
ในแต่ละพื้นที่ได้⁽⁶⁾ เช่นเดียวกับงานวิจัย
ของ Loh และคณะ ที่ได้มีการนำยีน *cox1* มาใช้
ในการแบ่งกลุ่มของ *P. knowlesi* โดยสามารถแบ่งได้
เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ ประเทศสิงคโปร์ ราชอาณาจักร
ประเทศมาเลเซีย และประเทศไทยโดยใช้การวิเคราะห์
ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *cox1*⁽⁷⁾

สำหรับงานวิจัยนี้ พบแหล่งที่มาของเชื้อ *P. knowlesi* มาจากภาคใต้เป็นส่วนใหญ่ (n = 25) ได้แก่ จังหวัดชุมพร พังงา ยะลา สตูล ระนอง สงขลา และสุราษฎร์ธานี มากกว่าจังหวัดทางภาคอื่น ๆ ในประเทศไทย (n = 8) ได้แก่ จังหวัดจันทบุรี ตราด ราชบุรี และอุทัยธานี ซึ่งจังหวัดสตูล สงขลา ยะลา นราธิวาส เป็นจังหวัดชายแดนไทย-มาเลเซีย พบผู้ป่วยติดเชื้อ *P. knowlesi* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sugaram และคณะ ในปี ค.ศ. 2021 ที่พบการติดเชื้อ *P. knowlesi* ในผู้ป่วยที่เดินทางกลับจากประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และพบรายงานการติดเชื้อ *P. knowlesi* ส่วนใหญ่ในบริเวณเกาะบอร์เนียว ประเทศมาเลเซียและการเกิดคลัสเตอร์ *P. knowlesi* น่าจะเกิดมาจากการติดต่อจากลิงแสม ลิงคนและยุงก้นปล่องเป็นพาหะนำโรค⁽¹⁵⁾ และการติดเชื้อ *P. knowlesi* อาจเกิดจากการอพยพโยกย้ายถิ่นฐานของคน การเดินทางหรือโยกย้ายถิ่นฐานของคนสามารถนำเชื้อ *P. knowlesi* จากแหล่งหนึ่งไปสู่อีกแหล่งหนึ่งได้ สำหรับงานวิจัยครั้งนี้ ในหลายคลัสเตอร์ที่มีเชื้อ *P. knowlesi* มาจากผู้ป่วยคนละจังหวัดกัน โดยงานวิจัยนี้ยังขาดข้อมูลการเดินทางหรือการเคลื่อนย้ายที่อยู่ของผู้ป่วย ทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างของที่มาของเชื้อ *P. knowlesi* ในแต่ละพื้นที่ได้อย่างชัดเจน ยกเว้นคลัสเตอร์ V ที่ผู้ป่วยสามรายอยู่ในจังหวัดชุมพร ส่วนอีกหนึ่งรายอยู่ในจังหวัดอุทัยธานี แต่มีประวัติเคยเดินทางไปจังหวัดชุมพร ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่า เชื้อในคลัสเตอร์นี้มาจากจังหวัดชุมพรทั้งหมด จึงมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cox1* ใกล้เคียงกัน

จากผลการศึกษาี้ ควรมีการเฝ้าระวังกลุ่มเสี่ยงคือประชากรไทยเพศชายอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 40 ปี โดยเฉพาะในจังหวัด 11 จังหวัดในประเทศไทย ได้แก่ สงขลา ชุมพร ระนอง พังงา ยะลา สตูล สุราษฎร์ธานี ตราด จันทบุรี อุทัยธานี และราชบุรี

ที่มีอาชีพหรือกิจกรรมที่ต้องเข้าไปในป่า ได้แก่ อาชีพทำสวนยาง ทำสวนผลไม้ ทหาร/ตำรวจ พระ/สามเณร และทำไร่อื่น ๆ ซึ่งได้มีการเข้าป่าแล้วอาจขาดการป้องกันตัวเองที่ถูกต้อง ดังนั้นควรจัดกิจกรรมให้ความรู้เรื่องการป้องกันไม่ให้ติดเชื้อมาลาเรีย เมื่อมีความจำเป็นในการเข้าไปสู่พื้นที่เสี่ยงควรมีอุปกรณ์ป้องกันตนเอง เช่น ยากันยุง การใส่เสื้อผ้าให้มิดชิด เพื่อนำไปสู่การลดอัตราป่วยจากโรคมาลาเรียต่อไป กลุ่มผู้ป่วยที่มีความหนาแน่นของเชื้อในเลือดมากกว่าหรือเท่ากับ 10,000 ต่อไมโครลิตร ควรได้รับการรักษาอย่างทันท่วงที เนื่องจากค่าความหนาแน่นของเชื้อในเลือดมากกว่า 10,000 ต่อไมโครลิตร จะส่งผลทำให้เกิดภาวะโลหิตจางรุนแรง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Phillips และคณะ ในขณะที่มี parasitemia มากกว่า 10,000 ต่อไมโครลิตร ทำให้เกิดภาวะโลหิตจางรุนแรงซึ่งมักพบได้บ่อยในผู้ป่วยมาลาเรียที่มีอาการรุนแรง⁽¹⁷⁾

ในการศึกษาเพิ่มเติมต้องเก็บตัวอย่างเชื้อ *P. knowlesi* จากหลาย ๆ บริเวณและกำหนดข้อมูลของผู้ป่วยที่จะทำการบันทึกเพื่อนำมาศึกษาหาความสัมพันธ์กับคลัสเตอร์ของเชื้อ *P. knowlesi* ที่แบ่งโดย phylogenetic tree และควรกำหนดการเก็บตัวอย่างระหว่างเพศชายและเพศหญิงให้เท่ากันเพื่อประโยชน์ในทางสถิติต่อไป ซึ่งข้อจำกัดของงานวิจัยนี้คือการใช้ตัวอย่างที่เหลือจากงานประจำของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. knowlesi* ทำให้ไม่สามารถกำหนดเกณฑ์ในการเลือกผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. knowlesi* เช่น เพศ กลุ่มอายุ เชื้อชาติ ทำให้ไม่สามารถคำนวณทางสถิติไม่ได้ รวมทั้งยังขาดข้อมูลการตรวจทางห้องปฏิบัติการอื่น ๆ เช่น การตรวจ complete blood count การตรวจทางเคมีคลินิก อาการของผู้ป่วย ความหนาแน่นของเชื้อ จึงไม่สามารถหาความสัมพันธ์ว่าเชื้อคลัสเตอร์ใดมีความสัมพันธ์ในการทำให้เกิดอาการรุนแรงแก่ผู้ป่วยมากกว่าเชื้อคลัสเตอร์อื่น

สรุป

ผลการทำ phylogenetic tree ของยีน *cox1* ของเชื้อ *P. knowlesi* ร่วมกับข้อมูลของผู้ป่วยมีประโยชน์ต่องานทางด้านสาธารณสุขเป็นอย่างมากโดยเฉพาะทางด้านระบาดวิทยาระดับโมเลกุลซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากในการวางแผนควบคุมกำจัดโรคมาลาเรียในประเทศไทยและการระบาดของเชื้อจากแหล่งหนึ่งไปสู่อีกแหล่งหนึ่งได้ และควรมีการเฝ้าระวังกลุ่มเสี่ยงคือประชากรไทยเพศชายอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 40 ปี โดยเฉพาะในจังหวัด 11 จังหวัดในประเทศไทย ในกลุ่มผู้ที่มียาเสพติด หรือกิจกรรมที่ต้องเข้าไปในป่า ได้แก่ อาชีพทำสวนยาง ทำสวนผลไม้ ทหาร/ตำรวจ พระ/สามเณร และทำไร่ เป็นต้น รวมถึงจัดกิจกรรมให้ความรู้เรื่องการป้องกันและเฝ้าระวังไม่ให้ติดเชื้อมาลาเรียที่เหมาะสมในแต่ละพื้นที่ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนวิจัยประเภททุนวิจัยทั่วไป กองทุนวิจัยคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปี 2565 ผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้อำนวยการกองโรคติดต่อฯ โดยแมลง หัวหน้าศูนย์และเจ้าหน้าที่ศูนย์อ้างอิงทางห้องปฏิบัติการโรคติดต่อฯ โดยแมลง กรมควบคุมโรค ซึ่งได้อนุญาตให้ใช้ตัวอย่างที่เหลือจากงานประจำมาทำวิจัย และให้ใช้สถานที่ห้องปฏิบัติการอนุชีวโมเลกุลในครั้งนี้ และประสานงานในการช่วยเก็บตัวอย่างทำวิทยานิพนธ์ พร้อมทั้งข้อมูลของผู้ป่วย รวมทั้งภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และขอขอบคุณ คุณณัฐฉา พิรมดา ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาด้านการใช้สถิติในการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria. 3rd ed. Italy: World Health Organization; 2012.
2. World Health Organization. Management of severe malaria: a practical handbook. 3rd ed. Geneva: World Health Organization; 2012.
3. Putaporntip C, Hongsrimuang T, Seethamchai S, et al. Differential prevalence of *Plasmodium* infections and cryptic *Plasmodium knowlesi* malaria in humans in Thailand. J Infect Dis 2009; 199: 1143-50.
4. Sermwittayawong N, Singh B, Nishibuchi M, Sawangjaroen N, Vuddhakul V. Human *Plasmodium knowlesi* infection in Ranong province, southwestern border of Thailand. Malar J 2012; 11: 36.
5. Lertprom R, Kanchanasuwan J, Ketkaew J, et al. The first *Plasmodium knowlesi*, Saraburi Province. June 2017. WESR Wkly Epidemiol Surv Rep 2017; 48: 801-8.
6. Fong MY, Lau YL, Chin LC, Al-Mekhlafi AM. Sequence analysis on the mitochondrial *cox1* gene of recent clinical isolates of *Plasmodium knowlesi* in Klang valley, peninsular Malaysia. Trop Biomed 2011; 28: 457-63.
7. Loh JP, Gao QH, Lee VJ, Tetteh K, Drakeley C. Utility of *cox1* phylogenetics to differentiate between locally acquired and imported *Plasmodium knowlesi* infections in Singapore. Singapore Med J 2016; 57: 686.

8. De JA, Kadir KA, Mohamad DS, *et al.* New vectors in northern Sarawak, Malaysian Borneo, for the zoonotic malaria parasite, *Plasmodium knowlesi*. *Parasit Vectors* 2020; 13: 472.
9. Kumbancha Y, Jirapornku C, Tungsrihong N. Factors in association with malaria infection in Phu Phan district, Sakon Nakhon province, Thailand. *KKU Journal for Public Health Research* 2015; 8: 57-64.
10. Chaveepojkamjorn W, Pichainarong N. Malaria infection among the migrant population along the Thai-myanmar border area. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2004; 35: 48-52.
11. Pongsiri K. Factors related to malaria infection among people in border communities in Mae Sariang district, Mae Hong Son province. *Dis Control J* 2021; 47: 678-86.
12. Srichuen R. Risk factors of malaria infection in Thai-Myanmar border Ranong Province, Thailand (dissertation). Khon Kaen: Khon Kaen University; 2005. 125 p.
13. Sermwittayawong N, Singh B, Nishibuchi M, Sawangjaroen N, Vuddhakul V. Human *Plasmodium knowlesi* infection in Ranong province, southwestern border of Thailand. *Malar J* 2012; 11: 36.
14. Jongwutiwes S, Buppan P, Kosuvin R, *et al.* *Plasmodium knowlesi* malaria in humans and macaques, Thailand. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 1799.
15. Sugaram R, Boondej P, Srisutham S, *et al.* Genetic population of *Plasmodium knowlesi* during pre-malaria elimination in Thailand. *Malaria J* 2021; 20: 1-8.
16. Ngerenna S, Rachaphaew N, Thammaphalo S, Prikchoo P, Kaewnah O, Manopwisedjaroen K. Case report: case series of human *Plasmodium knowlesi* infection on the Southern border of Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 2019; 101: 1397-401.
17. Phillips RE, Looareesuwan S, Warrell DA, *et al.* The importance of anemia in cerebral and uncomplicated *falciparum* malaria: role of complications, dyserythropoiesis and iron sequestration. *Q J Med* 1986; 58: 305-23.

Identification of SARS-CoV-2 variants using Next Generation Sequencing at Bamrasnaradura Infectious Diseases Institute

Sumonmal Uttayamakul^{*1}, Kornkanok Prasertsom¹, Visal Moolasart²
Weerawat Manosuthi² and Kitpong Sunchatawirul²

¹*National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Ministry of
Public Health, Nonthaburi Province, Thailand*

²*Bamrasnaradura Infectious Diseases Institute, Department of Disease Control,
Ministry of Public Health, Nonthaburi Province, Thailand*

Abstract

Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) genome analysis using next-generation sequencing (NGS) is an important tool to study epidemiology and vaccine efficacy evaluations. According to WHO recommendations in 2021, this technique can be used for SARS-CoV-2 variants monitoring. This study aims to identify SARS-CoV-2 variants by using NGS techniques from nasopharyngeal/throat swab specimen of COVID-19 patients in routine service at Bamrasnaradura Infectious Diseases Institute, Thailand during June 2021 to March 2022. A total of 135 specimens were extracted for total nucleic acid extraction with an automated machine. Library preparation and genome sequencing were done by using Ion AmpliSeqTM and the Ion torrent GeneStudioTM S5 system. SARS-CoV-2 Insight Research Plug-in Package and SARS-CoV-2 lineage Plug-in for Torrent Suite Software were used for data analysis. The samples consisted of 50 males and 85 females with a median age of 33 years (range from 6 months to 86 years). The results of the SARS-CoV-2 variants showed the Omicron, Delta, and Alpha strain in 89 (65.93%), 40 (29.63%), and 6 (4.44%) samples. The most prevalence of SARS-CoV-2 strains detected from January to March 2022 was Omicron BA.1 and BA.2, which began to spread in Thailand. The results of this study can provide information on the epidemiology of COVID-19 and monitor the virus evolution, for further implement in evaluation of vaccines effectiveness and therapeutic medicine.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, NGS, variant, Thailand

*Corresponding author E-mail address: sumonmal@health.moph.go.th

การจำแนกหัตถ์พันธุกรรมของเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยเทคนิค Next Generation Sequencing ที่สถาบันบำราศนราดูร

สุมนมัลย์ อุทัยมกุล^{*1} กรกนก ประเสริฐสม¹ วิศัลย์ มูลศาสตร์²
วีรวัฒน์ มโนสุทธิ² และ กิตติพงษ์ สัตยชาติวิรุฬห์²

¹สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี

²สถาบันบำราศนราดูร กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี

บทคัดย่อ

การตรวจวิเคราะห์หัตถ์พันธุกรรมของเชื้อ Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) ด้วยเทคนิค next-generation sequencing (NGS) มีความสำคัญในการศึกษาด้านระบาดวิทยาและการประเมินประสิทธิภาพของวัคซีน คำแนะนำองค์การอนามัยโลก ปี พ.ศ. 2564 ระบุให้ใช้เทคนิคนี้ในการติดตามการเปลี่ยนแปลงของสายพันธุ์เชื้อ SARS-CoV-2 ได้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยเทคนิค NGS จากสิ่งส่งตรวจ nasopharyngeal/throat swab ของผู้ป่วยโรคโควิด 19 ในงานประจำวันของสถาบันบำราศนราดูร ประเทศไทย ระหว่างเดือนมิถุนายน 2564 ถึงเดือนมีนาคม 2565 จำนวน 135 ตัวอย่าง วิธีการศึกษาประกอบด้วยการสกัดสารพันธุกรรมจากสิ่งส่งตรวจด้วยเครื่องอัตโนมัติ การถอดรหัสพันธุกรรมด้วยวิธี Ion AmpliSeqTM กับระบบ Ion torrent GeneStudioTM S5 และการวิเคราะห์ SARS-CoV-2 lineage โดยใช้โปรแกรม SARS-CoV-2 Insight Research Plug-in Package และ Torrent Suite กลุ่มตัวอย่างเป็นเพศชายจำนวน 50 ราย เพศหญิงจำนวน 85 ราย ค่ามัธยฐานของอายุ คือ 33 ปี (ช่วงอายุ 6 เดือนถึง 86 ปี) ผลการตรวจหัตถ์พันธุกรรมพบเชื้อ SARS-CoV-2 สายพันธุ์ Omicron จำนวน 89 ราย (ร้อยละ 65.93) สายพันธุ์ Delta จำนวน 40 ราย (ร้อยละ 29.63) และสายพันธุ์ Alpha จำนวน 6 ราย (ร้อยละ 4.44) ความชุกของสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ที่ตรวจพบในช่วงเดือนมกราคมถึงมีนาคม พ.ศ. 2565 ส่วนใหญ่เป็น Omicron BA.1 และ BA.2 ซึ่งเริ่มมีการระบาดในประเทศไทย ผลการศึกษานี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลด้านระบาดวิทยาของโรคโควิด 19 และติดตามวิวัฒนาการของเชื้อไวรัสเพื่อประเมินประสิทธิภาพของวัคซีนและยารักษาโรคต่อไป

คำสำคัญ: โควิด 19, SARS-CoV-2, NGS, สายพันธุ์, ประเทศไทย

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: sumonmal@health.moph.go.th

รับบทความ: 22 สิงหาคม 2566

แก้ไขบทความ: 19 ธันวาคม 2566

รับตีพิมพ์บทความ: 21 ธันวาคม 2566

บทนำ

รายงานของโรคที่ก่อให้เกิดอาการทางเดินหายใจเฉียบพลันรุนแรงเริ่มมีรายงานช่วงปลายปี พ.ศ. 2562 ที่ประเทศจีน ต่อมาเรียกโรคนี้ว่าโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (โควิด 19) หรือ Corona Virus Disease 2019 (COVID-19) ซึ่งแพร่ระบาดเป็นวงกว้างจนกลายเป็นวิกฤตด้านสาธารณสุขทั่วโลก โดยมีสาเหตุจากเชื้อ Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2)⁽¹⁾ ผลการวิเคราะห์ทางอนุชีววิทยาแสดงให้เห็นว่าเชื้อมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และมีการกลายพันธุ์ทำให้เกิดสายพันธุ์ใหม่อยู่ตลอดเวลา การเกิดสายพันธุ์ใหม่นี้อาจส่งผลกระทบต่ออาการแสดงทางคลินิกของผู้ติดเชื้อ ความสามารถในการแพร่กระจายเชื้อ การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ และประสิทธิภาพของการใช้วัคซีนได้⁽²⁾ จากข้อมูลรหัสพันธุกรรมของเชื้อที่มีการระบาดในช่วงแรกเป็น clade L และ S⁽³⁾ โดยสายพันธุ์ที่พบในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2562 จะเป็น clade L (ตามระบบการจัดหมวดหมู่ของ GISAID clades)⁽⁴⁾ และในเดือนมกราคม พ.ศ. 2563 มีการตรวจพบการแทนที่กรดอะมิโน leucine ด้วย serine ที่ตำแหน่ง 84 ของยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีน ORF8 (L84S) ซึ่งจำแนกใหม่เป็น clade S ต่อมา มีรายงานการแทนที่กรดอะมิโนของยีน Nsp6 (L37F) และ ORF3 (G251V) ซึ่งจำแนกเป็น clade V ช่วงเวลานี้เชื้อได้แพร่กระจายไปยังหลายประเทศและมีรายงาน clade ใหม่ที่เรียกว่า clade G (P314L และ D614G) subclade GH (Q57H) และ GR (RG203KR) ในแถบอเมริกาเหนือและยุโรป⁽⁵⁾ ในเดือนกันยายน พ.ศ. 2563 มีรายงานการตรวจพบสายพันธุ์ใหม่ในสหราชอาณาจักร คือ lineage B.1.1.7 (ตามระบบการจัดหมวดหมู่ของ Pangolin lineages)⁽⁶⁾ ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสหลายจุดบน spike gene โดยพบการขาดหายไปของ

กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 69-70 และตำแหน่งที่ 144 และการเปลี่ยนกรดอะมิโน ณ ตำแหน่งอื่น ๆ เช่น N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A และ D1118H^(7,8) ต่อมา มีรายงานการกลายพันธุ์ของสายพันธุ์ B.1.1.7 และ B.1.351 ในแอฟริกาใต้ ซึ่งการกลายพันธุ์นี้คล้ายกับ B.1.1.7 ยกเว้นไม่พบการขาดหายไปของกรดอะมิโนในตำแหน่ง 69-70⁽⁹⁾ การกลายพันธุ์อีกแบบซึ่งพบในประเทศญี่ปุ่นจากนักเดินทางชาวบราซิล คือ สายพันธุ์ lineage P.1 ที่มีการกลายพันธุ์ที่บริเวณ K417T, E484K และ N501Y ของ spike gene⁽¹⁰⁾ ซึ่งภายหลังองค์การอนามัยโลก (World Health Organization; WHO) เปลี่ยนระบบการเรียกชื่อของสายพันธุ์ตามตัวอักษรกรีกเพื่อให้ง่ายต่อการระบุชื่อ โดยกำหนดให้สายพันธุ์ Alpha, Beta, Delta และ Omicron เป็นสายพันธุ์ที่ต้องเฝ้าระวัง (Variant of Concerns; VOCs)⁽¹¹⁾

สำหรับสถานการณ์การแพร่ระบาดของเชื้อ SARS-CoV-2 ในประเทศไทย พบผู้ติดเชื้อรายแรกเมื่อวันที่ 12 มกราคม พ.ศ. 2563⁽¹²⁾ ซึ่งในช่วงแรกพบการติดเชื้อเฉพาะผู้ที่เดินทางมาจากต่างประเทศ จากนั้นจึงเกิดการแพร่ระบาดภายในประเทศ โดยสายพันธุ์ดั้งเดิมที่ระบาดในช่วงปี 2563 คือ สายพันธุ์ lineage A.6 (clade S) ก่อนที่จะพบสายพันธุ์ lineage B.1.36 (clade G) ที่มาจากประเทศเมียนมา และได้ระบาดในประเทศไทยเมื่อต้นปี พ.ศ. 2564 นอกจากนี้ ยังพบการรายงานของสายพันธุ์อื่น ๆ เพิ่มเติมอีก เช่น สายพันธุ์ Alpha, Beta, Delta และ Omicron เป็นต้น⁽¹³⁾ จากข้อมูลตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2563 พบผู้ป่วยโรคโควิด 19 ในประเทศไทยจำนวน 2 รายที่รายงานลำดับเบสของสารพันธุกรรมในฐานข้อมูล GISAID จนกระทั่ง 30 เมษายน พ.ศ. 2563 มีรายงานผู้ติดเชื้อเพิ่มขึ้นเป็น 2,444 ราย ซึ่งช่วงเดือนพฤษภาคมถึงสิงหาคม พ.ศ. 2563 ยังไม่มีรายงานการระบาดในประเทศไทย หลังจากเดือน

สิงหาคม พ.ศ. 2563 จึงพบรายงานการแพร่ระบาดจนถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2563⁽¹⁴⁾ รายงานต่อมาในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2563 ถึงปลายเดือนมกราคม พ.ศ. 2564 พบการระบาดในพื้นที่จังหวัดสมุทรสาคร โดยพบเป็นสายพันธุ์ subclade GH⁽¹⁵⁾ และช่วงต้นเดือนเมษายน พ.ศ. 2564 เกิดการระบาดตามสถานบันเทิงย่านทองหล่อในกรุงเทพมหานคร การระบาดระลอกนี้ได้แพร่กระจายไปทั่วประเทศ⁽¹⁶⁾ สายพันธุ์ที่พบในสถานบันเทิงครั้งนี้ คือ สายพันธุ์ B.1.1.7 ซึ่งคล้ายกับสายพันธุ์ที่พบในสหราชอาณาจักร โดยอาจแพร่มาจากประเทศกัมพูชา สายพันธุ์นี้สามารถแพร่ได้เร็วกว่าสายพันธุ์ปกติถึง 1.7 เท่า ส่งผลให้มีผู้ป่วยโควิด 19 จำนวนมากในแต่ละวัน⁽¹⁷⁾ โดยการกลายพันธุ์ที่กรดอะมิโนใน spike gene ตำแหน่งที่ 614 จาก aspartic เป็น glycine (D614G) ส่งผลให้เชื้อใช้ spike protein เกาะติดกับผนังเซลล์ชนิด angiotensin converting enzyme 2 (ACE-2) ได้ดีขึ้น จึงทำให้มีความสามารถในการติดเชื่อเพิ่มขึ้น⁽¹⁷⁾ ความสามารถในการติดเชื่อประกอบกับการแพร่ระบาดของเชื้อ SARS-CoV-2 ขึ้นกับพื้นที่และมีการติดเชื่อแบบไม่แสดงอาการทำให้เกิดการแพร่ระบาดไปทั่วโลก⁽¹⁸⁾ ในเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2564 ประเทศไทยพบการระบาดของสายพันธุ์ Delta หรือสายพันธุ์อินเดียแถบบ้านพักคนงาน เขตหลักสี่ กรุงเทพมหานคร⁽¹⁹⁾ ซึ่งมีความสามารถในการแพร่เชื่อได้มากกว่าสายพันธุ์ Alpha ถึงร้อยละ 50 และเกิดการติดเชื่อแบบกลุ่มก้อน ซึ่งเป็นสาเหตุของอัตราการป่วยและตายสูง⁽²⁰⁾ ช่วงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2564 เริ่มมีรายงานการระบาดของสายพันธุ์ Omicron⁽²¹⁾ และกลายเป็นสายพันธุ์หลักที่มีการระบาดจนถึงปัจจุบัน เนื่องจากข้อมูลการกระจายของสายพันธุ์เชื้อ SARS-CoV-2 ในพื้นที่จังหวัดนนทบุรียังมีจำกัด การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของรหัสพันธุกรรมหรือ

สายพันธุ์ของเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยเทคนิค NGS ในงานประจำวัน ที่สถาบันบำราศนราดูร ประเทศไทย เพื่อใช้เป็นข้อมูลด้านระบาดวิทยาของสายพันธุ์เชื้อ SARS-CoV-2 สำหรับวางแผนงานเฝ้าระวัง ป้องกันควบคุมโรคต่อไป

วิธีการศึกษา

ตัวอย่างที่ศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาเป็นสวอป (swab) สิ่งส่งตรวจจากบริเวณหลังโพรงจมูก (nasopharyngeal swabs) ที่บรรจุอยู่ใน Viral Transport Media (VTM) ซึ่งตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real-time reverse transcription polymerase chain reaction (real-time RT-PCR) ที่สถาบันบำราศนราดูร ประเทศไทย ช่วงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2564 ถึง มีนาคม พ.ศ. 2565 โดยคัดเลือกตัวอย่างจากค่า cycle threshold (Ct) ที่ให้ค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 25 พบว่ามีตัวอย่างที่เข้าเกณฑ์ทั้งสิ้น 135 ตัวอย่างและบันทึกข้อมูลของตัวอย่างที่นำมาตรวจ เช่น เพศ อายุ และค่า Ct ของตัวอย่าง

วัสดุอุปกรณ์

ชุดน้ำยาสกัดสารพันธุกรรมของกรดนิวคลีอิกชนิดอัตโนมัติ รุ่น MagNA Pure 24 (Roche, Germany) และชุดน้ำยา Ion Torrent Next-Generation Sequencing (NGS) platform (Thermo Fisher Scientific, USA) โดยแบ่งเป็นน้ำยาสำหรับเตรียม DNA Library ใช้กับเครื่อง Ion ChefTM Instrument (Thermo Fisher Scientific, USA) สำหรับเตรียม DNA Library อัตโนมัติ และน้ำยาสำหรับถอดรหัสพันธุกรรมใช้กับเครื่องวิเคราะห์รหัสพันธุกรรม Ion GeneStudioTM S5 (Thermo Fisher Scientific, USA)

ขั้นตอนการศึกษา

การศึกษานี้เริ่มต้นด้วยที่ตรวจวินิจฉัยหาสารพันธุกรรมของเชื้อ SARS-CoV-2 ในผู้ป่วยที่ตรวจพบโควิด 19 ด้วยวิธี real-time RT-PCR โดยมีค่า Ct น้อยกว่าหรือเท่ากับ 25 รอบ เพื่อให้มีปริมาณไวรัสเพียงพอสำหรับการถอดรหัสพันธุกรรมแบบทั้งเส้น (whole genome sequencing) ตามแนวทางในเอกสารแนะนำของ Ion AmpliSeqTM SARS-CoV-2 Insight Research Assay⁽²²⁾ สำหรับการระบุ copy number determination ขั้นตอนการเตรียม library ของตัวอย่างที่มีค่า Ct เป็น 3 แบบ ได้แก่ low, medium และ high โดยระบุช่วงค่า Ct ในแต่ละยีนของวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ SARS-CoV-2 ด้วยวิธี real-time RT-PCR ที่สถาบันบำราศนราดูร โดยใช้น้ำยา Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real PCR kit (Jiangsu Biopurfectus technologies, China) หรือตรวจด้วยน้ำยา COBAS SARS-CoV-2 (Roche, Germany) ชนิดเครื่องอัตโนมัติ กรณีที่มีค่า Ct น้อยกว่าหรือเท่ากับ 25 จะทำให้สามารถได้ผลการถอดรหัสพันธุกรรมได้ครอบคลุมทั้งเส้น

การสกัดสารพันธุกรรมจากสิ่งส่งตรวจปริมาณ 500 ไมโครลิตร ทำโดยอาศัยหลักการ magnetic bead extraction โดยใช้เครื่องสกัดสารพันธุกรรมอัตโนมัติ (Roche, Germany) แล้วนำกรดนิวคลีอิกทั้งหมดที่สกัดได้มาเปลี่ยนจากสาย RNA ให้เป็น DNA ชนิด complimentary DNA (cDNA) ด้วยชุดน้ำยา Reverse Transcription Kit โดยใส่ในไมโครเพลตชนิด 96 หลุมที่มี Barcodes ติดฉลากอยู่ (Barcodes plate) และมาพร้อมกับชุดน้ำยา (Thermo Fisher Scientific, USA) ในการเตรียม DNA ต้นแบบ (DNA Library) เมื่อได้ DNA ต้นแบบแล้วนำมาตรวจวัดความเข้มข้นด้วยเครื่องวัดปริมาณชนิด

ฟลูออเรสเซนซ์ Qubit 4 fluorometer ซึ่งอาศัยหลักการเรืองแสงจากสีฟลูออเรสเซนซ์ที่เข้าไปจับกับโมเลกุลของสารพันธุกรรมชนิด DNA ที่ต้องการทราบปริมาณอย่างจำเพาะเจาะจง โดยใช้น้ำยา QubitTM 1X dsDNA High Sensitivity (HS) (Invitrogen, USA) หลังจากนั้น เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมในปริมาตร 25 ไมโครลิตร แล้วนำ DNA ต้นแบบที่เจือจางแล้วมาใช้เป็นแม่แบบในการเตรียม chip สำหรับการทำ sequencing ด้วยเครื่องเตรียม template อัตโนมัติ Ion ChefTM Instrument (Thermo Fisher Scientific, USA) โดยใช้ Ion 540 chip ที่เตรียมเสร็จแล้วจะถูกนำไปถอดรหัสพันธุกรรมด้วยเครื่อง Ion GeneStudioTM S5 (Thermo Fisher Scientific, USA)

การแปลผลรหัสพันธุกรรม

การแปลผลรหัสพันธุกรรมใช้โปรแกรมสำเร็จรูป ประกอบด้วย variantCaller และ SARS-CoV-2_coverage analysis โดยข้อมูล FASTA ที่ได้จะถูกนำไปแปลผลในฐานข้อมูลออนไลน์ Pangolin COVID-19 Lineage (<https://pangolin.cog-uk.io/>)⁽²³⁾ และ Nextclade (<https://clades.nextstrain.org/>)⁽²⁴⁾ หลังจากนั้น วิเคราะห์ผลการศึกษานี้แสดงด้วยสถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ ค่าร้อยละของข้อมูลสายพันธุ์ที่ตรวจพบในตัวอย่างทั้งหมด

ข้อพิจารณาทางจริยธรรม

การตรวจหาลักษณะเฉพาะทางโมเลกุลของเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ด้วยวิธี Next Generation Sequencing ในกลุ่มผู้ติดเชื้อ SARS-CoV-2 ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการพิจารณาโครงการวิจัย ของสถาบันบำราศนราดูร รหัสโครงการ S033h/63_ExPD

ผลการศึกษา

ตัวอย่างจากระบบทางเดินหายใจของผู้ติดเชื้อ SARS-CoV-2 ที่อยู่ในช่วงอายุ 6 เดือนถึง 88 ปี โดยมีค่ามัธยฐานเท่ากับ 33 ปี เป็นเพศชาย 50 ราย และเพศหญิง 85 ราย ดังแสดงใน Table 1

จากการศึกษาหัตถพันธุกรรมของเชื้อ SARS-CoV-2 ที่ตรวจพบในระยะเวลาศึกษา มี 3 สายพันธุ์ ได้แก่ Alpha, Delta และ Omicron ซึ่งจัดเป็นสายพันธุ์ที่นำกังวล (VOC) โดยสายพันธุ์ Alpha หรือ lineage B.1.1.7 ตรวจพบทั้งหมดจำนวน 6 ราย คิดเป็นร้อยละ 4.44 สายพันธุ์ Delta พบจำนวน 40 ราย คิดเป็นร้อยละ 29.63 สายพันธุ์ Delta แบ่งเป็นสายพันธุ์ย่อย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ lineage AY.30 จำนวน 14 ราย (ร้อยละ 10.37) AY.79 จำนวน 1 ราย (ร้อยละ 0.74) และ AY.85 จำนวน 25 ราย (ร้อยละ 18.52) ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์ Omicron พบจำนวน 89 ราย คิดเป็นร้อยละ 65.93 โดยแบ่งเป็น lineage BA.1 จำนวน 53 ราย ประกอบด้วยสายพันธุ์ย่อย (sub-lineage) จำนวน 5 สายพันธุ์ คือ BA.1 จำนวน 8 ราย (ร้อยละ 5.93) BA.1.1 จำนวน 36 ราย (ร้อยละ 26.67) BA.1.16.1 จำนวน 1 ราย (ร้อยละ 0.74)

BA.1.17 จำนวน 7 ราย คิดเป็นร้อยละ 5.19 และ BA.1.17.2 จำนวน 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.74 และ lineage BA.2 จำนวน 36 ราย แบ่งเป็นสายพันธุ์ย่อยจำนวน 5 สายพันธุ์ คือ BA.2 จำนวน 6 ราย (ร้อยละ 4.44) BA.2.3 จำนวน 12 ราย (ร้อยละ 8.89) BA.2.9 จำนวน 9 ราย (ร้อยละ 6.67) BA.2.10 จำนวน 5 ราย (ร้อยละ 3.7) และ BA.2.10.1 จำนวน 4 ราย (ร้อยละ 2.96) ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 2

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลการกระจายตัวของสายพันธุ์ SARS-CoV-2 แบบร้อยละพบว่าในช่วงเดือนมิถุนายน กันยายน และตุลาคม พ.ศ. 2564 ตรวจพบสายพันธุ์ Delta ทั้งหมด (ร้อยละ 100) เดือนกรกฎาคมและสิงหาคม พ.ศ. 2564 ตรวจพบสายพันธุ์ Alpha ร้อยละ 36.36 และร้อยละ 40 ตามลำดับและในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2564 ตรวจพบสายพันธุ์ Omicron คิดเป็นร้อยละ 50 ของสายพันธุ์ที่ตรวจพบในเดือนนั้น ต่อมาในเดือนมกราคม พ.ศ. 2565 ถึง มีนาคม พ.ศ. 2565 พบการกระจายตัวของสายพันธุ์ Omicron เพิ่มขึ้นโดยแบ่งเป็นสายพันธุ์ย่อย BA.1 และ BA.2 ดังแสดงใน Fig. 1

Table 1 Demographic data of SARS-CoV-2-infected samples.

Age (year)	Sex (n)		Cycle threshold (Ct)*	Estimated viral copy number**
	Male	Female		
<10	12	8	13.20 - 23.34	Medium - High
10 - 19	5	2	13.70 - 23.57	Medium - High
20 - 29	7	20	14.65 - 24.30	Medium - High
30 - 39	8	19	14.40 - 23.30	Medium - High
40 - 49	6	17	15.40 - 23.10	Medium - High
50 - 59	7	10	13.10 - 25.26	Medium - High
60 - 69	3	3	15.46 - 22.30	Medium - High
70 - 79	1	5	13.20 - 24.60	Medium - High
>80	1	1	14.40 - 18.10	High
	50	85	13.10 - 25.26	Medium - High
Total	135			

*Cycle Threshold (Ct): The cycle threshold from SARS-CoV-2 detection by real-time RT-PCR. The less Ct represents the higher viral copy number.

**The estimated virus levels that are suitable for whole genome sequencing by Ion AmpliSeq™ NGS platform, recommended by the instruction manual of the reagent kit.⁽²²⁾

Table 2 The proportion of SARS-CoV-2 variant distribution during June 2021 to March 2022.
The SARS-CoV-2 variants were studied by using Ion AmpliSeq™ NGS platform.

SARS-CoV-2 variants and lineages		Number of Cases (%)	95% CI
Alpha	B.1.1.7	6 (4.44)	1.65-9.42
Delta	AY.30	14 (10.37)	5.79-16.79
	AY.79	1 (0.74)	0.19-4.06
	AY.85	25 (18.52)	12.36-26.11
	Total	40 (29.63)	22.08-38.09
Omicron	BA.1	8 (5.93)	2.59-11.34
	BA.1.1	36 (26.67)	19.43-34.96
	BA.1.16.1	1 (0.74)	0.19-4.06
	BA.1.17	7 (5.19)	2.11-10.39
	BA.1.17.2	1 (0.74)	0.19-4.06
	BA.2	6 (4.44)	1.65-9.42
	BA.2.3	12 (8.89)	4.68-15.01
	BA.2.9	9 (6.67)	3.09-12.28
	BA.2.10	5 (3.7)	1.21-8.43
	BA.2.10.1	4 (2.96)	0.81-7.41
	Total	89 (65.93)	57.28-73.86
Total		135 (100)	

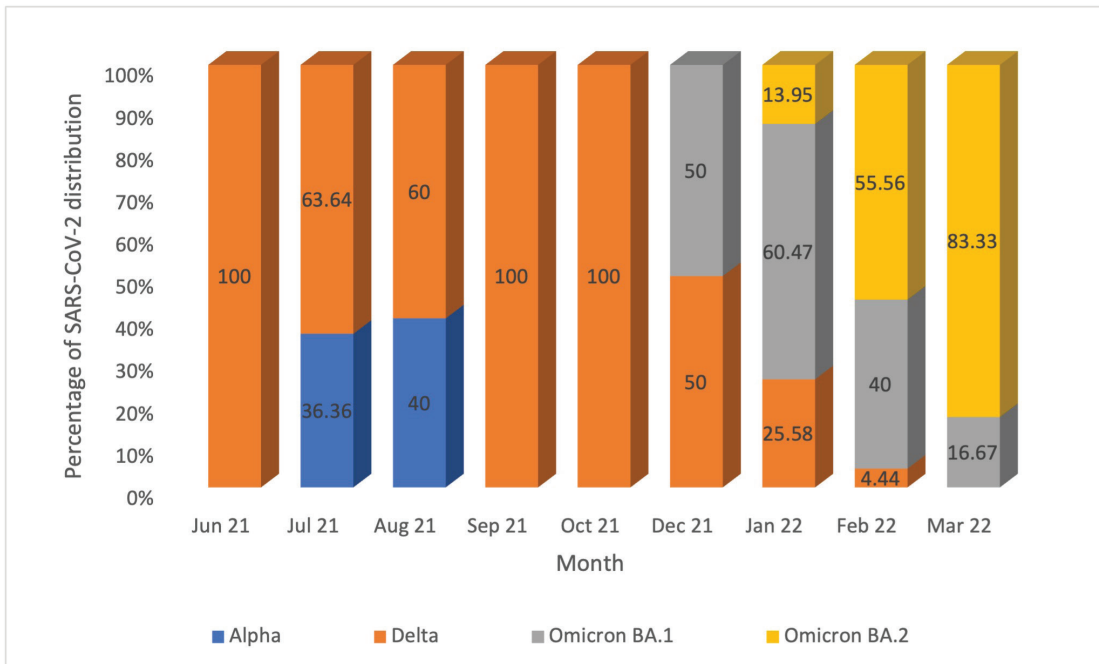


Fig. 1 Percentage of SARS-CoV-2 variant distribution at Bamrasnaradura Infectious Diseases Institute (June 2021 to March 2022). The SARS-CoV-2 variants were studied by using Ion GeneStudio™ S5 Next-Generation Sequencing.

อภิปรายผล

การคัดเลือกตัวอย่างมาใช้ในการถอดรหัสพันธุกรรมจากสิ่งส่งตรวจในงานประจำวันที่ผ่านมาขั้นตอนการทำ real-time RT-PCR และมีค่า Ct น้อยกว่าหรือเท่ากับ 25 ซึ่งมี viral copy number ประมาณ 50-1,500 เป็นเกณฑ์แนะนำขั้นต่ำในขั้นตอนการเตรียม library เพื่อให้ได้ผลการถอดรหัสทางพันธุกรรมแบบทั้งเส้น⁽²²⁾ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ilić M และคณะ⁽²⁵⁾ ที่ตรวจวิเคราะห์สายพันธุ์ SARS-CoV-2 โดยวิธี Ion AmpliSeq SARS-CoV-2 Insight Research Assay ด้วยเครื่อง Genexus Sequencer ในตัวอย่างที่มีจำนวน viral load ต่ำ (≤ 200 copies/ μ L) พบว่าสามารถถอดรหัสพันธุกรรมแบบทั้งเส้นได้สำเร็จร้อยละ 91 ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลรหัสพันธุกรรมของสายพันธุ์เชื้อ SARS-CoV-2 ในการศึกษาที่สถาบันบำราศนราดูร จังหวัดนนทบุรี ในช่วงเวลา 10 เดือนระหว่างมิถุนายน พ.ศ. 2564 ถึงมีนาคม พ.ศ. 2565 ตรวจพบ 3 สายพันธุ์ที่น่ากังวล (VOC) ได้แก่ Alpha, Delta และ Omicron เมื่อตรวจสอบการกระจายตัวของสายพันธุ์ SARS-CoV-2 แบบรายเดือนพบว่าสายพันธุ์ Delta เป็นสายพันธุ์หลักที่ตรวจพบในช่วงเดือนมิถุนายนถึงตุลาคม พ.ศ. 2564 สอดคล้องกับรายงานการแพร่ระบาดของสายพันธุ์ Delta ของประเทศไทย ซึ่งเริ่มระบาดตั้งแต่เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2564 และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว⁽¹⁹⁾ นอกจากนี้ยังมีการตรวจพบสายพันธุ์ Alpha บ้างเล็กน้อยในเดือนกรกฎาคมถึงสิงหาคม พ.ศ. 2564 โดยพบว่าสายพันธุ์ Alpha

เริ่มแพร่ระบาดช่วงเดือนเมษายน พ.ศ. 2564⁽¹⁶⁾ และจากรายงานขององค์การอนามัยโลก พบว่าการระบาดของสายพันธุ์ Alpha ลดลงในเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2564 จนเริ่มมีสายพันธุ์ Delta เพิ่มขึ้น⁽¹³⁾ ซึ่งการศึกษานี้ตรวจพบสายพันธุ์ Alpha ในเดือนกรกฎาคมถึงสิงหาคม พ.ศ. 2564 เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่นที่ตรวจพบในช่วงเวลาเดียวกันพบว่ามีส่วนน้อยกว่า สอดคล้องกับการรายงานความชุกของสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ในแอฟริกา ที่แสดงให้เห็นว่าช่วงเดือนมิถุนายนถึงตุลาคม พ.ศ. 2564 สายพันธุ์ที่ระบาดหลักในประเทศ คือ สายพันธุ์ Delta แต่ยังคงตรวจพบสายพันธุ์ Alpha และสายพันธุ์อื่นบ้างเล็กน้อย⁽²⁶⁾

นอกจากนี้ จากการศึกษาเพื่อติดตามความเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์ SARS-CoV-2 ในประเทศไทยของ Puenpa J และคณะ พบว่าเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2564 มีรายงานการตรวจพบทั้งสายพันธุ์ Alpha และ Delta โดยพบสัดส่วนของสายพันธุ์ Alpha มากกว่า Delta ในเดือนกรกฎาคมถึงสิงหาคม พ.ศ. 2564 พบสายพันธุ์ Alpha ลดลงแต่สายพันธุ์ Delta เพิ่มขึ้น และ เดือนกันยายน พ.ศ. 2564 ถึงพฤศจิกายน พ.ศ. 2564 เป็นสายพันธุ์ Delta ร้อยละ 100 เดือนธันวาคม พ.ศ. 2564 เริ่มมีการตรวจพบสายพันธุ์ Omicron BA.1 และตรวจพบเป็นสายพันธุ์หลักตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2565 ถึงมีนาคม พ.ศ. 2565 โดยเริ่มมีการตรวจพบสายพันธุ์ Omicron BA.2 ในเดือนมกราคม พ.ศ. 2565 ด้วย⁽¹⁵⁾ ซึ่งช่วงเวลาที่มีการรายงานสายพันธุ์ รวมถึงสัดส่วนสายพันธุ์ที่ตรวจพบมีความสอดคล้องกับการศึกษานี้ ยกเว้นเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2564 เนื่องจากตัวอย่างที่นำมาศึกษามีจำนวนน้อย จึงอาจส่งผลต่อสัดส่วนของสายพันธุ์ในช่วงเวลานั้นได้ จากการตรวจพบสายพันธุ์ Omicron ตั้งแต่เดือนธันวาคม พ.ศ. 2564 และมีรายงานการแพร่ระบาดของสายพันธุ์นี้ในประเทศไทย⁽²¹⁾ สอดคล้องกับ

ข้อมูลความชุกของสายพันธุ์ในแอฟริกาที่มีรายงานว่าเริ่มมีการระบาดของสายพันธุ์ Omicron ตั้งแต่เดือนธันวาคม พ.ศ. 2564 เป็นต้นมาเช่นเดียวกัน⁽²⁶⁾ ซึ่งเป็นไปในแนวทางเดียวกับการศึกษานี้ที่ตรวจพบสายพันธุ์ Omicron เป็นหลักในเดือนมกราคมถึงมีนาคม พ.ศ. 2565 โดยสายพันธุ์ Omicron ที่มีการระบาดช่วงแรก คือ สายพันธุ์ BA.1 ตรวจพบครั้งแรกในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2564 ส่วนสายพันธุ์ BA.2 เริ่มตรวจพบในเดือนมกราคม พ.ศ. 2565 และมีสัดส่วนเพิ่มมากขึ้นในเดือนกุมภาพันธ์ถึงมีนาคม พ.ศ. 2565 ดังนั้นผลการตรวจหาสายพันธุ์ของเชื้อ SARS-CoV-2 ที่สถาบันบำราศนราดูร จังหวัดนนทบุรี สอดคล้องกับการรายงานข้อมูลภาพรวมของการเฝ้าระวังสายพันธุ์เชื้อ SARS-CoV-2 ที่พบในประเทศไทยในช่วงเวลาเดียวกัน⁽²⁷⁾

เนื่องจากข้อจำกัดของปริมาณตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษารั้งนี้และภูมิสถานะของผู้ป่วยที่ส่วนใหญ่เป็นคนจังหวัดนนทบุรี ทำให้ข้อมูลหัตถพันธุกรรมที่ตรวจพบไม่หลากหลาย ถึงแม้ว่าสายพันธุ์ที่ตรวจพบจะมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันกับรายงานสายพันธุ์จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สัดส่วนของสายพันธุ์ที่ตรวจพบในแต่ละเดือนอาจมีการเปลี่ยนแปลงได้หากทำการศึกษาในปริมาณตัวอย่างที่มากกว่านี้ ซึ่งการถอดรหัสพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค NGS ของเชื้อ SARS-CoV-2 มีความสำคัญในการศึกษาวิวัฒนาการและเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงของสายพันธุ์เชื้อ ทำให้ทราบต้นกำเนิดและที่มาของเชื้อที่ระบาดในแต่ละช่วงเวลาสามารถนำไปเชื่อมโยงกับระบาดวิทยาโมเลกุลและนำข้อมูลไปใช้ประโยชน์สำหรับมาตรการป้องกันและควบคุมโรค รวมทั้งการคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมในการพัฒนาวัคซีนสำหรับประเทศไทย

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับทุนสนับสนุนจากศูนย์ความร่วมมือไทย-สหรัฐฯ ด้านสาธารณสุข ขอขอบคุณ ดร.พงษ์พันธ์ สวาสติวงศ์ และ Dr. Beth Skaggs และขอขอบคุณทีมงานห้องปฏิบัติการของสถาบันบำราศนราดูร กรมควบคุมโรค ที่มุ่งมั่น ทุ่มเทพปฏิบัติงานอย่างเต็มกำลังความสามารถด้วยความเสียสละในช่วงวิกฤตโควิด 19 และคุณกัลยภัตสร หัสเสน นักเทคนิคการแพทย์ในโครงการติดตามความเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์ของเชื้อ SARS-CoV-2 ที่สถาบันบำราศนราดูร

เอกสารอ้างอิง

- Hui DS, Azhar EI, Madani TA, *et al.* The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health-The latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China. *Int J Infect Dis* 2020; 91: 264-66.
- World Health Organization. [homepage on the Internet]. Clinical management of severe acute respiratory infection when novel coronavirus (2019-nCoV) infection is suspected.; c 2020-01 [cited 2022 Nov 21]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/10665-332299>
- Gong YN, Tsao KC, Hsiao MJ, *et al.* SARS-CoV-2 genomic surveillance in Taiwan revealed novel ORF8-deletion mutant and clade possibly associated with infections in Middle East. *Emerg Microbes Infect* 2020; 9: 1457-66.
- Mercatelli D, Giorgi, F. Geographic and genomic distribution of SARS-CoV-2 mutations. *Front Microbiol* 2020; 11: 1800.
- Hamed S, Elkhatab W, Khairalla A, Nored-din, A. Global dynamics of SARS-CoV-2 clades and their relation to COVID-19 epidemiology. *Sci Rep* 2021; 11: 8435.
- Galloway SE, Paul P, MacCannell DR, *et al.* Emergence of SARS-CoV-2 B.1.1.7 Lineage-United States, December 29, 2020 - January 12, 2021. *MMWR* 2021; 70: 95-9.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). [homepage on the Internet]. Science Brief: Emerging SARS-CoV-2 Variants.; c 2021-01 [cited 2022 Nov 21]. Available from: <https://public4.pagefreezer.com/browse/CDC20Covid20Pages/11-07-2022T12:28/https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/science/science-briefs/scientific-brief-emerging-variants.html>
- Letko M, Marzi A, Munster V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat Microbiol* 2020; 5: 562-9.
- Tegally H, Wilkinson E, Giovanetti M, *et al.* Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nature* 2021; 592: 438-43.

10. Faria NR, Mellan TA, Whittaker C, *et al.* Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *Science* 2021; 372: 815-21.
11. World Health Organization. [homepage on the Internet]. Tracking SARS-CoV-2 variants.; c 2022-06 [cited 2022 Nov 21]. Available from: <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>
12. Forbes.com. [homepage on the Internet]. Thailand Sees First Local Coronavirus Case In 100 Days.; c 2020-09 [cited 2022 Nov 21]. Available from: <https://www.forbes.com/sites/alisondurkee/2020/09/03/thailand-first-local-coronavirus-case-in-100-days/?sh=7eda2c2859a4>
13. World Health Organization. [homepage on the Internet]. COVID-19 Situation, Thailand 23 February 2022.; c 2022-02 [cited 2022 Nov 21]. Available from: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/searo/thailand/2022_02_23_tha-sitrep-224-covid-19.pdf?sfvrsn=b3447f88_5
14. Joonlasak K, Batty EM, Kochakarn T, *et al.* Genomic surveillance of SARS-CoV-2 in Thailand reveals mixed imported populations, a local lineage expansion and a virus with truncated ORF7a. *Virus Res* 2021; 292.
15. Puenpa J, Rattanakomol P, Saengdao N, *et al.* Molecular characterization and tracking of the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, Thailand, 2020-2022. *Arch Virol* 2023; 168: 26.
16. Akkapaiboon-Okada P, Phuygun S, Parnmen S, *et al.* SARS-CoV-2: PUB and Boxing Stadium in Bangkok, Thailand. *Bull Dept Med Sci* 2020; 62: 133-42. (in Thai)
17. Davies NG, Abbott S, Barnard RC, *et al.* Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Science* 2021; 372: 1-9.
18. Feikin DR, Higdon MM, Abu-Raddad LJ, *et al.* Duration of effectiveness of vaccines against SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease: results of a systematic review and meta-regression. *The Lancet* 2022; 399: 924-44.
19. Bangkoktribune.com [homepage on the Internet]. First local cases of contagious Indian variant discovered among construction workers in Lak si.; c 2021-05 [cited 2021 May 21]. Available from: <https://bkktribune.com/first-local-cases-of-contagious-indian-variant-discovered-among-construction-workers-in-lak-si/>
20. Campbell F, Archer B, Laurenson-Schafer H. *et al.* Increased transmissibility and global spread of SARS-CoV-2 variants of concern as at June 2021. *Euro Surveill* 2021; 26: 1-6.
21. Reuters. com [homepage on the internet]. Thailand detects first case of Omicron variant.; c 2021-12 [cited 2021 Dec 6]. Available from: <https://www.reuters.com/world/asia-pacific/thailand-detects-first-potential-case-omicron-variant-2021-12-06/>

22. Thermo Fisher Scientific [homepage on the Internet]. Automated Preparation of Ion AmpliSeq SARS-CoV-2 Insight Research Panel Libraries.; c 2023 [cited 2023 Sep 25]. Available from: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/2FLSG2Fmanuals/2FMAN0025705_SARSInsightPanelOnTecan_UB.pdf.
23. Szargut M, Cytacka S, Serwin K, *et al.* SARS-CoV-2 whole-genome sequencing by Ion S5 Technology-Challenges, protocol optimization and success rates for different strains. *Viruses* 2022; 14: 1-16.
24. Aksamentov I, Roemer C, Hodcroft EB, Neher RA, Nextclade: clade assignment, mutation calling and quality control for viral genomes. *J Open Source Softw* 2021; 6: 3773.
25. Ilić M, Benzaquen J, Hofman V, *et al.* Accurate Detection of SARS-CoV-2 by Next-Generation Sequencing in Low Viral Load Specimens. *Int J Mol Sci* 2023; 24: 3478.
26. Genomics.africa [homepage on the Internet]. SARS-CoV-2 Dashboard, Results updated-7 March 2022. c 2022-03 [cited 2023 Apr 6]. Available from: <https://genomics.africa/sars-cov-2-dashboard/>
27. Department of Medical Sciences. [homepage on the Internet]. Surveillance data of SARS-CoV-2 variants in Thailand by Department of Medical Sciences.; c 2021 -11 [cited 2022 Nov 23]. Available from: <https://data.go.th/en/dataset/sars-cov-2-variants>. (in Thai)

Effects of Zinc on Peptide Profiles and Identification Score Value of Human Pathogen *Vibrio cholerae* Identified by MALDI-TOF MS

Maneemon Koben^{1, 2}, Supitcha Pannengetch³, Piyada Na Nakorn³
and Patcharee Isarankura-Na-Ayudhya^{4*}

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

²Bangrak Sexually Transmitted Infections Center, Bangkok, Thailand

³Center for Research Innovation and Biomedical Informatics, Faculty of Medical Technology,
Mahidol University, Salaya Campus, Nakhon Pathom Province, Thailand

⁴Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University,
Rangsit Campus, Pathum Thani Province, Thailand

Abstract

Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) technique was used to examine the protein patterns of bacteria and compare them with existing databases to determine their genus and species rapidly and accurately. Due to its high sensitivity, it is also capable of effectively detecting changes in protein expression. Zinc is widely used as a supplement and is included in many beverages due to its immune-enhancing, beauty-enhancing properties and used to reduce the severity of diarrhea. However, the impact of zinc on pathogen identification such as *Vibrio cholerae* using MALDI-TOF MS remains unclear. Therefore, this study aimed to examine the impact of zinc on the peptide mass pattern and identification score of pathogenic and non-pathogenic strains. *V. cholerae* was challenged with zinc concentrations below the metal tolerance value, ranging from 0.2 to 0.8 mM zinc and analyzed by MALDI-TOF MS. The analysis demonstrated a significant reduction in the identification score in relation to the concentration of zinc ($p < 0.05$). However, this reduction did not affect the accuracy of identifying the genus and species. These findings were consistent with the results of peptide pattern analysis by principal component analysis (PCA) in pathogenic strains but not in non-pathogenic strains ($p < 0.01$). Furthermore, the analysis revealed distinct peptide patterns and identification score in pathogenic strains compared to

*Corresponding author E-mail address: Patcharee.i@allied.tu.ac.th

control, leading to the misidentification of strains as non- pathogenic at a zinc concentration of 0.8 mM. These strains exhibited peptides specific to zinc, indicating a dose-response characteristic at peptide positions m/z 4745, 5122, 6275, and 7160 Dalton. In conclusion, this study significantly contributes to our understanding of how zinc influences the identification of pathogenic bacterial types using MALDI-TOF MS. Additionally, it provides valuable insights into potential strategies for improving the accuracy in situations where interference from zinc present in food and supplements for future investigations.

Keywords: MALDI-TOF MS, Zinc, *Vibrio cholerae*, Identification score, Biotyper

ผลกระทบของสังกะสีต่อรูปแบบเปปไทด์และค่าคะแนนในการระบุเชื้อเชื้อก่อโรค *Vibrio cholerae* ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS

มณีนมณท์ โคเบนท์^{1, 2} สุพิชฌาย์ ปั่นเหน่งเพ็ชร³ ปิยดา ณ นคร³
และ พัชรีย์ อิศรางกูร ณ อยุธยา^{4*}

¹บัณฑิตศึกษา สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี

²ศูนย์การแพทย์บางรักด้านโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ กรุงเทพมหานคร

³ศูนย์วิจัยพัฒนานวัตกรรมการแพทย์สารสนเทศ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา
จังหวัดนครปฐม

⁴ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี

บทคัดย่อ

เครื่อง Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) สามารถระบุจีโนสและสปีชีส์ของจุลชีพได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ โดยวิเคราะห์รูปแบบเปปไทด์ (mass spectra) ของแบคทีเรียและเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล ด้วยความไวสูง ทำให้สามารถตรวจจับการเปลี่ยนแปลงของเปปไทด์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ปัจจุบันนิยมใช้สังกะสีเป็นอาหารเสริม และผสมในเครื่องดื่มหลายชนิด เนื่องจากมีคุณสมบัติในการเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกัน ความงาม และใช้ลดความรุนแรงของโรคท้องร่วงได้ อย่างไรก็ตามผลกระทบของสังกะสีต่อการระบุเชื้อโรค เช่น *Vibrio cholerae* โดยใช้เทคนิค MALDI-TOF MS ยังไม่ชัดเจน ดังนั้น การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลกระทบของสังกะสีต่อรูปแบบเปปไทด์ และค่าคะแนนที่ใช้ในการระบุเชื้อจุลชีพ *V. cholerae* ระหว่างสายพันธุ์ที่มีและไม่มียื่นก่อโรค โดยได้รับสังกะสีที่ความเข้มข้น 0.2 ถึง 0.8 มิลลิโมลาร์ และวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF MS พบว่าค่าคะแนนที่ใช้ในการระบุเชื้อจุลชีพทั้งสองสายพันธุ์มีแนวโน้มลดลงตามการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นสังกะสีอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตามยังสามารถระบุจีโนสและสปีชีส์ได้ถูกต้อง ผลการวิเคราะห์นี้สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์รูปแบบเปปไทด์โดย principal component analysis (PCA) โดยพบการเปลี่ยนแปลงรูปแบบเปปไทด์ตามความเข้มข้นของสังกะสีอย่างมีนัยสำคัญ เฉพาะในสายพันธุ์ที่มียื่นก่อโรคเท่านั้น ($p < 0.01$) นอกจากนี้พบว่าสังกะสีที่ความเข้มข้น 0.8 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้เกิดการระบุสายพันธุ์ (strain) ที่ผิดพลาด โดยพบว่ามีเปปไทด์ที่มีความจำเพาะกับผลของสังกะสีต่อเชื้อนี้ที่ตำแหน่ง m/z 4745, 5122, 6275 และ 7160 ดาลตัน ผลการวิจัยนี้

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: Patcharee.i@allied.tu.ac.th

รับบทความ: 14 มิถุนายน 2566

แก้ไขบทความ: 9 กรกฎาคม 2566

รับตีพิมพ์บทความ: 14 กรกฎาคม 2566

ทำให้เกิดองค์ความรู้เกี่ยวกับผลกระทบของสังกะสีที่มีต่อการระบุชนิดของแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค MALDI-TOFMS นำไปสู่การวินิจฉัยเชื้อที่ถูกต้องแม่นยำ กรณีที่มีการรบกวนจากสังกะสีในสิ่งส่งตรวจ

คำสำคัญ: MALDI-TOF MS, สังกะสี, *Vibrio cholerae*, ค่าคะแนนที่ใช้ระบุเชื้อจุลชีพ, Biotyper

บทนำ

Vibrio cholerae เป็นสาเหตุสำคัญของอหิวาตกโรคหรือโรคอุจจาระร่วงรุนแรง ส่วนใหญ่เกิดจากการรับประทานอาหารทะเลแบบดิบ ๆ มีการปนเปื้อนระหว่างขั้นตอนการเตรียมอาหาร⁽¹⁾ เมื่อเชื้อเข้าสู่ลำไส้เล็กของผู้ป่วย เชื้อจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในชั้นเยื่อลำไส้และสร้าง cholera toxin ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นเอนเทอโรทอกซินทำให้ผนังลำไส้อักเสบ ไม่สามารถดูดซึมน้ำและเกลือแร่ได้ อีกทั้งยังกระตุ้นให้มีการสูญเสียน้ำและเกลือแร่ เช่น โซเดียมและคลอไรด์ออกมาในลำไส้ ส่งผลให้ผู้ป่วยถ่ายอุจจาระเป็นน้ำอย่างรุนแรง ซึ่งเป็นพยาธิสภาพที่สำคัญของโรค ทั้งนี้เชื้อ *V. cholerae* จะจำกัดยูเฉพาในลำไส้ โดยไม่รุกรานเข้าสู่กระแสเลือด ดังนั้นผู้ป่วยจึงมักไม่มีไข้และอุจจาระมักไม่มีเลือดปน^(2, 3) โดยเชื้อสามารถก่อให้เกิดการระบาดได้อย่างรวดเร็ว และทำให้เสียชีวิตได้^(4, 5)

สังกะสีเป็นแร่ธาตุอาหารที่มีความสำคัญต่อระบบการทำงานของร่างกาย เป็นแร่ธาตุที่พบน้อยแต่มีความจำเป็นต่อร่างกาย สังกะสีถูกนำไปใช้ร่วมกับเอนไซม์ในปฏิกิริยาต่าง ๆ ที่สำคัญต่อการทำงานของร่างกาย เช่น การเจริญเติบโต การสร้างเนื้อเยื่อต่าง ๆ และช่วยเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันภายในร่างกาย⁽⁶⁾ ดังนั้นจึงนิยมบริโภคสังกะสีมากขึ้นในอาหารเสริมรูปแบบต่าง ๆ โดยมีส่วนผสมสังกะสีที่ประมาณ 15 ถึง 30 มิลลิกรัม แต่การได้รับสังกะสีในปริมาณที่มากเกินไปก็ส่งผลเสียต่อร่างกาย องค์การอนามัยโลกได้กำหนดแนวทางการบริโภคประจำสัปดาห์ที่ยอมรับได้ (provisional tolerable weekly intakes; PTWIs) ของร่างกายมนุษย์ เท่ากับ 7,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อสัปดาห์⁽⁷⁾ นอกจากสังกะสีจะมีประโยชน์ต่อร่างกายแล้วสังกะสียังมีบทบาทสำคัญในการต้านเชื้อที่ก่อให้เกิดอาการท้องร่วง โดยที่สังกะสีจะช่วยรักษาระดับความสมบูรณ์ของผนังเซลล์

และมีบทบาทโดยตรงต่อการขนส่งไอออนในเซลล์เอนเทอโรไซต์ (enterocytes) ซึ่งเป็นเซลล์เยื่อลำไส้ที่สามารถดูดซึมแร่ธาตุต่าง ๆ ได้ ดังนั้นสังกะสีจึงช่วยให้มีการดูดซึมไอออนและป้องกันสารคัดหลั่งที่ถูกสร้างจากทอกซินของเชื้อ *V. cholerae* โดยมีผลโดยตรงต่อความเข้มข้นของ cAMP ในเซลล์เอนเทอโรไซต์⁽⁸⁾ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยพบว่าสังกะสีซัลเฟต และแมงกานีส มีความสามารถลดความรุนแรงในการก่อโรคของ *V. cholerae* ได้ โดยธาตุเหล่านี้มีผลต่อยีน ctxAB, fliA, tepA และ toxR ซึ่งเป็นกลุ่มยีนที่ทำหน้าที่สร้างทอกซิน การเคลื่อนที่และการเพิ่มจำนวนของเชื้อในลำไส้ ส่งผลให้ความสามารถในการเคลื่อนที่ การเกาะผนังเซลล์เยื่อผิว (epithelial cell) ของเชื้อ *V. cholerae* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ⁽⁹⁾ ดังนั้นองค์การอนามัยโลก และกองทุน United Nations International Children's Emergency Fund (UNICEF) ได้แนะนำให้เสริมสังกะสีในผู้ป่วยเด็กทุกรายที่เป็นโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันที่อาศัยอยู่ในประเทศกำลังพัฒนาปริมาณ 20 มิลลิกรัมทุกวันเป็นเวลา 10-14 วันสำหรับเด็กที่มีอาการท้องร่วงเฉียบพลันและ 10 มิลลิกรัมต่อวันสำหรับทารกอายุต่ำกว่าหกเดือนเพื่อลดความรุนแรง⁽¹⁰⁾

Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOFMS) เป็นเทคนิคที่สามารถระบุชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ในระดับจีโนมและสปีชีส์ ได้รวดเร็ว มีความไวและมีความแม่นยำสูง^(11, 12) โดยอาศัยรูปแบบเปปไทด์สายสั้น ๆ ที่มีความจำเพาะกับจีโนมและสปีชีส์ (peptide mass fingerprint) ขนาดประมาณ 2,000-15,000 ดาลตัน เช่น โปรตีนในกลุ่ม housekeeping proteins, ribosomal proteins และโปรตีนสายสั้นอื่น ๆ เนื่องจากโปรตีนสายสั้น ๆ หรือเรียกว่าเปปไทด์นั้นมีการเปลี่ยนแปลงได้เสมอ เมื่อเชื้อจุลินทรีย์อยู่ในภาวะกดดัน มีรายงานวิจัยแสดงให้เห็นว่ารูปแบบ

เปปไทด์สามารถเปลี่ยนแปลงได้เมื่อเชื้ออยู่ในภาวะที่มีโลหะชนิดต่าง ๆ เช่น เชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ได้รับโลหะเงิน แคดเมียม สังกะสี ตะกั่ว⁽¹³⁾ และ *Escherichia coli* O157: H7 ที่ได้รับแคดเมียม โดยคาดว่ารูปแบบเปปไทด์ที่เปลี่ยนแปลงนั้นเป็นผลจากการปรับตัวของเชื้อต่อโลหะนั้น ๆ⁽¹⁴⁾ นอกจากนี้ สังกะสีถูกนำมาใช้ในการควบคุมความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่อ้วน ยังได้รับความนิยมในการนำมาบริโภคเป็นอาหารเสริมในชีวิตประจำวันมากขึ้น อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานผลกระทบของสังกะสีต่อรูปแบบการแสดงออกของเปปไทด์ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS ในเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญอย่าง *V. cholerae* ดังนั้นในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาผลกระทบของสังกะสีต่อการระบุชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS โดยการเปรียบเทียบรูปแบบเปปไทด์ รวมถึงค่าคะแนนที่ใช้ในการระบุชนิดเชื้อจุลินทรีย์ (identification score) ของเชื้อ *V. cholerae* สายพันธุ์ที่มียื่นก่อโรคและไม่ยื่นก่อโรค ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสังกะสีความเข้มข้นต่าง ๆ โดยที่ค่าความเข้มข้นนั้นมีค่าน้อยกว่าค่า metal tolerance test รวมถึงการแสดงความสามารถของเครื่อง MALDI-TOF MS ในการจำแนกรูปแบบเปปไทด์พื้นฐานที่แตกต่างกันของเชื้อ *V. cholerae* สายพันธุ์ที่มียื่นก่อโรคและไม่ยื่นก่อโรคออกจากกัน การศึกษาครั้งนี้จะทำให้เกิดองค์ความรู้พื้นฐานสำหรับการวิเคราะห์เชื้อ *V. cholerae* ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS และเป็นตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้เครื่อง MALDI-TOF MS ในการศึกษาจุลินทรีย์ ในภาวะที่มีปัจจัยต่างๆ มารบกวนหรือมีการปนเปื้อนมากับสิ่งส่งตรวจ ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อจุลินทรีย์ทางห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ต่อไป

วัสดุและวิธีการ

การทดสอบหาความสามารถในการทนต่อสังกะสีของเชื้อ (Metal tolerance test)

นำเชื้อแบคทีเรีย *V. cholerae* สายพันธุ์ *V. cholerae* serogroup O1, El tor, Inaba และ *V. cholerae* Non O1/Non O139 (จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์) โคโลนีเดี่ยวมาลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB) broth 5 มิลลิลิตร 1 โคโลนีต่อ 1 หลอด (ทำ 3 ซ้ำ) แล้วนำไปบ่มในตู้เพาะเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเตรียมเชื้อให้เท่ากับ 0.5 McFarland ($OD_{600} = 0.1$) นำเชื้อที่ปรับแล้วมาเจือจางเชื้อในอัตราส่วน 1:10 หลังจากนั้นหยดเชื้อที่เตรียมไว้ปริมาตร 2 ไมโครลิตร บน LB Agar ที่ไม่มีสังกะสี (กลุ่มควบคุม) และ LB Agar ที่มีความเข้มข้นของสังกะสี เท่ากับ 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 และ 6.4 มิลลิโมลาร์ แล้วนำไปบ่มเพาะที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 18 ชั่วโมง ความเข้มข้นสุดท้ายของสังกะสีที่เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ให้อ่านเป็นค่า metal tolerance test⁽¹⁵⁾

การเพาะเลี้ยง *V. cholerae* ในอาหารเหลวผสมสังกะสีสำหรับวิเคราะห์รูปแบบมวลเปปไทด์ด้วยเทคนิค Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight

นำเชื้อแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยว 1 โคโลนี เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth นำไปบ่มในตู้เพาะเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำมาปรับจำนวนเชื้อให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 1×10^9 หน่วยการก่อตัวโคโลนีต่อมิลลิลิตร (CFU/mL) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Shimadzu UV 2501PC, Japan) วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) หลังจากนั้นเติมสังกะสีซัลเฟตความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.8, 0.4 และ 0.2

มิลลิโมลาร์ นำไปบ่มเพาะที่ 37 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องเขย่า โดยใช้ความเร็วที่ 180 รอบต่อนาที บ่มเพาะระยะเวลา 16 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้ทั้งหมดไปปั่นตกตะกอนโดยใช้ความเร็วที่ 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง ปั่นล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ย้ายเซลล์ลงหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นล้างโดยใช้ความเร็วที่ 12,000 รอบต่อนาที ปั่นล้าง 3 รอบ ครั้งสุดท้ายดูดน้ำใสด้านบนที่เกินออกให้หมด ให้เหลือตะกอนเซลล์และนำไปเตรียมตัวอย่างเปปไทด์สำหรับเครื่อง MALDI-TOF MS ต่อไป

การเตรียมตัวอย่างเปปไทด์สำหรับวิเคราะห์ด้วย Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry

การเตรียมตัวอย่างเปปไทด์จะทำเซลล์ให้แตกและปรับปริมาณโปรตีนในแต่ละตัวอย่างให้เท่ากัน ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS (MALDI Biotyper; Bruker, Germany) นำเซลล์แบคทีเรียที่ได้มาทำให้แตก โดยใช้วิธีสกัดด้วยสารละลายผสมเอทานอล/กรดฟอร์มิก คือ เติมน้ำที่ผ่านระบบกรองกำจัดไอออนแล้ว 300 ไมโครลิตร ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ดูดตะกอนเซลล์ 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นเข้มข้นร้อยละ 99.9 ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นโดยใช้ความเร็วที่ 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง เปิดฝาทิ้งไว้ 5 นาที เติมน้ำกลั่นกรดฟอร์มิกเข้มข้นร้อยละ 70 ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ใช้ไปเปิดดูดขึ้นลงจนเกิดฟองเพื่อให้เซลล์แบคทีเรียแตก แล้วเติมอะซิโตนไตรลล์เข้มข้นร้อยละ 100 ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นโดยใช้ความเร็วที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที นำส่วนใสด้านบนไปวัดความเข้มข้นของโปรตีนโดยวิธี Lowry และปรับปริมาณโปรตีนในแต่ละตัวอย่าง ให้ได้เท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป⁽¹⁴⁾

การวิเคราะห์รูปแบบเปปไทด์โดยเทคนิค Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry

เตรียม matrix solution ของแอลฟา-ไซยาโน-4-ไฮดรอกซีซินนามิก (HCCA matrix solution) โดยชั่งกรดแอลฟา-ไซยาโน-4-ไฮดรอกซีซินนามิก 10 ไมโครกรัม เติมน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และอะซิโตนไตรลล์เข้มข้นร้อยละ 100 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำส่วนใสด้านบนไปใช้ จากนั้นนำไปโปรตีนความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ที่สกัดได้ในแต่ละตัวอย่างมาเติม HCCA matrix solution ในอัตราส่วน 1:1 จุดตัวอย่างลงบน MALDI target plate 2 ไมโครลิตร โดยจุด 46 จุด ต่อ 1 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ใช้ *Escherichia coli* DH5alpha เป็นตัวควบคุมบวก (positive control) ทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Ultraflex ช่วง mass-to-charge ratio (m/z) 2,000-20,000 คาลตัน และมี signal-to-noise ratio มากกว่า 5 การเก็บสเปกตรัมใช้โปรแกรม FlexControl software version 3.3 (Bruker Daltonics, Germany) โดยก่อนการยิงตัวอย่างต้องปรับเทียบความถูกต้องของเครื่อง Microflex LT (Bruker) ด้วยสารมาตรฐาน *E. coli* strain DH5alpha ที่มีมวลโปรตีนของ ribosomal proteins ที่ตำแหน่ง m/z 5098, 5381, 6255, 7274, 10300, 13683 และ 16952 คาลตัน หลังจากเก็บ spectra peaks ของตัวอย่างเรียบร้อยแล้ว นำ spectra peaks ที่ได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์หาค่าด้วยโปรแกรม FlexAnalysis software version 3.3 (Bruker Daltonics, Germany) โดยนำ spectra peaks ที่เก็บได้ 46 ชุดของแต่ละตัวอย่างมาปรับฐานของ spectra peaks ให้เท่ากัน (smoothness and baseline subtraction) แล้วนำชุด spectra peaks ที่ได้ไปวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Bruker Daltonics

FlexAnalysis 3.0 software และ MALDI Biotyper 2.0 software ส่วนความแตกต่างของ spectra peaks ของสายเปปไทด์ นำมาวิเคราะห์ด้วยหลักการ principal component analysis (PCA) และ ทำ cluster analysis⁽¹⁴⁾

การวิเคราะห์ทางสถิติ

การเปรียบเทียบค่าคะแนนที่ใช้ในการระบุชนิดเชื้อจุลินทรีย์ระหว่างเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในภาวะที่ไม่มีมีสังกะสี (กลุ่มควบคุม) และภาวะที่มีสังกะสี อิงตามสถิติ *t*-test/ANOVA โดยใช้ GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., la jolla, CA, USA) กำหนดค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p\text{-value} \leq 0.05$ วิเคราะห์ตำแหน่งและความเข้มข้นของ spectra peaks ด้วยโปรแกรม Bruker FlexAnalysis 3.0 ระบุชนิดของเชื้อจุลินทรีย์โดยเทียบความเหมือนระหว่างรูปแบบเปปไทด์ของตัวอย่างกับรูปแบบเปปไทด์ของเชื้อที่รู้จักแล้วในฐานข้อมูล version 3.3.1.0 (4,613 entries) ด้วยโปรแกรม Bruker Biotyper 3.0 แล้ววิเคราะห์รูปแบบเปปไทด์ของเชื้อที่ principal component analysis (PCA) และ cluster analysis ด้วยโปรแกรม Bruker ClinProTools version 2.2 อิงตามสถิติ Wilcoxon/Kruskal-Wallis, Anderson-Darling (AD), *t*-test/ANOVA (TTA) โดยกำหนดค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p\text{-value} \leq 0.01$

ผลการวิจัย

รูปแบบเปปไทด์พื้นฐานที่แตกต่างกันของ *V. cholerae* สายพันธุ์ที่มีถิ่นกำเนิด (V. cholerae O1) และ ไม่มีถิ่นกำเนิดท้องร่วงชนิดรุนแรง (V. cholerae Non O1/Non O139)

V. cholerae สายพันธุ์ที่มีและไม่มีถิ่นกำเนิดท้องร่วงชนิดรุนแรง เป็นตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์

หารูปแบบเปปไทด์ ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS โดยที่เชื้อแต่ละชนิดจะเก็บชุดเปปไทด์เข้าทั้งหมด 46 ชุด พบว่า *V. cholerae* O1 และ *V. cholerae* Non O1/Non O139 พบจำนวนเปปไทด์พื้นฐานของเชื้อ *V. cholerae* รวมกันทั้งหมด 96 เปปไทด์ที่มีตำแหน่งในช่วง m/z 2,000-20,000 ดาลตัน การวิเคราะห์หาเปปไทด์ที่มีความจำเพาะกับเชื้อ *V. cholerae* O1 ทำโดยคัดเลือกเปปไทด์ตามคุณสมบัติดังนี้ 1. มีความเข้มข้นของเปปไทด์ (peak intensity) แตกต่างจาก *V. cholerae* Non O1/Non O139 เท่ากับ 1.5 เท่า 2. มีค่า $p\text{-value} < 0.01$ โดยคำนวณจาก Wilcoxon/Kruskal-Wallis (W/KW) test 3. มีค่า coefficient of variation ≤ 30 ผลการทดลองพบว่ามี 13 เปปไทด์ที่มีคุณสมบัติตามที่กำหนดดังนี้ มี 8 เปปไทด์ที่มีความเข้มข้นของเปปไทด์ของ *V. cholerae* O1 มากกว่า *V. cholerae* Non O1/Non O139 ได้แก่ m/z 3095, 6275, 8353, 4277, 6164, 5122, 7160 และ 4177 ดาลตัน และมี 5 เปปไทด์ที่มีความเข้มข้นของเปปไทด์ของ *V. cholerae* O1 น้อยกว่า *V. cholerae* Non O1/Non O139 ได้แก่ m/z 3163, 4745, 5494, 4818 และ 5272 ดาลตัน (Table 1 และ Fig. 1)

ผลกระทบของสังกะสีต่อค่าคะแนนที่ใช้ในการระบุชนิดเชื้อจุลินทรีย์ จากเครื่อง Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry

ผลกระทบของสังกะสีต่อค่าคะแนนที่ใช้ในการระบุชนิดเชื้อจุลินทรีย์ รวมถึงผลกระทบต่อรูปแบบเปปไทด์ ศึกษาโดยทำการทดสอบหาค่า metal tolerance test ของทั้ง *V. cholerae* O1 และ *V. cholerae* Non O1/Non O139 พบว่าความเข้มข้นสุดท้ายที่เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้คือ ที่สังกะสีความเข้มข้น 3.2 มิลลิโมลาร์ ดังนั้นจึงเลี้ยงเชื้อในอาหาร

เลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของสังกะสีที่มีค่าน้อยกว่าค่า metal tolerance test คือที่ 0.2, 0.4 และ 0.8 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างควบคุมเป็นเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีสังกะสี และก่อนนำไปวิเคราะห์หารูปแบบเปปไทด์ จะทำให้เซลล์แตกและนำไปปรับความเข้มข้นของโปรตีนให้มีความเข้มข้นที่เท่ากัน เพื่อให้ชุดเปปไทด์แต่ละชุดมีความเข้มข้นใกล้เคียงกันเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOFMS เปปไทด์จะถูกวิเคราะห์รูปแบบเปปไทด์ที่ m/z 2,000-20,000 ดาลตัน และมี signal-to-noise ratio มากกว่า 5 ผลการทดลองพบว่าสังกะสีไม่มีผลต่อการระบุจีโนมและสปีชีส์ของทั้งสองสายพันธุ์ (Table 2) โดยยังคงมีค่าคะแนนที่ใช้ในการระบุชนิดเชื้อจุลินทรีย์มากกว่า 2 ขึ้นไป อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองพบว่าสังกะสีมีผลทำให้ค่าคะแนนที่ใช้ในการระบุชนิดเชื้อจุลินทรีย์มีแนวโน้มลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Fig. 2) เมื่อเชื้อเจริญในอาหารที่มีความเข้มข้นของสังกะสีเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 0.8 มิลลิโมลาร์ ค่าคะแนนที่ใช้ในการระบุชนิดเชื้อจุลินทรีย์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับกลุ่มควบคุมมากที่สุด และส่งผลให้การระบุสายพันธุ์ผิดไป โดยทำให้เชื้อ *V. cholerae* O1 ถูกระบุผิดเป็น *V. cholerae* Non O1/Non O139 (Table 2 และ Fig. 2)

การวิเคราะห์รูปแบบเปปไทด์ของเชื้อ *V. cholerae* ที่ถูกกระตุ้นด้วยสังกะสี

การศึกษาผลกระทบของสังกะสีต่อรูปแบบเปปไทด์ระหว่างเชื้อที่ยีนก่อโรค *V. cholerae* O1 และเชื้อที่ไม่มียีนก่อโรค *V. cholerae* Non O1/Non O139 ได้วิเคราะห์พร้อมกับค่าคะแนนที่ใช้ในการระบุชนิดเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยโปรแกรม ClinProTool version 2.2 วิเคราะห์รูปแบบเปปไทด์ด้วย PCA และแสดงผลใน Box and whiskers plot พบว่ารูปแบบเปปไทด์ของในเชื้อ *V. cholerae* Non O1/Non O139 ไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและเชื้อที่เจริญ

เติบโตในสังกะสีที่มีความเข้มข้น 0.2-0.8 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่ *V. cholerae* O1 สามารถแยกความแตกต่างของรูปแบบเปปไทด์ระหว่างกลุ่มควบคุมและเชื้อที่เจริญเติบโตในสังกะสีที่มีความเข้มข้น 0.2-0.8 มิลลิโมลาร์ ออกจากกันได้ชัดเจน นอกจากนี้ ใน Box and whiskers plot พบว่ารูปแบบเปปไทด์ที่ได้มีแนวโน้มลดลงสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสังกะสีอย่างมีนัยสำคัญ (Fig. 3) ทำให้สันนิษฐานได้ว่าสังกะสีมีความสัมพันธ์ต่อการเปลี่ยนแปลงรูปแบบเปปไทด์ดังกล่าว

เปปไทด์ที่ตอบสนองจำเพาะกับสังกะสีของเชื้อ *V. cholerae* O1

จากผลการศึกษาข้างต้น (Table 2) พบว่าความเข้มข้นของสังกะสีที่ 0.8 มิลลิโมลาร์ มีผลต่อรูปแบบเปปไทด์ ทำให้ค่าคะแนนที่ใช้ในการระบุชนิดเชื้อจุลินทรีย์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และมีการระบุสายพันธุ์คลาดเคลื่อน ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาต่อเพื่อวิเคราะห์หาเปปไทด์ของเชื้อ *V. cholerae* O1 ที่มีการเปลี่ยนแปลงหลังเชื้อได้รับสังกะสี โดยได้คัดเลือกเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติดังนี้ 1. มีความเข้มข้นของเปปไทด์ของเชื้อที่เลี้ยงในภาวะที่มีสังกะสี 0.8 มิลลิโมลาร์ และไม่มีสังกะสีมีความแตกต่างกัน 1.5 เท่า 2. มีค่า p -value < 0.01 คำนวณจาก Wilcoxon/Kruskal-Wallis (W/KW) test 3. มีค่า coefficient of variation ≤ 30 จากการวิเคราะห์ดังกล่าวพบ 19 เปปไทด์ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเปปไทด์ที่มีความเข้มข้นน้อยลงเมื่อเชื้อได้รับสังกะสีมีจำนวน 6 เปปไทด์ ได้แก่ m/z 4368, 4746, 3165, 5494, 9491 และ 4800 ดาลตัน เปปไทด์ที่มีความเข้มข้นมากขึ้น เมื่อเชื้อได้รับสังกะสีมีจำนวน 13 เปปไทด์ ได้แก่ m/z 3582, 2563, 4997, 3139, 7162, 3083, 5082, 3096, 5123, 4178, 6165, 6276 และ 8355 ดาลตัน (Table 3) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาเปปไทด์ของเชื้อ

V. cholerae O1 ที่มีความจำเพาะต่อพิษของสังกะสี จะพิจารณาคัดเลือกเปปไทด์ที่มีความเข้มข้นสูง เพื่อให้มีความแม่นยำและแยกออกจากเปปไทด์ที่เกิดจากตัวรบกวนได้ดี จึงเลือกเปปไทด์ที่มีค่าความเข้มข้นของเปปไทด์มากกว่าค่าเฉลี่ย (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 7.23 a.u.) ประมาณสี่เท่าคือ 30 a.u. และพิจารณาหาเปปไทด์ที่

มีความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเปปไทด์กับความเข้มข้นของสังกะสี (dose response effect) รวมถึงจะต้องไม่พบความสัมพันธ์ในเชื้อ *V. cholerae* Non O1/Non O139 ผลการศึกษาค้นพบ 4 เปปไทด์ที่มีคุณสมบัติดังกล่าว ได้แก่ 4745, 5122, 6275 และ 7160 ดาลตัน (Fig. 4 และ Fig. 5) ตามลำดับ

Table 1 Comparison of mass peak of *V. cholerae* O1 and *V. cholerae* Non O1/Non O139 analysis by MALDI-TOF MS. These peaks were identified through ClinProTools analysis using Wilcoxon/Kruskal-Wallis (W/KW) statistics and Anderson-Darling statistical test, with significance at $p < 0.000001$. The peak list demonstrates the selection criteria, which contain: Peak intensity ratio of test and control greater than 1.5-fold change, average peak intensity greater than 5 a.u. and coefficient of variation greater than 30. The increasing and decreasing of average peak intensity were represented by (+) and (-) symbols, respectively.

Peak No. (m/z) Dalton	<i>V. cholerae</i> O1			<i>V. cholerae</i> Non O1/ Non O139			Average peak intensity of <i>V. cholerae</i> O1/ <i>V. cholerae</i> Non O1/Non O139	WKW and AD
	Average peak intensity	StdDev	CV	Average peak intensity	StdDev	CV		
3095	17.84	2.96	16.57	4.85	0.64	13.24	(+) 3.68	< 0.000001
8353	12.96	1.6	12.36	4.13	1.77	42.87	(+) 3.13	< 0.000001
6275	32.33	4.59	14.21	12.62	2.99	23.69	(+) 2.56	< 0.000001
4277	47.11	14.58	30.95	19.79	5.1	25.76	(+) 2.38	< 0.000001
6164	24.82	2.69	10.82	11.15	2.57	23.08	(+) 2.22	< 0.000001
5122	102.44	14.32	13.98	53.6	11.5	21.46	(+) 1.91	< 0.000001

Table 1 Comparison of mass peak of *V. cholerae* O1 and *V. cholerae* Non O1/Non O139 analysis by MALDI-TOF MS. These peaks were identified through ClinProTools analysis using Wilcoxon/Kruskal-Wallis (W/KW) statistics and Anderson-Darling statistical test, with significance at $p < 0.000001$. The peak list demonstrates the selection criteria, which contain: Peak intensity ratio of test and control greater than 1.5-fold change, average peak intensity greater than 5 a.u. and coefficient of variation greater than 30. The increasing and decreasing of average peak intensity were represented by (+) and (-) symbols, respectively. (Cont.)

Peak No. (m/z) Dalton	<i>V. cholerae</i> O1			<i>V. cholerae</i> Non O1/ Non O139			Average peak intensity of <i>V. cholerae</i> O1/ <i>V. cholerae</i> Non O1/Non O139	WKW and AD
	Average peak intensity	StdDev	CV	Average peak intensity	StdDev	CV		
7160	88.3	9.73	11.02	48.3	5.07	10.51	(+) 1.82	< 0.000001
4177	20.84	2.68	12.85	13.88	3.86	27.78	(+) 1.50	< 0.000001
3163	6.68	1.54	23.06	15.15	3.16	20.88	(-) 2.27	< 0.000001
4745	52.81	13.29	25.18	100.75	15	14.89	(-) 1.91	< 0.000001
5494	7.95	1.49	18.78	13.98	1	7.18	(-) 1.76	< 0.000001
4818	4.38	1.82	41.47	7.44	1.4	18.81	(-) 1.70	< 0.000001
5272	4.86	1.41	28.91	7.71	0.86	11.12	(-) 1.59	< 0.000001

Table 2 The identification score and genus-species identification of *V. cholerae* O1 and Non O1/Non O139 strains using MALDI-TOF MS. The strains were cultured in the presence of zinc, with concentrations ranging from 0.2 mM to 0.8 mM Zn. To analyze the data, statistical analysis using the student *t*-test was performed, setting the significance level at $p < 0.05$.

<i>V. cholerae</i> O1			
Zn-Treatment	Score (Mean $\pm$ SD)	<i>p</i> -value from <i>t</i> -test	Bacterial Identification
Control	2.683 $\pm$ 0.027	-	<i>V. cholerae</i> O1
0.2 mM	2.678 $\pm$ 0.008	0.862	<i>V. cholerae</i> O1
0.4 mM	2.553 $\pm$ 0.008	0.002	<i>V. cholerae</i> O1
0.8 mM	2.521 $\pm$ 0.016	0.001	<i>V. cholerae</i> Non O1/Non O139
<i>V. cholerae</i> Non O1/ Non O139			
Zn-Treatment	Score (Mean $\pm$ SD)	<i>p</i> -value from <i>t</i> -test	
Control	2.767 $\pm$ 0.010	-	<i>V. cholerae</i> Non O1/ Non O139
0.2 mM	2.725 $\pm$ 0.009	0.016	<i>V. cholerae</i> Non O1/ Non O139
0.4 mM	2.714 $\pm$ 0.018	0.035	<i>V. cholerae</i> Non O1/ Non O139
0.8 mM	2.656 $\pm$ 0.024	0.003	<i>V. cholerae</i> Non O1/ Non O139

Table 3 Comparison of mass peaks in protein analysis of *V. cholerae* O1 under zinc stress at 0.8 mM and without zinc stress using MALDI-TOF MS/MS indicating the impact of zinc stress on the mass spectra profiles of *V. cholerae* O1. The peak list demonstrates the selection criteria, which include: Peak intensity ratio of test and control greater than 1.5-fold change, *p*-value < 0.001 of Wilcoxon/Kruskal-Wallis (W/KW) test, Anderson-Darling (AD) test and coefficient of variation greater than 30. The increasing and decreasing of average peak intensity were represented by (+) and (-) symbols, respectively.

Peak No. (m/z) Dalton	<i>V. cholerae</i> O1 (control)			<i>V. cholerae</i> O1 (0.8 mM Zn)			Average peak intensity of 0.8 mM/ Control	WKW	AD
	Average peak intensity (a.u.)	StdDev	CV	Average peak intensity (a.u.)	StdDev	CV			
4368	6.09	1.28	20.96	19.78	4.04	20.44	(+) 3.25	< 0.000001	0.000150
4746	53.06	13.13	24.76	148.22	20.06	13.54	(+) 2.80	< 0.000001	0.048400
3165	6.68	1.51	22.66	18.30	3.10	16.94	(+) 2.74	< 0.000001	0.106000
5494	8.04	1.55	19.26	17.66	1.93	10.96	(+) 2.20	< 0.000001	0.000040
9491	59.04	7.74	13.11	128.38	16.08	12.53	(+) 2.17	< 0.000001	0.000239
4800	3.15	0.99	31.32	6.06	0.87	14.37	(+) 1.92	< 0.000001	0.094000
3582	42.87	6.83	15.94	26.02	3.56	13.67	(-) 1.65	< 0.000001	< 0.000001
2563	25.71	3.72	14.48	12.46	2.57	20.61	(-) 2.06	< 0.000001	< 0.000001
4997	6.98	1.24	17.72	3.10	0.41	13.16	(-) 2.25	< 0.000001	0.000002
3139	14.25	2.10	14.73	6.01	0.99	16.39	(-) 2.37	< 0.000001	0.000039
7162	88.08	9.63	10.94	36.73	6.03	16.41	(-) 2.40	< 0.000001	< 0.000001
3083	11.86	1.31	11.08	4.83	0.88	18.31	(-) 2.46	< 0.000001	< 0.000001
5082	5.80	0.97	16.69	2.07	0.41	19.95	(-) 2.80	< 0.000001	< 0.000001
3096	17.67	3.04	17.19	5.38	1.20	22.29	(-) 3.28	< 0.000001	< 0.000001
5123	101.89	14.39	14.13	28.28	6.16	21.77	(-) 3.60	< 0.000001	< 0.000001
4178	20.83	2.63	12.63	5.01	0.86	17.27	(-) 4.16	< 0.000001	< 0.000001
6165	24.71	2.71	10.95	4.08	0.64	15.77	(-) 6.06	< 0.000001	< 0.000001
6276	32.12	4.66	14.50	4.90	1.24	25.40	(-) 6.56	< 0.000001	< 0.000001
8355	12.93	1.59	12.28	0.96	0.37	38.85	(-) 13.47	< 0.000001	< 0.000001

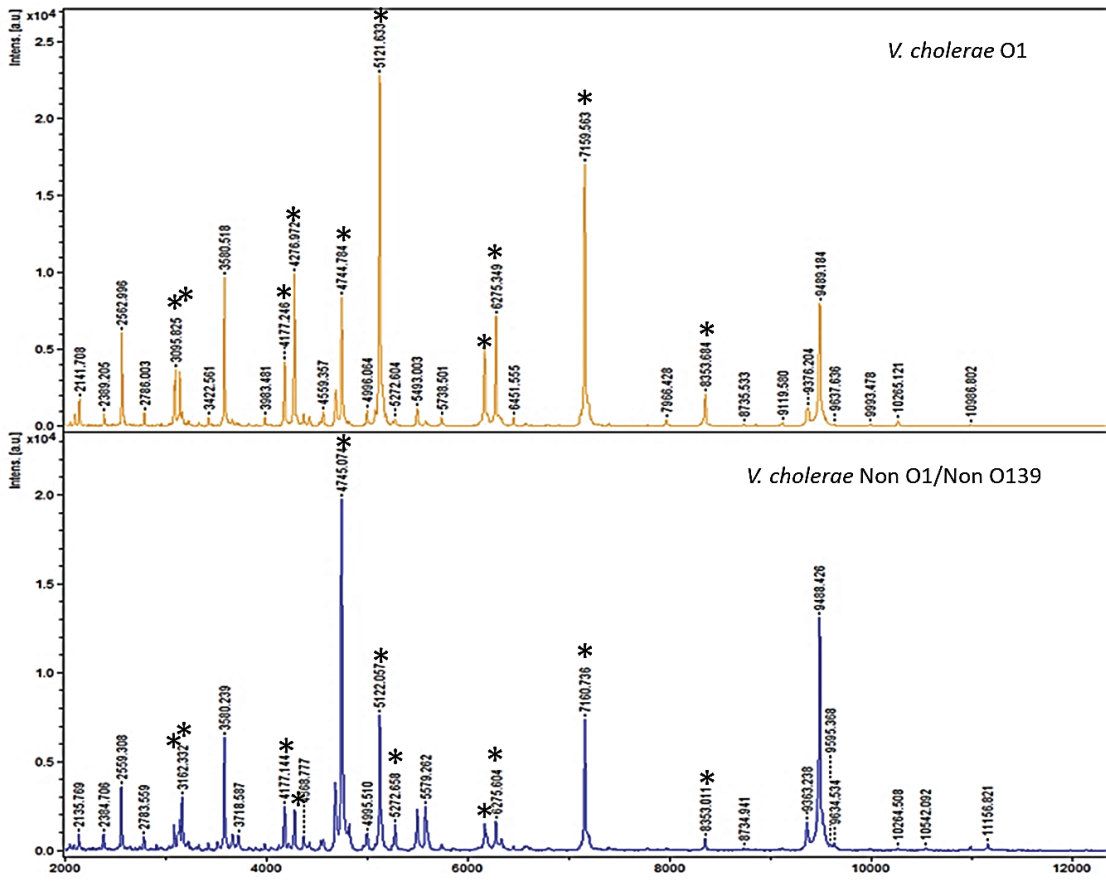
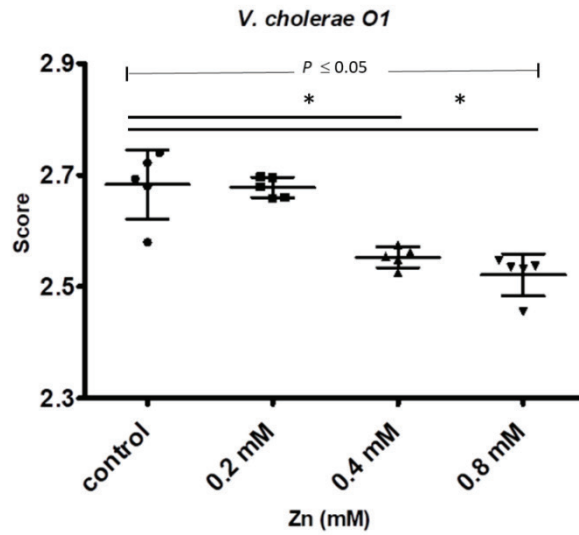


Fig. 1 The MALDI-TOF mass spectra of protein fingerprints for both pathogenic (*V. cholerae* O1) and non-pathogenic (*V. cholerae* Non O1/Non O139) strains of *V. cholerae*. The spectra highlight the presence of 13 discriminating peaks, indicated by (*) symbols, with their corresponding m/z values: 3095, 6275, 8353, 4277, 6164, 5122, 7160, 4177, 3163, 4745, 5494, 4818 and 5272 Dalton.

(A)



(B)

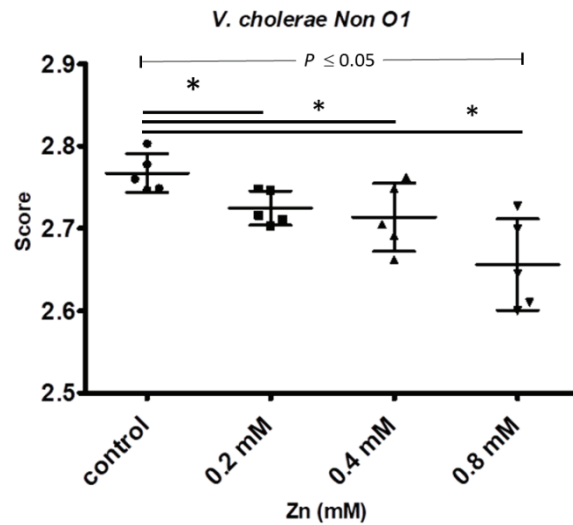
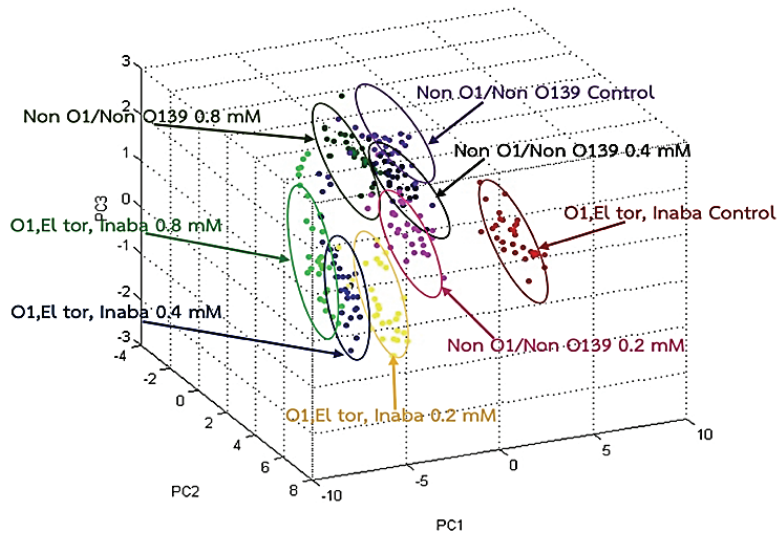


Fig. 2 The figure illustrates the identification scores of (A) *V. cholerae* O1 and (B) Non O1/Non 139 strains using MALDI-TOF MS. The x-axis represents the concentration of zinc (ranging from 0.2 mM to 0.8 mM). The y-axis represents the identification score of the strains. The statistical analysis was performed using the student *t*-test, and the significance level was set at $p < 0.05$, indicated by (*) symbols.

(A)



(B)

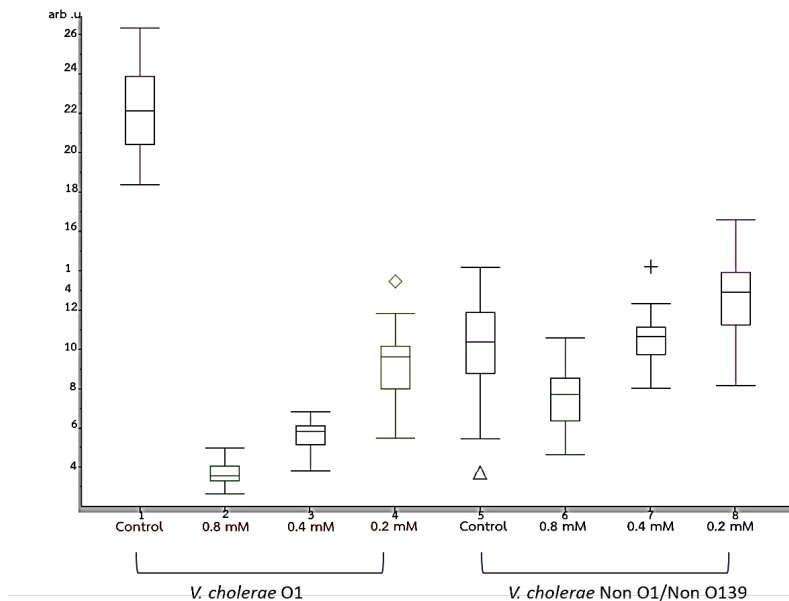


Fig. 3 The figure illustrates the results of PCA and the box and whiskers plot performed on *V. cholerae* O1 samples after exposure to different concentrations of Zn. (A) PCA Analysis: The total mass spectra of the samples were subjected to PCA analysis. The PCA analysis revealed distinct groups among the control and treatment groups (0.2 mM, 0.4 mM, and 0.8 mM) of *V. cholerae* O1. The contributions of PC1, PC2, and PC3 to the separation were approximately 100%, 87.27%, and 83.33%, respectively. (B) box and whiskers plot derived from PCA scores demonstrates that a significant ($p < 0.01$) separation of the control group from the other treatment groups.

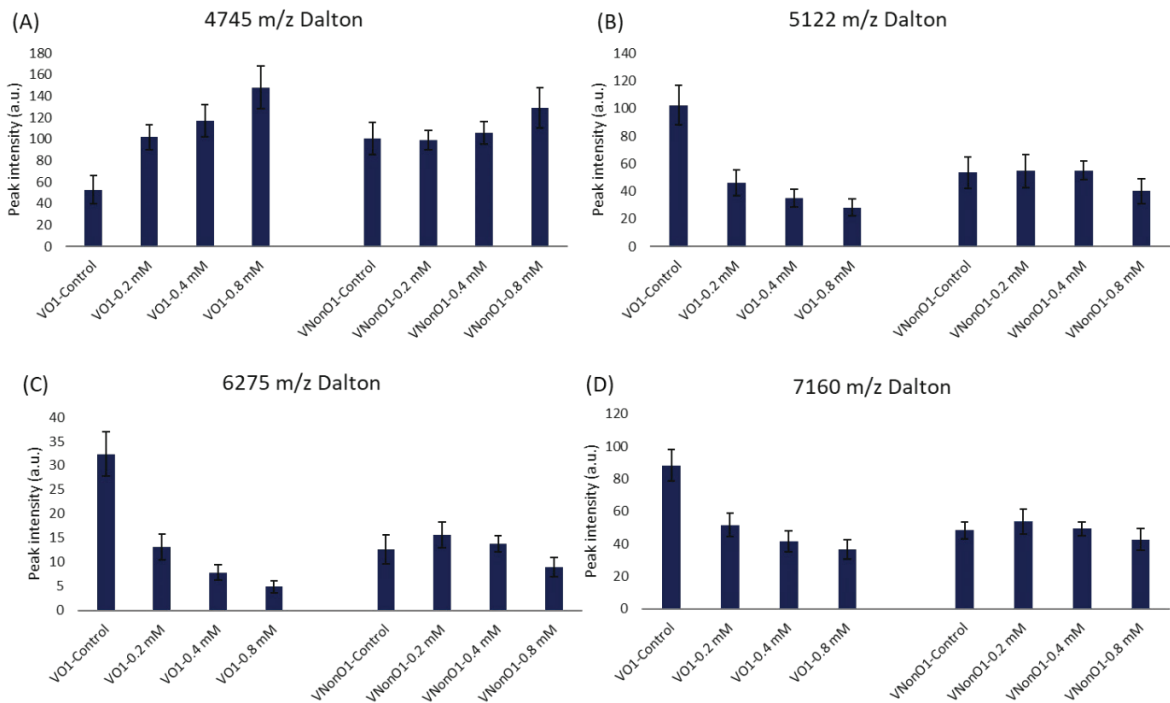


Fig. 4 Bar graph illustrating the four unique mass spectra peaks m/z 4745 (A), 5122 (B), 6275 (C) and 7160 (D) Dalton in response of *V. cholerae* O1 to 0.8 mM Zinc. These peaks were identified through ClinProTools analysis using W/KW statistics, with significance at $p < 0.05$. The selected peaks exhibit average peak intensity differences greater than 1.5-folds change, with intensities exceeding 30 a.u. The graph demonstrates a clear dose-response relationship between the intensity of peptides and zinc concentration ranging from 0.2 mM-0.8 mM. Importantly, these properties were exclusively observed in *V. cholerae* O1, suggesting that these peptides may be specific to the impact of zinc on this strain.

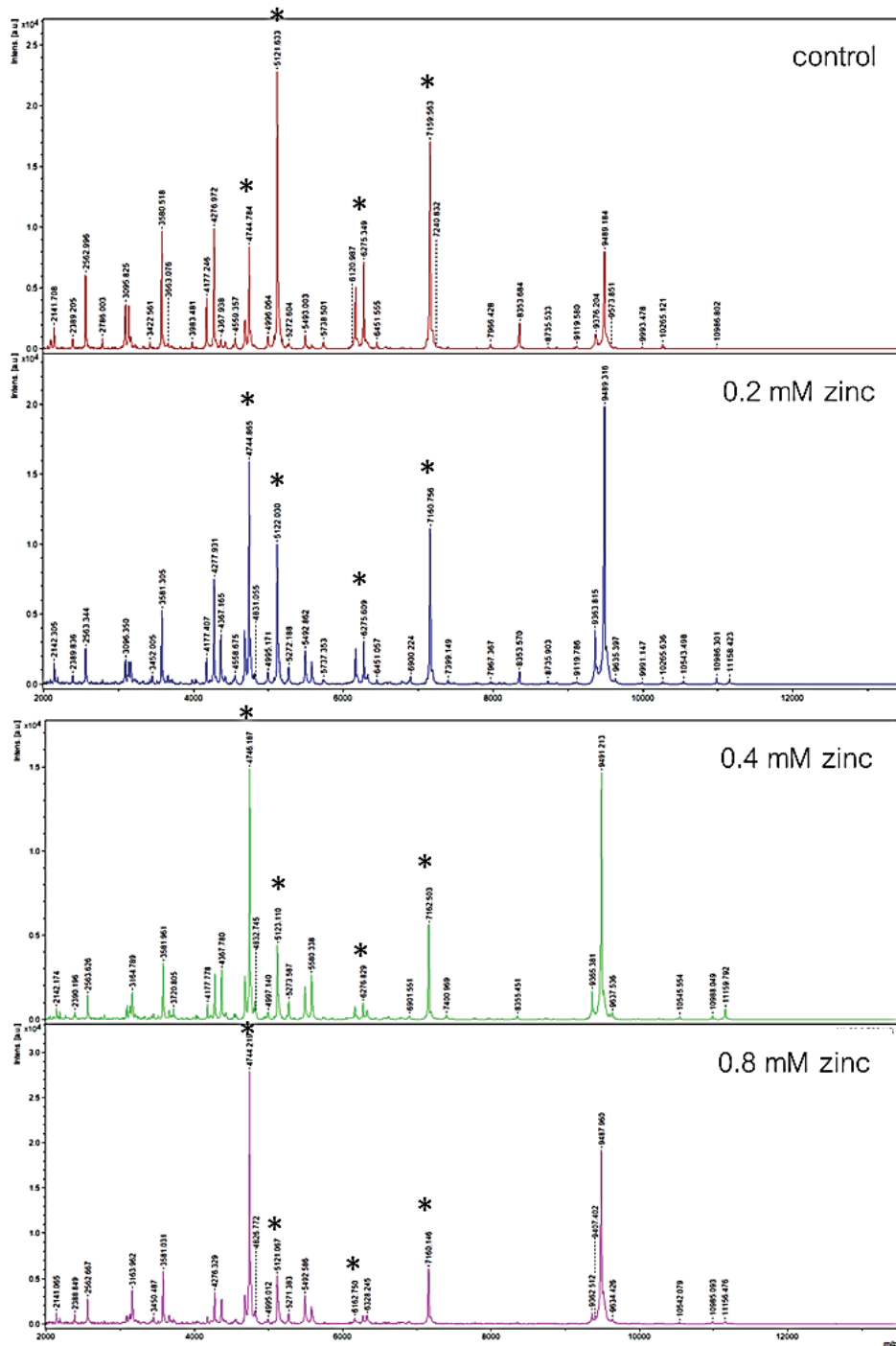


Fig. 5 The four unique mass spectra peaks (m/z 4745, 5122, 6275 and 7160 Dalton) in response of *V. cholerae* O1 to 0.8 mM Zinc. Asterisks represent difference of spectra peaks among control and zinc treatments.

วิจารณ์

MALDI-TOF MS เป็นเทคนิควิเคราะห์ที่แยกชีวโมเลกุลออกจากกันตามอัตราส่วนมวลต่อประจุ (mass-to-charge ratio; m/z) และบันทึกผลโดยใช้เวลาที่ชีวโมเลกุลนั้นๆ เดินทางไปยังตัวตรวจจับ (detector) รายงานผลเป็นสเปกตรัมของ spectra peaks โดยมีค่ามวลต่อประจุตามแกน x และความเข้มของสเปกตรัมตามแกน y เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของสเปกตรัมเพื่อแปลผลที่เป็นชนิดของชีวโมเลกุลนั้นๆ การประยุกต์ใช้ MALDI-TOF MS ในงานวินิจฉัยเชื้อจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย จะใช้เทคนิคนี้ในการวิเคราะห์โปรตีนสายสั้นๆ หรือเรียกว่า เปปไทด์จำนวนหนึ่งในเชื้อแบคทีเรีย ตามอัตราส่วนมวลต่อประจุ ผลสเปกตรัมหรือรูปแบบของเปปไทด์ที่ได้ จะมีความจำเพาะกับจีโนมและสปีชีส์ของแบคทีเรียนั้นๆ เปรียบเสมือนเป็นลายพิมพ์เปปไทด์ (peptide barcode) ทำให้สามารถนำรูปแบบเปปไทด์มาเทียบกับฐานข้อมูลรูปแบบเปปไทด์ของแบคทีเรียที่รู้จัก (known organism) ได้⁽¹⁶⁻¹⁸⁾ จากนั้นโปรแกรมจะนำข้อมูลที่ได้จากการเทียบกับฐานข้อมูล ทั้งในเชิงความเข้มของเปปไทด์และมวลต่อประจุมาคำนวณเป็นค่าคะแนนที่ใช้ในการระบุชนิดเชื้อจุลินทรีย์ โดยกำหนดช่วงคะแนนทั้งหมดอยู่ระหว่าง 0.00-3.00 โดยที่ค่าคะแนนที่ใช้ในการระบุชนิดเชื้อจุลินทรีย์ ≥ 1.9 จะใช้ในการระบุสปีชีส์ ค่าคะแนนที่ใช้ในการระบุชนิดเชื้อจุลินทรีย์ ระหว่าง 1.7-1.89 จะระบุได้เพียงจีโนม และค่าคะแนนที่ใช้ในการระบุชนิดเชื้อจุลินทรีย์ < 1.7 จะไม่สามารถระบุชนิดของแบคทีเรียได้^(19, 20) เนื่องจาก MALDI-TOF MS มีความไว และความแม่นยำสูง⁽¹⁷⁾ ทำให้สามารถจับการเปลี่ยนแปลงของระดับความเข้มและมวลของเปปไทด์ได้แม่นยำ โดยเห็นได้จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่รายงานว่าการ MALDI-TOF MS สามารถแยก *Burkholderia pseudomallei* สายพันธุ์ที่มี point mutation ใน

หลอดทดลอง (mutant isolates) ออกจากเชื้อที่ไม่มี mutation (wild-type) และยังสามารถระบุตำแหน่งเปปไทด์ที่มีความแตกต่างระหว่างสองสายพันธุ์นี้ได้ ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้แสดงการใช้ข้อมูลเปปไทด์ดังกล่าวเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarkers) ของเชื้อที่เกิด mutation ได้⁽²¹⁾ ปัจจุบันนี้จะเห็นว่ามีกรนำมา MALDI-TOF MS มาใช้ในการศึกษาหาเปปไทด์ที่มีความจำเพาะกับคุณสมบัติบางประการ เพื่อพัฒนาเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในงานทางจุลชีพต่าง ๆ เช่น ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพสำหรับระบุการดื้อยา และระบุสายพันธุ์เชื้อก่อโรค⁽²²⁾ ในการศึกษาครั้งนี้ นอกจากจะได้ศึกษาผลกระทบของสังกะสีต่อรูปแบบเปปไทด์แล้ว ยังได้ศึกษาหารูปแบบพื้นฐานเปปไทด์ของเชื้อ *V. cholerae* (Fig. 1) ซึ่งพบว่าผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบเปปไทด์พื้นฐานของเชื้อ *V. cholerae* ที่แยกจากตัวอย่างผู้ป่วยในประเทศเยอรมนี โดยเปปไทด์ดังกล่าวมีความจำเพาะกับเชื้อและเป็นเปปไทด์ที่มีความเข้มสูง จึงถูกเลือกให้เป็นเปปไทด์ markers ของเชื้อ *V. cholerae* โดยพบเปปไทด์ที่ใกล้เคียงกันกับงานวิจัยครั้งนี้คือ ที่ตำแหน่ง m/z 5125, 6168, 9368 และ 9493 ดาลตัน ซึ่งเป็นตำแหน่งของ 50S ribosomal protein L36, 50S ribosomal protein L32 และ DNA-binding protein HU- α (m/z) and β (m/z) ตามลำดับ ส่วนเปปไทด์ที่พบปริมาณน้อยหรือไม่พบเลยในงานวิจัยครั้งนี้ ได้แก่ m/z 6455, 9084, 10991 และ 10548 ดาลตัน ซึ่งเป็นตำแหน่งของ ribosomal protein L30, 30S ribosomal protein S16, integration host factor subunit α และ integration host factor subunit β ตามลำดับ⁽²³⁾ อย่างไรก็ตามจะเห็นว่าเพียง 4 เปปไทด์ที่มีตำแหน่งใกล้เคียงกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ ซึ่งอาจเป็นผลจากการเก็บชุดเปปไทด์จากหลากหลายสายพันธุ์รวมกันเป็นค่าเฉลี่ย ทำให้ได้ความเข้มของ

บางเปปไทด์ลดต่ำลงหรือขาดเคลื่อนไป นอกจากนี้จากผลการทดลองครั้งนี้ พบว่าเมื่อเปรียบเทียบเปปไทด์ที่แตกต่างกันระหว่างเชื้อ สายพันธุ์ *V. cholerae* O1 และ *V. cholerae* Non O1/Non O139 ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม PCA พบว่ารูปแบบเปปไทด์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (Fig. 3) จึงได้คัดเลือกเปปไทด์ที่แตกต่างกัน โดยพิจารณาถึงความเข้มข้นของเปปไทด์ เพื่อหลีกเลี่ยงสัญญาณรบกวน และมีความเข้มข้นที่มากกว่าหรือน้อยกว่าตัวเปรียบเทียบเท่ากับ 1.5 เท่า พบว่าเปปไทด์ที่สันนิษฐานว่าจะมีความจำเพาะกับเชื้อก่อโรค *V. cholerae* O1 ได้แก่ m/z 3095, 3163, 4177, 4745, 4177, 4277, 4818, 5122, 5272, 5494, 6164, 6275, 7160 และ 8353 ดาลตัน ซึ่งข้อมูลเปปไทด์เหล่านี้สามารถนำไปพัฒนาเพื่อประยุกต์ใช้ในการระบุแยกสายพันธุ์ *V. cholerae* O1 ออกจาก *V. cholerae* Non O1/Non O139 ต่อไป อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้ ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าเปปไทด์ดังกล่าวเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่ใช้แยกสองสายพันธุ์ออกจากกันได้ ยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป เช่น ทดสอบกับสายพันธุ์อื่นๆ ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียที่มีจีโนม สปีชีส์ ที่ใกล้เคียงกัน การประเมินกับเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างผู้ป่วย หรือสิ่งแวดล้อม

จากรายงานวิจัยหลายฉบับก่อนหน้านี้ แสดงให้เห็นว่า โลหะต่าง ๆ สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลในระดับ ยีน อาร์เอ็นเอ และโปรตีนของเชื้อจุลินทรีย์ได้ เช่น ผลของตะกั่วและแคดเมียม ทำให้พบโปรตีนที่ถูกทำให้เสียสภาพจากการเพิ่มขึ้นของ reactive oxygen species (ROS) รวมถึงการปรับตัวของแบคทีเรียต่อโลหะต่าง ๆ ผ่านกลไกที่แตกต่างกัน เช่น การผลักโลหะออกนอกเซลล์ (active transport of metal ions) การใช้ชีวโมเลกุลภายในเซลล์จับกับโลหะเพื่อลดพิษของโลหะ (intracellular sequestration)⁽²⁴⁾ ซึ่งกลไก

เหล่านี้ย่อมส่งผลให้เชื้อแบคทีเรีย มีการปรับตัว มีการผลิตหรือลดการแสดงออกของโปรตีนในการตอบสนองต่อกระบวนการดังกล่าว จึงทำให้เกิดข้อสันนิษฐานว่า ผลกระทบของโลหะต่าง ๆ เหล่านี้อาจส่งผลต่อการระบุชนิดแบคทีเรีย เมื่อวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF MS ได้ การทดลองครั้งนี้จึงได้วิเคราะห์ผลกระทบของสังกะสีต่อการระบุเชื้อที่มี ยีนก่อโรคที่สำคัญอย่าง *V. cholerae* O1 โดยเปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์ที่ไม่มียีนก่อโรค ได้แก่ *V. cholerae* Non O1/Non O139 โดยใช้ความเข้มข้นของสังกะสีที่ 0.2, 0.4 และ 0.8 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่น้อยกว่าค่า metal tolerance test (3.2 มิลลิโมลาร์) พบว่าสังกะสีมีผลต่อรูปแบบเปปไทด์ของเชื้อ *V. cholerae* ทั้งสองสายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Chudobova D. และคณะ ที่แสดงให้เห็นว่าสังกะสีทำให้รูปแบบเปปไทด์ของเชื้อ *Staphylococcus aureus* เปลี่ยนไปเมื่อวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF MS⁽²⁵⁾ อย่างไรก็ตาม ในงานวิจัยครั้งนี้พบว่าสังกะสีอาจยังไม่ส่งผลกระทบมากพอ หรือไม่มีผลต่อเปปไทด์หลักที่ใช้ในการระบุเชื้อ *V. cholerae* จึงยังทำให้ค่าคะแนนที่ใช้ในการระบุชนิดเชื้อจุลินทรีย์มีค่ามากกว่า 2 สามารถระบุ จินัส และสปีชีส์ ได้อย่างถูกต้อง สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่แสดงให้เห็นว่า แคดเมียมมีผลต่อการเปลี่ยนรูปแบบเปปไทด์ของเชื้อ *E. coli* O157:H7 แต่ยั้งระบุจินัส และสปีชีส์ ได้อย่างถูกต้อง⁽¹⁴⁾ แม้ว่าการทดลองนี้สังกะสีจะยังไม่ส่งผลกระทบต่อการระบุจินัส และสปีชีส์ แต่เมื่อพิจารณาการคำนวณด้วยโปรแกรม PCA ซึ่งเป็นการคำนวณผลจากรูปแบบเปปไทด์ของเชื้อ ในภาวะที่มีความเข้มข้นของความเข้มข้นต่าง ๆ (Fig. 2 และ Fig. 3) จะพบว่าการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวมีค่าลดลงตามความเข้มข้นของสังกะสีที่เพิ่มขึ้น (dose response effects) ซึ่งสอดคล้องกับค่าคะแนนที่ใช้ในการระบุชนิดเชื้อ

จุลชีพที่มีแนวโน้มลดลงตามความเข้มข้นของสังกะสีที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน จึงสันนิษฐานได้ว่าการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวน่าจะมีความสัมพันธ์กับกลไกการทำงานภายในเซลล์ของเชื้อที่ตอบสนองต่อสังกะสีโดยตรง สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่าสังกะสีมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชีวโมเลกุลต่าง ๆ ภายในเซลล์ เพื่อให้เกิดกระบวนการปรับตัวของเชื้อ เช่น สังกะสีมีผลลดการเคลื่อนที่ (motility) การเกาะติดลำไส้ (adhesion) การผลิตพิษ (toxin production) ของเชื้อ⁽⁹⁾ และนอกจากนี้ยังมีรายงานว่า สังกะสีที่ความเข้มข้น 0.03 ถึง 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton (MH) agar สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค *V. cholerae* ได้ รวมถึงเชื้อก่อโรคอื่น ๆ ที่แยกได้จากอุจจาระผู้ป่วยโรคทางเดินอาหาร เช่น *Salmonella*, Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) และ *Shigella*⁽²⁶⁾ สังกะสีมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยเชื้อนำเข้าสังกะสีผ่านโปรตีน transporters หลายชนิด และมีรายงานว่า ZnuABC และ ZrgABCDE เป็นโปรตีน transporters ที่ช่วยเรื่องการปรับสมดุลระดับสังกะสี (zinc homeostasis) ภายในเซลล์ รวมถึงยังเป็นปัจจัยสำหรับการก่อโรคและการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนของเชื้ออีกด้วย⁽²⁷⁾ จากข้อมูลงานวิจัยต่าง ๆ ข้างต้นแสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงในระดับต่าง ๆ ของเซลล์ต่อสังกะสี อย่างไรก็ตามยังไม่มีการอธิบายกลไกที่เกี่ยวกับกระบวนการทางชีววิทยาต่าง ๆ ได้ชัดเจน จึงยังต้องทำการศึกษาต่อไป นอกจากนี้จากผลการทดลอง (Fig. 3) พบว่าสังกะสีมีผลต่อเชื้อ *V. cholerae* O1 มากกว่าเชื้อ *V. cholerae* Non O1/Non O139 จึงเป็นข้อมูลที่แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ที่แตกต่างกันเป็นตัวแทนหนึ่งที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์ของเครื่อง MALDI-TOF MS ในภาวะที่มีการรบกวนจากสังกะสี

นอกจากนี้จากผลการทดลองพบว่าสังกะสีที่ความเข้มข้น 0.8 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้การระบุสายพันธุ์หรือ strain ของเชื้อที่ *V. cholerae* O1 ผิดไป กล่าวคือ มีรูปแบบเปปไทด์เปลี่ยนไปเหมือนเชื้อที่ไม่มีเชื้อก่อโรค *V. cholerae* Non O1/Non O139 ซึ่งสอดคล้องกับ ค่าคะแนนที่ใช้ในการระบุชนิดเชื้อจุลชีพ (Fig. 2) และรูปแบบเปปไทด์ที่เปลี่ยนแปลงจนสามารถแยกจากกลุ่มควบคุม (Fig. 3) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นผู้วิจัยจึงวิเคราะห์หาเปปไทด์ที่มีความจำเพาะกับผลของสังกะสีในเชื้อ *V. cholerae* O1 โดยพิจารณาเปปไทด์ที่มีความเข้มข้นเปปไทด์เพิ่มขึ้นหรือลดลงเทียบกับกลุ่มควบคุม 1.5 เท่า มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะ dose response effects และ ไม่พบลักษณะ dose response effects ในเชื้อ *V. cholerae* Non O1/Non O139 จากผลการทดลองพบว่าเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติดังกล่าวข้างต้นประกอบด้วย m/z 4745, 5122, 6275 และ 7160 คาลตัน (Fig. 4) ซึ่งเปปไทด์เหล่านี้ สามารถพัฒนาให้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ ในการระบุการมีสังกะสีปนเปื้อนในสิ่งส่งตรวจต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์เชื้อก่อโรค *V. cholerae* O1 ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS โดยสามารถนำชุดเปปไทด์ที่ได้จากการทดลองนี้บรรจุในฐานข้อมูลของเครื่อง MALDI-TOF MS เพื่อใช้ในงานประจำและงานวิจัยต่อไป

เพื่อการประเมินระดับสังกะสีที่ประชาชนมีโอกาสบริโภคในแต่ละวันและการใช้สังกะสีในวัตถุประสงค์ต่าง ๆ เช่น ในอาหารเสริม หรือช่วยรักษาอาการท้องร่วง ผู้วิจัยจึงได้เทียบความเข้มข้นของสังกะสีที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้กับปริมาณสังกะสีที่บริโภคในแต่ละวัน และพบว่า ในการทดลองนี้ใช้สังกะสีที่ความเข้มข้น 0.8 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเมื่อนำมาคำนวณพบว่า มีค่าเท่ากับสังกะสี 52.3 มิลลิกรัม ในน้ำ 1 ลิตร เมื่อพิจารณาปริมาณของสังกะสีที่คาดว่าจะพบได้ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ โดยพิจารณา

ปริมาณน้ำในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์พบข้อมูลระบุว่าลำไส้สามารถมีน้ำได้ประมาณ 1-1.5 ลิตร ขึ้นอยู่กับส่วนต่างๆ ของทางเดินอาหาร^(28, 29) ส่วนการพิจารณาสังกะสีที่สามารถพบได้ในระบบลำไส้หรืออุจจาระจะมีปริมาณมากหรือน้อย ขึ้นกับปัจจัยต่างๆ ร่วมด้วย เช่น การหลั่งสังกะสี (endogenous zinc) จากร่างกายสู่ลำไส้เล็ก ซึ่งมีการสำรวจพบว่าในคนปกติที่เป็นผู้ใหญ่ 29 รายในสหรัฐอเมริกา มีสังกะสีในอุจจาระประมาณ 2.67 ถึง 19.5 มิลลิกรัมต่อ 24 ชั่วโมง และพบว่า มี 2 ตัวอย่างที่พบว่ามีระดับสังกะสีเพิ่มขึ้นมากถึง 190 มิลลิกรัม สาเหตุจากการบริโภคหอยนางรม 8 ตัว ใน 1 มื้ออาหารก่อนตรวจวัดค่าสังกะสีในอุจจาระประมาณ 13 ชั่วโมง⁽³⁰⁾ ปัจจัยที่สองคือการดูดซึมสังกะสีในลำไส้ และปัจจัยที่เกี่ยวกับชนิดของอาหาร การบริโภคอาหารที่มีปริมาณสังกะสีสูง เช่น เนื้อสัตว์ หอยนางรม ก็จะทำให้ค่าสังกะสีในอุจจาระสูงขึ้นด้วย โดยมีรายงานวิจัยที่สำรวจปริมาณสังกะสีที่ได้รับจากอาหารของคนญี่ปุ่นพบว่า มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 10.8 มิลลิกรัม ในเพศชาย และ 9.5 มิลลิกรัม ในเพศหญิง⁽³¹⁾ ในอาหารเสริมที่ขายทั่วไปจะมีค่าสังกะสีเท่ากับ 15-20 มิลลิกรัม และปริมาณที่ใช้รับประทานกรณีผู้ขาดสังกะสีและรักษาสิวเท่ากับ 50 มิลลิกรัม สำหรับการรักษาโรคท้องร่วงในเด็กองค์การอนามัยโลกกำหนดให้ใช้สังกะสี 10 ถึง 20 มิลลิกรัมต่อวันนาน 10 ถึง 14 วัน⁽¹¹⁾ จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นว่าการบริโภคอาหารประจำวัน การหลั่งสังกะสีจากร่างกายสู่ลำไส้เล็ก การใช้สังกะสีในการรักษาโรคหรือบรรเทาอาการของโรค และการได้รับสังกะสีจากอาหารเสริม เป็นตัวอย่างในการพิจารณาปริมาณสังกะสีที่สามารถได้รับพร้อมๆ กัน จากหลายแหล่งและหลายปัจจัย ซึ่งอาจทำให้มีระดับความเข้มข้นรวมของสังกะสีใกล้เคียงกับความเข้มข้นที่ส่งผลกระทบต่อการทำงานของเชื้อ *V. cholerae* O1 ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS ที่พบในการทดลองนี้คือ สังกะสีที่ความ

เข้มข้น 52.3 มิลลิกรัม ในน้ำ 1 ลิตร อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ไม่ได้ประเมินปัจจัยต่างๆ ที่อาจทำให้ความเข้มข้นของสังกะสีในระบบทางเดินอาหารคลาดเคลื่อนจากการคำนวณข้างต้น เช่น ชนิดและปริมาณอาหารที่สามารถจับกับสังกะสีได้ การทำงานของเซลล์เยื่อบุลำไส้ในการดูดซับสังกะสี ยีนหรือพันธุกรรมของจุลินทรีย์ทั้งหมดที่อาศัยอยู่ในร่างกาย (gut microbiome) รวมทั้งปริมาณน้ำที่ดื่มในแต่ละบุคคล ที่อาจมีผลต่อปริมาณสังกะสีในลำไส้

สรุป

สังกะสีมีผลต่อการวิเคราะห์รูปแบบเปปไทด์ของเชื้อ *V. cholerae* ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS โดยทำให้ค่าคะแนนในการระบุเชื้อจุลินทรีย์มีแนวโน้มลดลง ทั้งสายพันธุ์ที่มียีนก่อโรค *V. cholerae* O1 และไม่มียีนก่อโรค *V. cholerae* Non O1/Non O139 พบว่าสังกะสีที่ความเข้มข้น 0.8 มิลลิโมลาร์ มีผลทำให้รูปแบบเปปไทด์ของเชื้อ *V. cholerae* O1 เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญมากที่สุด ส่งผลให้มีการระบุสายพันธุ์คลาดเคลื่อน คือระบุสายพันธุ์ก่อโรคเป็นสายพันธุ์ไม่ก่อโรค และพบเปปไทด์ที่ตำแหน่ง m/z 4745, 5122, 6275 และ 7160 ดาลตัน มีความจำเพาะกับการตอบสนองของเชื้อต่อสังกะสีในเชื้อ *V. cholerae* O1 ทั้งนี้สังกะสีมีผลกระทบต่อการทำงานของสายพันธุ์เท่านั้น โดยยังสามารถระบุจีโนมและสปีชีส์ได้ถูกต้อง ซึ่งผลงานวิจัยนี้จะเป็นข้อมูลสำคัญในการเฝ้าระวังปัจจัยที่มีผลต่อการวิเคราะห์จุลินทรีย์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS รวมถึงการนำไปใช้ในการปรับปรุงค่าคะแนนในการระบุเชื้อจุลินทรีย์ให้ถูกต้องมากขึ้นในภาวะที่มีการรบกวนจากสังกะสี เช่น การสร้างฐานข้อมูลระบุรูปแบบเปปไทด์ที่จำเพาะกับสังกะสี เพื่อหลีกเลี่ยงการระบุสายพันธุ์ที่ผิดพลาด และสามารถนำไปพัฒนาเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในภาวะที่เชื้อได้รับสังกะสีต่อไป นอกจากนี้ยังพบเปปไทด์ที่แตกต่างกัน

ระหว่างสายพันธุ์ที่มีถิ่นก่อโรค *V. cholerae* O1 และไม่มีถิ่นก่อโรค *V. cholerae* Non O1/Non O139 จำนวน 13 เปปไทด์ ซึ่งจะเป็นข้อมูลเบื้องต้น ในการระบุเชื้อ *V. cholerae* ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบคุณ บุคลากรในคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ศูนย์เทคนิคการแพทย์และรังสีเทคนิคนานาชาติ ศูนย์การแพทย์กาญจนาภิเษก มหาวิทยาลัยมหิดล และภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ให้การสนับสนุนอย่างดี และอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Azman AS, Rudolph KE, Cummings DA, *et al.* The incubation period of cholera: a systematic review. *J Infect* 2013; 66: 432-8.
2. Kimberlin DW, Brady MT, Jackson MA, Long SS. *Vibrio* infections. *American Academy of Pediatrics*; 2015: p. 860-3.
3. Loharikar AR, Menon MP, Tauxe RV, Mintz ED. *Principles and practice of pediatric infectious diseases*. 4th ed. New York, NY: Elsevier Saunders; 2012: 849-54.
4. Ali M, Lopez AL, You YA, *et al.* The global burden of cholera. *Bull World Health Organ* 2012; 90: 209-18A.
5. Epidemiology Bureau, Department of Disease Control, Ministry of Public Health. Summary of the analysis guidelines for the surveillance system of the five groups of diseases in five dimensions in the year 2016: Results of the risk analysis of abnormal events in public health. Available from: https://ddc.moph.go.th/doe/journal_detail.php?publish=10165
6. Ziegler TR, Evans ME, Fernandez-Estivariz C, Jones DP. Trophic and cytoprotective nutrition for intestinal adaptation, mucosal repair, and barrier function. *Annu Rev Nutr* 2003; 23: 229-61.
7. Oforka N, Osuji L, Onwuachu U. Estimation of dietary intake of cadmium, lead, manganese, zinc and nickel due to consumption of chicken meat by inhabitants of Port-Harcourt Metropolis, Nigeria. *Arch Appl Sci Res* 2012; 4: 675-84.
8. Canani RB, Cirillo P, Buccigrossi V, *et al.* Zinc inhibits cholera toxin-induced, but not *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin-induced, ion secretion in human enterocytes. *JID* 2005; 191: 1072-7.
9. Bhattaram V, Upadhyay A, Yin HB, Mooyottu S, Venkitanarayanan K. Effect of dietary minerals on virulence attributes of *Vibrio cholera*. *Front Microbiol* 2017; 8: 911. doi: 10.3389/fmicb.2017.00911.
10. WHO/UNICEF Joint statement. Clinical management of acute diarrhea. Available from: https://www.unicef.org/publications/files/ENAcute_Diarrhoea_reprint.pdf [cited 13 January 2023]. Available from: https://www.who.int/publications/item/WHO_FCH_CAH_04.7

11. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Virdi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol* 2015;6: 791.doi:0.3389/fmicb.2015.00791.
12. Steensels D, Verhaegen J, Lagrou K. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of bacteria and yeasts in a clinical microbiological laboratory. *Acta Clin Belg* 2011; 66: 267-73.
13. Chudobova D, Dostalova S, Ruttkay-Nedecky B, *et al.* The effect of metal ions on *Staphylococcus aureus* revealed by biochemical and mass spectrometric analyses. *Microbiol Res* 2015; 170: 147-56. doi: 10.1016/j.micres.2014.08.003.
14. Wongprasert K, Pannengpetch P, Kumar T, Songthong P, Indrawattana N, Isarankura-Na-Ayudhya P. Effects of cadmium on peptide profiles and Biotyper score value of *Escherichia coli* O157:H7 identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass-spectrometry (MALDI-TOF/MS). *J Med Tech Assoc Thailand* 2020; 48: 7264-80
15. Laengsri V, Nuchnoi P, Isarankura-Na-Ayudhya C, Isarankura-Na-Ayudhya P. Proteomics and bioinformatics analysis reveal potential roles of cadmium-binding proteins in cadmium tolerance and accumulation of *Enterobacter cloacae*. *Peer J* 2019; 7: e6904.doi: 10.7717/peerj.6904.
16. Dec M, Puchalski A, Urban-Chmiel R, Wernicki A. 16S-ARDRA and MALDI-TOF mass spectrometry as tools for identification of *Lactobacillus* bacteria isolated from poultry. *BMC Microbiol* 2016; 16: 105.
17. Dilger T, Melzl H, Gessner A. Rapid and reliable identification of waterborne *Legionella* species by MALDI-TOF mass spectrometry. *Microbiological Meth* 2016; 127: 154-9.
18. Suarez S, Ferroni A, Lotz A, *et al.* Ribosomal proteins as biomarkers for bacterial identification by mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. *Microbiol Meth* 2013; 94: 390-6.
19. Pineda FJ, Antoine MD, Demirev PA, *et al.* Microorganism identification by matrix-assisted laser/desorption ionization mass spectrometry and model-derived ribosomal protein biomarkers. *Anal Chem* 2003; 75: 3817-22.
20. Schulthess B, Brodner K, Bloemberg GV, Zbinden R, Böttger EC, Hombach M. Identification of Gram-positive cocci by use of matrix-assisted laser desorption-time of flight mass spectrometry: comparison of different preparation methods and implementation of a practical algorithm for routine diagnostics. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 1834-40.

21. Niyompanich S, Srisanga K, Jaresitthikunchai J, Roytrakul S, Tungpradabkul S. Utilization of whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry to differentiate *Burkholderia pseudomallei* wild-type and constructed mutants. PloS one 2015; 10: e0144128. doi.org/10.1371/journal
22. Paauw A, Trip H, Niemcewicz M. *et al.* OmpU as a biomarker for rapid discrimination between toxigenic and epidemic *Vibrio cholerae* O1/O139 and non-epidemic *Vibrio cholerae* in a modified MALDI-TOFMS assay. BMC Microbiology 2014; 14: 158. doi.org/10.1186/1471-2180-14-158.
23. Schirmeister F, Dieckmann R, Bechlars S, Bier N, Faruque SM, Strauch E. Genetic and phenotypic analysis of *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 isolated from German and Austrian patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2014; 33: 767-78. doi: 10.1007/s10096-013-2011-9
24. Ianeva OD. Mechanisms of bacteria resistance to heavy metals. Mikrobiol Z 2009; 71: 54-65.
25. Chudobova D, Dostalova S, Ruttkay-Nedecky B, *et al.* The effect of metal ions on *Staphylococcus aureus* revealed by biochemical and mass spectrometric analyses. Microbiol Res 2015; 170: 147-56. doi: 10.1016/j.micres.2014.08.003.
26. Faiz U, Butt T, Satti L, Hussain W, Hanif F. Efficacy of zinc as an antibacterial agent against enteric bacterial pathogens. J Ayub Med Coll Abbottabad 2011; 23: 18-21.
27. Sheng Y, Fan F, Jensen O, *et al.* Dual zinc transporter systems in *Vibrio cholerae* promote competitive advantages over gut microbiome. Infect Immun 2015; 83: 3902-8. doi: 10.1128/IAI.00447-15.
28. Arnoldini M, Cremer J, Hwa T. Bacterial growth, flow, and mixing shape human gut microbiota density and composition. Gut Microbes 2018; 9: 559-66. doi: 10.1080/19490976.2018.1448741.
29. Ma T, Verkman AS. Aquaporin water channels in gastrointestinal physiology. J Physiol 1999; 517: 317-26. doi: 10.1111/j.1469-7793.
30. Drinker KR, Fehnel JW, Marsh M. The normal excretion of zinc in the urine and feces of man. J Biol Chem 1927; 72: 375-83.
31. Teramoto K, Horiguchi S, Ninomiya K. Zinc content in Japanese food and estimated average daily intake. Asia Pac J Public Health 1987; 1: 32-42. doi: 10.1177/101053958700100306.

Comparison of Modified Fite-Faraco Staining, Auramine O Staining and Real-Time Polymerase Chain Reaction with Standard Staining Methods for Detection of *Mycobacterium leprae* in Slit-Skin Samples

Patisaya Tassanatailak¹, Thaval Rerksngarm² and Wimolpak Sriwai^{3*}

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

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

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

Abstract

Detection of *Mycobacterium leprae* by modified Fite-Faraco (FF), fluorescent Auramine O (AO) method, real-time polymerase chain reaction (PCR) of *Pra* gene and the standard Ziehl Neelsen (ZN) staining were compared in slit-skin samples from 32 leprosy patients attending the Raj Pracha Samasai Institute. Scraped incision method was performed to collect tissue fluid and dermal tissue from the same 4 sites including two from both ear lobes and two from the active lesions. Slit-skin smears (SSS) were prepared and stained by ZN, FF and AO methods. The collected specimens were evaluated for the present of *Pra* gene using real-time PCR method. Fite-Faraco was modified by omitting the deparaffinization instead submerge the slide in soybean oil for 10 minutes. There was a very good correlation among all methods. Out of 32 samples, 7 showed organisms by ZN method, 9 showed organisms by FF method, 11 showed organisms by AO method and 9 showed organisms by real-time PCR method. FF and AO stains were found to be superior to ZN in detecting leprae bacilli in SSS. Moreover, sensitivity was identical for real-time PCR, FF, and AO methods for multibacillary (MB) cases suggesting that real-time PCR, FF and AO techniques on the SSS could replace ZN without any loss of sensitivity. FF procedure uses simple equipment, easy to carry out, and convenient procedure. Therefore, the

*Corresponding author E-mail address: swimol@yahoo.com, sriwai@tu.ac.th

modified Fite-Faraco method described here can be used for the confirmation of the clinical diagnosed case of leprosy in resource-limited hospitals.

Keywords: Slit-skin smear, Acid fast bacilli staining, Fluorescence, Leprosy, Modified Fite-Faraco, Real-time PCR

การเปรียบเทียบวิธีการย้อมสี Modified Fite-Faraco การย้อมสี Auramine O และวิธี Real-Time PCR กับการย้อมสีด้วยวิธีมาตรฐาน ในการตรวจหาเชื้อ *Mycobacterium leprae* ในตัวอย่างที่เก็บจากการกรีดผิวหนัง

พริศยา ทศนไตรลักษณ์¹ ถวัลย์ ฤกษ์งาม² และ วิมลพัชร์ ศรีไวย^{3*}

¹บัณฑิตศึกษา สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี

²สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยปทุมธานี จังหวัดปทุมธานี

³ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี

บทคัดย่อ

การเปรียบเทียบวิธีการตรวจหาเชื้อ *Mycobacterium leprae* โดยวิธีการย้อมสี modified Fite-Faraco (FF) วิธี fluorescent Auramine O (AO) และการตรวจหา *Pra* gene ด้วยวิธี real-time PCR กับการย้อมสีด้วยวิธีมาตรฐาน Ziehl Neelsen (ZN) ในผู้ป่วยโรคเรื้อน 32 ราย ที่เข้ารับการรักษาโรคเรื้อนที่สถาบันราชประชาสมาสัย โดยชุดเก็บตัวอย่างสารน้ำและเนื้อเยื่อผิวหนังโดยการกรีดผิวหนังรายละ 4 ตำแหน่ง คือ ดึงหูทั้ง 2 ข้างและรอยโรคที่กำลังเริ่มมากที่สุดอีก 2 ตำแหน่ง เตรียมสไลด์จากตัวอย่างที่เก็บจากการกรีดผิวหนัง (slit-skin smear: SSS) ย้อมสีด้วยวิธี ZN, FF และ AO และตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อเยื่อด้วยวิธี real-time PCR เพื่อตรวจหา *Pra* gene การศึกษาครั้งนี้ได้ปรับวิธี FF ด้วยการลดขั้นตอน deparaffinization ไปเป็นการแช่สไลด์ในน้ำมันถั่วเหลืองอย่างเดียวยาวที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ผลการศึกษาพบว่าวิธี ZN, FF, AO และ real-time PCR มีความสอดคล้องกันในระดับดีมาก โดยพบว่าวิธี ZN, FF และ AO ให้ผลบวกกับตัวอย่าง 7, 9 และ 11 ราย จากตัวอย่าง 32 ราย ตามลำดับ และเมื่อตรวจด้วยวิธี real-time PCR พบ *M. leprae* ใน 9 ตัวอย่าง และยังพบว่าวิธี FF และ AO มีประสิทธิภาพดีกว่าวิธี ZN ในการตรวจวินิจฉัยโรคเรื้อนจาก SSS นอกจากนี้ยังพบว่าวิธี FF, AO และ real-time PCR มีความไวเท่ากันในการตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยเรื้อน ผลดังกล่าวจึงสรุปได้ว่า วิธี FF, AO และ real-time PCR สามารถใช้ทดแทนวิธี ZN ในการตรวจวินิจฉัยโรคเรื้อนจากตัวอย่างที่เก็บจากการกรีดผิวหนังโดยไม่สูญเสียความไวในการตรวจ วิธี FF ใช้เครื่องมือราคาถูกกว่า สะดวก และง่ายสำหรับการตรวจวัด ดังนั้นการย้อมสีด้วยวิธี FF จึงสามารถใช้เป็นวิธีการสำหรับช่วยยืนยันผู้มีอาการแสดงที่สงสัยว่าเป็นโรคเรื้อนโดยเฉพาะอย่างยิ่งในโรงพยาบาลที่มีทรัพยากรจำกัด

คำสำคัญ: การกรีดผิวหนัง การย้อมสีแบบที่เรียกว่าแพ่งติดสีทนกรด ฟลูออเรสเซนต์ โรคเรื้อน Modified Fite-Faraco, Real-time PCR

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: swimol@yahoo.com, sriwai@tu.ac.th

บทนำ

โรคเรื้อนเป็นโรคติดต่อเรื้อรังเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) ทำให้เกิดรอยโรคที่ผิวหนังและเส้นประสาทส่วนปลาย อาการแสดงของผู้ป่วยโรคเรื้อนมีความรุนแรงแตกต่างกันขึ้นกับระดับภูมิคุ้มกันต้านทานต่อโรคเรื้อนของแต่ละบุคคล หากมีการตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่ต่ำอาการมักไม่รุนแรง ส่วนผู้ที่มีการตอบสนองของภูมิคุ้มกันไม่ต่ำมักแสดงอาการของโรคที่รุนแรง ผู้ป่วยกลุ่มนี้หากไม่ได้รับการรักษาหรือวินิจฉัยล่าช้าอาจนำไปสู่ความพิการทางร่างกายได้ในที่สุด⁽¹⁾ ดังนั้นการวินิจฉัยที่ถูกต้องและแม่นยำตั้งแต่เริ่มปรากฏอาการของโรคเรื้อนจึงมีความสำคัญต่อประสิทธิภาพการรักษา ซึ่งการวางแผนการรักษาโรคเรื้อนจะขึ้นกับอายุของผู้ป่วยและประเภทของโรคเรื้อนตามเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก^(2, 3) ซึ่งได้จำแนกประเภทผู้ป่วยโรคเรื้อนตามจำนวนของรอยโรคที่ผิวหนังเป็น 2 ประเภท คือ ผู้ป่วยเชื้อมาก (paucibacillary: PB) และผู้ป่วยเชื้อน้อย (multibacillary: MB) หากตรวจพบเชื้อโรคเรื้อนจากวิธี slit-skin smear (SSS) ผู้ป่วยจะถูกจำแนกเป็น MB โดยไม่คำนึงถึงจำนวนรอยโรคที่ผิวหนัง ผู้ป่วยเชื้อมาก (PB) และผู้ป่วยเชื้อน้อย (MB) จะได้รับการรักษาด้วยยาสูตรผสม (multi-drug therapy: MDT) ได้แก่ dapsone, rifampicin และ clofazimine นาน 6 เดือนและ 12 เดือน ตามลำดับ⁽⁴⁾

การตรวจวินิจฉัยโรคเรื้อนทางห้องปฏิบัติการยังมีความจำเป็นเพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคเรื้อนในรายที่ยังไม่ปรากฏอาการชัดเจนและใช้ในการติดตามการตอบสนองต่อการรักษา การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อวินิจฉัยโรคเรื้อนมีหลายวิธี ได้แก่ การตรวจวินิจฉัยทางภูมิคุ้มกัน (immunodiagnostic test) ตัวอย่างเช่น การทดสอบหาแอนติบอดีจำเพาะต่อ phenolic glycolipid-I (PGL-I)⁽⁵⁾ แต่เนื่องจาก การตรวจวินิจฉัยทางภูมิคุ้มกันมีความไวและความ

จำเพาะต่ำ⁽⁶⁾ จึงมีการนำวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมจาก DNA ของเชื้อ *M. leprae* มาใช้ วิธี PCR-based system มีความไวและความจำเพาะสูง^(7, 8) สามารถจำแนก *M. leprae* ออกจากมัยโคแบคทีเรียชนิดอื่นได้และยังสามารถใช้วินิจฉัยโรคเรื้อนในผู้ป่วยที่สงสัยว่าเป็นโรคเรื้อนระยะแรกที่มีการตรวจชิ้นเนื้อเป็นลบหรือที่สรุปไม่ได้ (inconclusive)⁽⁹⁾ แต่มีข้อจำกัด คือ การตรวจพบสารพันธุกรรมไม่ได้บ่งบอกการมีชีวิตของเชื้อ *M. leprae* การตรวจวินิจฉัยทางภูมิคุ้มกันและวิธี PCR เป็นวิธีการที่มีความซับซ้อนต้องใช้เครื่องมือราคาแพง ใช้ทักษะและความชำนาญของผู้ปฏิบัติงานเป็นอย่างดี ทำให้ไม่สะดวกในการปฏิบัติในโรงพยาบาลทั่วไป

การตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียรูปแท่งดัดสีทนกรด (acid fast bacilli: AFB) ด้วยกล้องจุลทรรศน์เป็นวิธีที่รวดเร็ว ง่าย และใช้เครื่องมือราคาแพงน้อยที่สุดสำหรับการวินิจฉัยโรคเรื้อนเมื่อเทียบกับวิธีอื่น ๆ ที่กล่าวมา การตรวจ AFB เป็นการตรวจหาเชื้อจากผิวหนังบริเวณรอยโรค (skin biopsy) และใช้เป็นวิธีสำหรับยืนยันโรคเรื้อนในผู้ที่มีการแสดงที่สงสัยว่าเป็นโรคเรื้อน เนื่องจากการทำ biopsy มีความเสี่ยงในขั้นตอนการทำหัตถการทำให้เกิดรอยแผลเป็นได้ และยังต้องใช้บุคลากรที่มีทักษะและความชำนาญในการเก็บตัวอย่าง การตรึงตัวอย่าง การเตรียมและการแปลผล ดังนั้นในโรงพยาบาลส่วนใหญ่จึงนิยมใช้การตรวจด้วยวิธี SSS ที่มีเทคนิคที่ไม่ยุ่งยากและใช้วัสดุอุปกรณ์ไม่มาก เพื่อนำเนื้อเยื่อผิวหนังไปตรวจหาเชื้อแทนการตัดชิ้นเนื้อ ตัวอย่างที่ได้จากการทำ SSS จะถูกนำไปย้อมด้วยเทคนิคต่าง ๆ เพื่อตรวจหาเชื้อ *M. leprae* วิธีย้อมดั้งเดิมที่นิยมใช้ ได้แก่ วิธี Ziehl-Neelsen⁽¹⁰⁾ ใช้หลักการ acid fast stain โดยใช้ความร้อนช่วยให้สี carbol fuchsin สามารถแทรกซึมผ่านผนังเซลล์ของเชื้อ *M. leprae* ได้⁽¹¹⁾ ซึ่งจะพบตัวเชื้อติดสีแดงบนพื้นหลังติดสีน้ำเงิน การย้อมด้วยวิธี

ZN นั้นสามารถใช้การตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยโรคเรื้อนเชื้อมากได้และมีความจำเพาะสูง⁽¹²⁾ แต่มีข้อเสีย คือมีความไวน้อยกว่าวิธีการอื่นและให้ผลการทดสอบเป็นลบลงในผู้ป่วยโรคเรื้อนเชื่อน้อยได้^(12, 13) ในประเทศไทย ผู้ป่วยที่สงสัยว่าเป็นโรคเรื้อนทุกรายจะได้รับการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพิ่มเติมโดยวิธี SSS และย้อมสีด้วยวิธี ZN เพื่อช่วยในการวินิจฉัยแบ่งประเภท และวางแผนการรักษาต่อไป ส่วนการตรวจทางพยาธิวิทยาจาก biopsy จะทำในรายที่อาการแสดงไม่ชัดเจนเท่านั้น โดยส่งตรวจที่เป็นตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ได้จากการทำ biopsy มักนิยมใช้การย้อมสีด้วยวิธี Fite-Faraco ที่พัฒนามาจากวิธี Kinyoun⁽¹²⁾ เนื่องจากเชื้อ *M. leprae* มีความทนกรดและแอลกอฮอล์น้อยกว่า *M. tuberculosis* มาก และมีแนวโน้มที่จะสูญเสียคุณสมบัติความทนกรด จึงทำให้มีโอกาสตรวจไม่พบเชื้อได้ง่าย ดังนั้นวิธี modified Fite-Faraco (FF) จึงได้ผสมน้ำมันถั่วเหลือง (soybean oil) กับสารทำลายพาราฟิน (deparaffinizing solvent) เพื่อช่วยเคลือบปกป้องผนังเซลล์ของแบคทีเรียและลดการสัมผัสกับสารละลายพาราฟิน ทำให้ยังคงคุณสมบัติความทนกรดไว้ได้ วิธีนี้จึงมีความไวสูงและสามารถตรวจพบเชื้อ *M. leprae* ในตัวอย่างเนื้อเยื่อได้ดีกว่าวิธี ZN⁽⁸⁾ แต่มีข้อจำกัดคือ ใช้เวลาย้อมนานและวิธีย้อมมีความซับซ้อนมากกว่า^(13, 14) ต่อมาได้มีการพัฒนาการย้อม AFB โดยใช้สารที่สามารถเรืองแสงได้ในการย้อม (fluorochrome) เช่น Auramine O ซึ่งสารฟลูออโรโครมจะเข้าไปจับกับกรดไมโคลิกของตัวเชื้อ ทำให้ตรวจพบเชื้อมีลักษณะเป็นรูปแท่งเรืองแสงสีเหลืองบนพื้นหลังสีดำ การย้อมตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนัง ด้วยสีฟลูออโรโครมเป็นวิธีที่มีความไวสูงสุดเมื่อเทียบกับวิธี ZN⁽¹⁵⁾ และวิธี FF^(12, 16) แต่เนื่องจากวิธีนี้อาจทำให้เกิดผลบวกложได้ง่าย^(15, 17) จึงต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญสูงในการอ่านผล รวมทั้งต้องใช้กล้อง

จุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนซ์ และต้องมีห้องมืดสำหรับอ่านผล ซึ่งอาจไม่เหมาะสมกับห้องปฏิบัติการทั่วไป ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องหาวิธีการวินิจฉัยโรคเรื้อนที่ใช้ได้ง่าย สะดวก ปลอดภัย และราคาถูกรวมทั้งมีความไวและความจำเพาะในระดับที่ดีพอที่จะสามารถนำไปใช้ตรวจวินิจฉัยตามโรงพยาบาลทั่วไปได้

การตรวจหา AFB ในตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังได้ถูกนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *M. leprae* ในหลายประเทศ อย่างไรก็ตามยังมีข้อมูลน้อยมากเกี่ยวกับการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *M. leprae* โดยเฉพาะในตัวอย่างที่เก็บจากวิธี SSS ดังนั้น ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะเปรียบเทียบประสิทธิภาพวิธีการย้อมสี modified Fite-Faraco การย้อมสี Auramine O และวิธี real-time PCR กับการย้อมสีด้วยวิธีมาตรฐาน Ziehl-Neelsen จากตัวอย่างสารน้ำและเนื้อเยื่อที่ได้จากวิธี SSS เพื่อใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อ *M. leprae*

วัตถุประสงค์และวิธีการ

1. ประชากรที่ศึกษา

การศึกษาทำในอาสาสมัครที่ขึ้นทะเบียนเข้ารับบริการรักษาโรคเรื้อนที่สถาบันราชประชาสมาสัย ระหว่างเดือนมีนาคม พ.ศ. 2566 ถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2566 จำนวน 32 ราย โดยเป็นกลุ่มผู้ป่วยใหม่และกลุ่มที่ติดตามการรักษา

2. การพิทักษ์สิทธิของกลุ่มตัวอย่าง

โครงการวิจัยได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยเกี่ยวกับคน สถาบันราชประชาสมาสัย ผู้วิจัยเคารพในการขอความยินยอมโดยให้ข้อมูลอย่างครบถ้วนและให้อาสาสมัครตัดสินใจอย่างอิสระ ไม่เปิดเผยข้อมูลส่วนตัวของอาสาสมัครและนำเสนอเป็นข้อมูลวิชาการในภาพรวมเท่านั้น

3. การเก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างส่งตรวจทำโดยการกักริดผิวหนังเพื่อตรวจหาตัวเชื้อโดยตรงตามแนววิธีปฏิบัติมาตรฐานของ WHO^(11, 18, 19) จากผู้ป่วยระยะ 4 ตำแหน่ง คือ บริเวณคิงหูกทั้ง 2 ข้างและรอยโรคที่กำเริบมากที่สุดอีก 2 ตำแหน่ง โดยเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อใต้ผิวหนัง สำหรับเตรียมตัวอย่างสไลด์ และชุดด้วยใบมีดจากตำแหน่งเดียวกันเพื่อนำไปทดสอบ real-time PCR โดยแบ่งสไลด์ SSS เป็น 3 ส่วนเพื่อนำไปย้อมด้วยวิธี ZN⁽²⁰⁾ วิธี FF และวิธี AO⁽²¹⁾ ส่วนตัวอย่างจากใบมีดนำไปตรวจวิเคราะห์โดยวิธี real-time PCR

เตรียมตัวอย่างที่จะนำไปย้อมสีโดยเกลี่ยเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5-10 มิลลิเมตรบนสไลด์ ตำแหน่งละ 3 สไลด์ ปลดสเมียร์ให้แห้งแล้ว fix โดยการผ่านความร้อน เก็บสไลด์ในกล่องที่แห้งและสะอาดเพื่อรอทำการทดสอบต่อไป ส่วนตัวอย่างที่ได้จากการชุดด้วยใบมีด สำหรับการทำ real-time PCR เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทดสอบ

4. การตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

การย้อมสีวิธี ZN มีรายละเอียดขั้นตอนตามที่อธิบายในคู่มือการตรวจเชื้อโรคเรื้อนโดยวิธีการกักริดผิวหนัง สถาบันราชประชาสมาสัย⁽²⁰⁾ โดยนำมาย้อมสีแรกด้วย 1% carbol fuchsin (Loba Chemie Pvt. Ltd., India) และลนไฟอ่อน ๆ นาน 5 นาที ล้างออกด้วยน้ำประปาจนสะอาด จากนั้นล้างด้วย 3% HCl-alcohol 3 วินาที ล้างออกด้วยน้ำประปาจนสะอาด แล้วย้อมด้วยสีย้อมที่สอง (counter stain) 1% methylene blue (RFCL Ltd., India) เป็นเวลา 2 นาที ล้างออกด้วยน้ำประปาจนสะอาด และตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง

การย้อมสีวิธี FF มีรายละเอียดขั้นตอนตามที่อธิบายโดย Girma และคณะ⁽²²⁾ ซึ่งได้ปรับขั้นตอนการย้อม ดังนี้ ปรับลดขั้นตอน deparaffinization ไปเป็นการแช่สไลด์ในน้ำมันถั่วเหลืองนาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพิ่มเวลาการย้อมด้วย 1% carbol fuchsin (Loba Chemie Pvt. Ltd., India) เป็น 30 นาที ปรับลดเวลาการล้างด้วย 25% HCl-alcohol เป็น 5 วินาที ปรับความเข้มข้นและเวลาในการย้อมสีย้อมที่สอง (counter stain) เป็น 1% methylene blue (RFCL Ltd., India) นาน 30 วินาที โดยล้างสไลด์ด้วยน้ำประปาประหว่างแต่ละขั้นตอน และเรียกวิธีนี้ว่า modified Fite-Faraco

การย้อมสีวิธี AO มีรายละเอียดขั้นตอนตามที่อธิบายโดย Truant และคณะ⁽²¹⁾ โดยได้ปรับขั้นตอนการย้อม ดังนี้ เพิ่มเวลาการย้อมด้วย 0.1% Auramine O (Becton Dickinson Ireland Ltd., USA) เป็น 20 นาที ปรับเวลาในการย้อมสีย้อมที่สอง (counter stain) ด้วย 0.5% potassium permanganate (Becton Dickinson Ireland Ltd., USA) เป็น 4 นาที และระหว่างแต่ละขั้นตอนล้างสไลด์ด้วยน้ำประปา

สำหรับขั้นตอนการย้อมสีทั้งสามวิธี ให้ซับสไลด์ให้แห้งหลังการล้างครั้งสุดท้าย ก่อน mount ด้วย mounting medium โดยไม่มีการ clearing ด้วยไซลีน แล้วตรวจหาตัวเชื้อ AFB ด้วยกล้องจุลทรรศน์หรือกล้องฟลูออเรสเซนซ์ Primo Star iLED (Carl ZEISS, Germany) กำลังขยาย 100X จำนวน 100 วงก้อง จากมุมทั้งสี่และกลางสไลด์ รายงานผลการทดสอบการย้อมสีทั้ง 3 วิธี เป็นเชิงกึ่งปริมาณ (semi-quantitative) เป็นค่าเฉลี่ย BI (Bacteriological Index: BI) ตาม Ridley's logarithmic scale⁽¹⁹⁾ กำหนดจำนวนเชื้อในสเมียร์เป็น 7 ระดับ จากระดับที่ 0 (ไม่พบแบคทีเรีย) ถึงระดับที่ 6+ (พบ AFB มากกว่า 1,000 โดยเฉลี่ยในหนึ่งวงก้อง)

การประเมินผลได้กล้องจุลทรรศน์จะกระทำโดยนักเทคนิคการแพทย์ 3 คน โดยใช้มติ 2 ใน 3 ซึ่งนักเทคนิคการแพทย์จะไม่ทราบผลการวินิจฉัยและหมายเลขสไลด์

การตรวจวิเคราะห์โดยวิธี real-time PCR สกัดดีเอ็นเอของตัวอย่างสารน้ำและเนื้อเยื่อผิวหนังจากตัวอย่างใบมีดด้วยเครื่องสกัด Zybio EXM3000 Nucleic Acid Isolation System (Zybio, China) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต เพิ่มปริมาณคอมพลิเมอไรต์ดีเอ็นเอของ *Mycobacterium leprae* *Pra* gene⁽²³⁾ ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป *Mycobacterium leprae* Real Time PCR Kit (Jiangsu Biopurfectus Technologies Co., Ltd., China) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ BIO-RAD CFX96 Real-Time System (BIO-RAD, Singapore) ภายใต้สภาวะที่ผู้ผลิตกำหนดจำนวน 40 รอบ และวิเคราะห์ผลด้วยซอฟต์แวร์ CFX Maestro™ Software วิธี PCR มีความไวของวิธี (limit of detection) 5 copies/reaction รายงานผลเชิงคุณภาพโดยรายงานผลเป็นบวกเมื่อค่า cycle threshold (Ct) น้อยกว่าหรือเท่ากับ 38

การควบคุมคุณภาพภายใน (internal QC) ทำโดยใช้ตัวอย่าง SSS ที่ทราบว่าไม่มีหรือไม่มี *M. leprae* เป็นตัวควบคุมบวก (positive control) และตัวควบคุมลบ (negative control) ในระหว่างขั้นตอนการย้อมสี ส่วนการทำ real-time PCR มีการทำ positive control และ negative control และใช้ human RNaseP เป็น internal control ควบคุม

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการตรวจหาเชื้อของผู้ป่วย 32 ราย นำมาเปรียบเทียบหาความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก (positive predictive value: PPV) และ

ค่าทำนายผลลบ (negative predictive value: NPV) โดยเทียบกับผลการตรวจด้วยวิธี real-time PCR สถิติเชิงพรรณนาเสนอในรูปแบบความถี่และร้อยละ เปรียบเทียบระหว่างวิธีวิเคราะห์ด้วยสถิติ Chi-square หรือ Fisher's Exact test วิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยใช้สถิติ Phi coefficient วิเคราะห์ความสอดคล้องระหว่างผู้อ่านผลสเมียร์ด้วยสถิติ Krippendorff's alpha coefficient และวิเคราะห์ความสอดคล้องระหว่างวิธีตรวจด้วยสถิติ Cohen's Kappa coefficient โดยใช้โปรแกรม SPSS Version 28.0.1.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) กำหนดระดับความมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05 การแปลความหมายของค่าดัชนีความสอดคล้อง Kappa มีดังนี้ 0.80 - 1.00 หมายถึง ระดับดีมาก 0.60 - 0.80 หมายถึง ระดับดี 0.40 - 0.60 หมายถึง ระดับปานกลาง 0.20 - 0.40 หมายถึง ระดับพอใช้ 0.00 - 0.20 หมายถึง ระดับน้อย และน้อยกว่า 0.00 หมายถึง ไม่สอดคล้อง⁽²⁴⁾ การแปลความหมายของค่าดัชนีความสอดคล้อง Alpha มีดังนี้ ≥ 0.800 หมายถึง ระดับดี ≥ 0.667 หมายถึง ระดับไม่แน่นอน (tentative) และ < 0.667 หมายถึง ระดับต่ำ⁽²⁵⁾

ผลการศึกษา

1. ข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง

การศึกษานี้มีผู้มีคุณสมบัติครบตามเกณฑ์เข้าร่วมวิจัยเบื้องต้นและได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคเรื้อนจำนวน 32 ราย จากการมีอาการแสดงทางคลินิกของโรคเรื้อนอย่างน้อย 2 อย่าง ได้แก่ การตรวจพบอาการทางผิวหนังที่มีลักษณะเฉพาะของโรคเรื้อน การตรวจพบอาการทางตา ได้แก่ ชาที่รอยโรคผิวหนังหรือชาที่ผิวหนังบริเวณที่รับรู้ความรู้สึกจากเส้นประสาทส่วนปลายที่ถูกทำลาย หรือการตรวจพบเส้นประสาทโต ได้จำแนกประเภทผู้ป่วยได้เป็น ผู้ป่วยเขื่อน้อย (PB) หมายถึง ผู้ป่วยโรคเรื้อนที่ตรวจพบ

รอยโรค 1-5 รอยโรค และผู้ป่วยเชื้อมาก (MB) หมายถึงผู้ป่วยโรคเรื้อนที่ตรวจพบรอยโรรมากกว่า 5 รอยโรค^(2, 3) ได้เป็นผู้ป่วยเชื่อน้อยจำนวน 17 ราย (ร้อยละ 53.1) และผู้ป่วยเชื้อมากจำนวน 15 ราย (ร้อยละ 46.9) (Table 1) จากการวิเคราะห์พบผู้ป่วยได้รับการยืนยันว่าเป็นโรคเรื้อนจากการย้อมสีให้ผลบวกด้วยวิธี ZN จำนวน 7 ราย และวิธี FF จำนวน 9 ราย โดยผู้ป่วยทั้ง 7 ราย ให้ผลบวกกับวิธีการตรวจทั้ง 4 วิธี นอกจากนี้วิธี FF ให้ผลบวกเพิ่มมากขึ้นจากวิธี ZN จำนวน 2 ราย ซึ่งเป็นผู้ป่วยรายเดียวกับที่ให้ผลบวกกับการตรวจด้วยวิธี AO และ real-time PCR ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันว่าผู้ป่วยเป็นโรคเรื้อนจริง นอกจากนี้ยังพบว่ามี 2 ราย ที่ตรวจพบ AFB ด้วยวิธี AO แต่ตรวจไม่พบด้วยวิธี ZN วิธี FF และ real-time PCR

2. ความสอดคล้องของผู้ประเมินตามวิธีการวินิจฉัยด้วยการย้อมสี

ผลการประเมินผลความน่าเชื่อถือระหว่างผู้ประเมินผลสเมียร์ (Inter-rater reliability) จำนวน 3 คนที่ได้อ่านผลจากการย้อมสีด้วยวิธี ZN โดยใช้สถิติ Krippendorff's alpha พบว่าค่าดัชนีความสอดคล้องระหว่างผู้ประเมินเท่ากับ 0.914 แสดงว่ามีค่าความสอดคล้องกันระหว่างผู้ประเมินอยู่ในระดับดี ส่วนการย้อมสีด้วยวิธี FF ได้ค่าดัชนีความสอดคล้องระหว่างผู้ประเมินเท่ากับ 0.931 แสดงว่ามีค่าความสอดคล้องกันระหว่างผู้ประเมินอยู่ในระดับดีและการย้อมสีด้วยวิธี Auramine O ได้ค่าดัชนีความสอดคล้องระหว่างผู้ประเมินเท่ากับ 0.863 แสดงว่ามีค่าความสอดคล้องกันระหว่างผู้ประเมินอยู่ในระดับดี (Table 2) ดังนั้น ผู้ประเมินทั้ง 3 คน มีความเที่ยงในผลการประเมิน

3. ประสิทธิภาพของวิธีการตรวจวินิจฉัยในสิ่งส่งตรวจจากการกรีดผิวหนัง

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างประเภทของโรคเรื้อนกับวิธีการตรวจวินิจฉัยด้วยสถิติ Phi coefficient พบอัตราการให้ผลบวกกับวิธีการตรวจทั้ง 4 ชนิดในผู้ป่วยเชื้อมากมีอัตราสูงกว่าอัตราการให้ผลบวกในผู้ป่วยเชื่อน้อย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Table 3) และพบว่าวิธี ZN มีอัตราการตรวจพบ AFB ในผู้ป่วยเชื้อมากต่ำกว่าวิธีอื่น ๆ ส่วนวิธี AO พบว่ามีอัตราการให้ผลบวกในผู้ป่วยเชื่อน้อยร้อยละ 11.8

4. ความสอดคล้องของผลการตรวจหา AFB ในสเมียร์ด้วยวิธี Ziehl-Neelsen วิธี modified Fite-Faraco และวิธี Auramine O โดยมีผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี real-time PCR เป็นวิธีอ้างอิง

จากตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับวิธี real-time PCR ทั้งหมด 9 ตัวอย่าง ผลการวิเคราะห์ความสอดคล้องการวินิจฉัยด้วยวิธี ZN, FF และ AO กับวิธี real-time PCR โดยใช้ค่าสถิติ Kappa coefficient พบว่าทั้ง 3 วิธี มีความสอดคล้องในระดับดีมากเมื่อเทียบกับวิธี real-time PCR อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) โดยวิธี FF มีความสอดคล้องกับวิธี real-time PCR มากที่สุด เมื่อเทียบกับวิธี ZN และ AO (Kappa = 1.000, $p < 0.001$) (Table 4) วิธี ZN มีค่าทำนายผลบวก (PPV) ร้อยละ 100 ค่าทำนายผลลบ (NPV) ร้อยละ 92 วิธี FF มีค่าทำนายผลบวกร้อยละ 100 ค่าทำนายผลลบ ร้อยละ 100 และวิธี AO มีค่าทำนายผลบวกร้อยละ 81.8 ค่าทำนายผลลบร้อยละ 100

5. ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยโรคเรื้อน

จากการวิเคราะห์พบค่าความไว (sensitivity) ค่าความจำเพาะ (specificity) ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ ของการตรวจวินิจฉัยแต่ละวิธี โดยใช้วิธี real-time PCR เป็นวิธีอ้างอิง พบว่ามีจำนวน 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 22.2) ที่ตรวจพบ AFB ด้วยวิธี FF แต่ตรวจไม่พบด้วยวิธี ZN และมีจำนวน 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 22.2) ที่ตรวจพบ AFB ด้วยวิธี AO แต่ตรวจไม่พบด้วยวิธี ZN (Table 4) ซึ่งเป็นตัวอย่างรายเดียวกัน และเมื่อแบ่งกลุ่มผู้ป่วยเชือน้อย จำนวน 17 ราย (ร้อยละ 53.1) พบว่า มีจำนวน 2 ตัวอย่าง ที่ตรวจพบ AFB ด้วยวิธี AO และผู้ป่วยเชื้อมาก จำนวน 15 ราย (ร้อยละ 46.9) พบว่า มีจำนวน 2 ตัวอย่าง ที่ตรวจพบ AFB ด้วยวิธี FF และ AO (Table 1) นอกจากนี้ยังพบว่าการตรวจหาเชื้อโรคเรื้อนด้วยวิธี ZN ในตัวอย่างที่ได้จากการกรีดผิวหนัง มีค่าความไวการตรวจ (ร้อยละ 77.8) น้อยกว่าค่าความ

ไวจากการตรวจด้วยวิธี FF หรือวิธี AO ที่มีค่าความไวเป็นร้อยละ 100 ทั้งสองวิธี ส่วนการตรวจหาเชื้อโรคเรื้อนด้วยวิธี AO มีค่าความจำเพาะน้อยที่สุด (ร้อยละ 91.3) เมื่อเทียบกับวิธี ZN และ FF (Table 5) ในการทดลองนี้ได้วัดประสิทธิภาพการตรวจโดยใช้พื้นที่ใต้กราฟ (area under the ROC curve : AUC) เมื่อใช้วิธี real-time PCR เป็นวิธีอ้างอิง พบว่าวิธี FF (AUC = 1.000) และวิธี AO (AUC = 1.000) เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าวิธี ZN (AUC = 0.884) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 (Table 5)

ผลการวิเคราะห์ความสอดคล้องการวินิจฉัยวิธี FF และ AO โดยใช้วิธี ZN เป็นวิธีอ้างอิง ด้วยสถิติ Kappa coefficient พบว่าวิธี FF มีความสอดคล้องในระดับดีมากกับวิธี ZN อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) ในขณะที่วิธี AO มีความสอดคล้องกับวิธี ZN ในระดับดีเมื่อเทียบกับวิธี ZN อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) (Table 6)

Table 1 Number and repartition of positive samples according to clinical classification. (n = 32)

Result	Type of leprosy	
	MB	PB
ZN-FF-AO-PCR positive	7	0
ZN negative-FF-AO-PCR positive	2	0
AO positive-ZN-FF-PCR negative	0	2
ZN-FF-AO-PCR negative	6	15
Total	15	17

MB = multibacillary leprosy, PB = paucibacillary leprosy, ZN = Ziehl-Neelsen staining, FF = modified Fite-Faraco staining, AO = Auramine O staining and PCR = real-time PCR

Table 2 Inter-rater reliability scores for the reported validation studies of the Bacteriological Index grading system in the different staining methods, as measured by Krippendorff's alpha. (n = 32)

Staining technique	No. of raters	No. of patients	Krippendorff's alpha	95% CI
Ziehl-Neelsen	3	32	0.914	0.827-0.977
Modified Fite-Faraco	3	32	0.931	0.868-0.979
Auramine O	3	32	0.863	0.796-0.926

Krippendorff's alpha value range from 0 to 1, where 0 indicates the absence of reliability and 1 indicates perfect reliability. An alpha value greater than 0.667 is the accepted lowest conceivable limit. An alpha of 0.800 or higher is considered a good reliability.⁽²⁵⁾

Table 3 Efficiencies of different detection systems with slit skin specimens from MB and PB patients. P-values were determined using Phi coefficient test. Significant comparisons are indicated by asterisks. (n = 32)

Clinical classification	Patients (%)	Number of positive results/total number (%)			
		ZN	FF	AO	Real-time PCR
MB	15 (46.9)	7/15 (46.7)***	9/15 (60)****	9/15 (60)**	9/15 (60)****
PB	17 (53.1)	0/17 (0)	0/17 (0)	2/17 (11.8)	0/17 (0)
Total	32 (100)	7/32 (21.9)	9/32 (28.1)	11/32 (34.4)	9/32 (28.1)

PB = paucibacillary, MB = multibacillary, **: $p = 0.004$, ***: $p = 0.001$, ****: $p < 0.001$

Table 4 Correlations of various staining techniques with real-time PCR. (n = 32)

Staining technique	Real-time PCR		Kappa	P-value	PPV (%)	NPV (%)
	Positive	Negative				
Ziehl-Neelsen						
Positive	7 (77.8)	0 (0.0)	0.834	< 0.001	100	92
Negative	2 (22.2)	23 (100)				
Modified Fite-Faraco						
Positive	9 (100)	0 (0.0)	1.000	< 0.001	100	100
Negative	0 (0.0)	23 (100)				
Auramine O						
Positive	9 (100)	2 (8.7)	0.855	< 0.001	81.8	100
Negative	0 (0.0)	21 (91.3)				

PPV = Positive Predictive Value, NPV = Negative Predictive Value

Table 5 Area under the receiver operating characteristic curve (AUC) and predictive value of three staining techniques as compared with real-time PCR in leprosy diagnosis. (n = 32)

Staining technique	Sensitivity	Specificity	AUC	95% CI	P-value
Ziehl-Neelsen	77.8	100	0.884	0.715-1.000	0.001
Modified Fite-Faraco	100	100	1.000	1.000-1.000	< 0.001
Auramine O	100	91.3	1.000	1.000-1.000	< 0.001

Table 6 Comparison of diagnostic performance of modified Fite-Faraco and Auramine O staining to Ziehl-Neelsen staining. (n = 32)

Staining technique	Ziehl-Neelsen		Kappa	P-value	PPV (%)	NPV (%)
	Positive	Negative				
Modified Fite-Faraco						
Positive	7 (100)	2 (8.0)	0.834	< 0.001	77.8	100
Negative	0 (0.0)	23 (92.0)				
Auramine O						
Positive	7 (100)	4 (16.0)	0.697	< 0.001	63.6	100
Negative	0 (0.0)	21 (84.0)				

PPV = Positive Predictive Value, NPV = Negative Predictive Value

วิจารณ์

เชื้อ *M. leprae* ไม่สามารถเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองได้ ต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อในสัตว์ทดลอง และใช้ระยะเวลานานในการเพาะเลี้ยง⁽²⁶⁾ มาตรฐานในการตรวจวินิจฉัยโรคเรื้อนในปัจจุบันจึงอาศัยการพบรอยโรคที่ผิวหนังและอาการตามปลายประสาทเป็นหลัก การวินิจฉัยผู้ป่วยโรคเรื้อนในรายที่ยังไม่ปรากฏอาการชัดเจนยังทำได้ยาก^(12, 13) เนื่องจากโรคนี้อาจสับสนกับโรคผิวหนังอื่น ๆ ได้ง่าย ดังนั้นการตรวจพบ AFB และการพบลักษณะจำเพาะของโรคเรื้อน เช่น granulomas, epithelioid cells, foamy macrophages, giant cells, ชนิดของเซลล์ที่เกี่ยวข้อง (infiltration) และการอักเสบจากการตรวจทางพยาธิวิทยา (histopathological examination) ของผิวหนังบริเวณรอยโรคจึงเป็นการช่วยยืนยันการวินิจฉัยโรคเรื้อนได้⁽¹⁸⁾ วิธีการตรวจทางพยาธิวิทยาจึงมักใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการวินิจฉัยและแยกประเภทของโรคเรื้อน^(18, 19) แต่วิธีการนี้ยังมีข้อจำกัดในเรื่องความเสี่ยงในขั้นตอนการทำหัตถการและทำให้

เกิดรอยแผลเป็นได้ และยังต้องใช้บุคลากรที่มีทักษะและความชำนาญในการเก็บ การตรึงตัวอย่างกับสไลด์ การเตรียมและการแปลผลตัวอย่างชิ้นเนื้อ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องหาวิธีการวินิจฉัยโรคเรื้อนที่ง่าย สะดวก ปลอดภัย และราคาถูก รวมทั้งมีความไวและความจำเพาะในระดับที่ดีพอที่จะสามารถนำไปใช้ตรวจวินิจฉัยได้ตามโรงพยาบาลทั่วไป

การตรวจทางจุลชีววิทยาโดยการเพาะเชื้อโดยทั่วไปจะถือว่าเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย แต่เนื่องจากเชื้อ *M. leprae* ไม่สามารถเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองได้ ต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อในอู้ง่ายหนู (Mouse Foot Pad assay) เป็นวิธีมาตรฐานซึ่งเป็นวิธีที่ยุ่งยากและใช้ระยะเวลานานในการเพาะเลี้ยง⁽²⁶⁾ ดังนั้นการตรวจพบแบคทีเรียรูปแท่งติดสีทนกรดด้วยกล้องจุลทรรศน์จากสิ่งส่งตรวจจึงนิยมใช้เป็นเทคนิคการวินิจฉัยเชื้อ *M. leprae* แทน โดยมีการรายงานผลเป็นค่า BI ซึ่งแสดงถึงจำนวนเชื้อโรคเรื้อนที่พบ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาความเที่ยงตรงในการรายงานผลค่า BI ระหว่าง

ผู้ประเมิน พบว่าผู้ประเมินทั้ง 3 คน มีค่าดัชนีความสอดคล้อง alpha มากกว่า 0.8 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% มีความสอดคล้องในการประเมินอยู่ในระดับดีมาก แสดงให้เห็นว่ามีความสอดคล้องภายในของการรายงานผลค่า BI และมีความน่าเชื่อถือในการประเมินความสอดคล้องระหว่างการทำอ่านสไลด์ต่อการรายงานผลค่า BI ที่เป็นเช่นนี้อาจมีสาเหตุมาจากผู้เชี่ยวชาญที่ทำหน้าที่เป็นผู้ประเมินมีคุณสมบัติที่เหมาะสม และมีการฝึกปฏิบัติก่อนทำการประเมินจริง ดังนั้นจึงสามารถนำผลการรายงานค่า BI ไปวิเคราะห์ต่อได้

วิธี ZN เป็นวิธีที่ไม่ซับซ้อน ราคาถูก และเป็นวิธีที่ใช้อย่างแพร่หลายในการตรวจหา AFB โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสถานบริการสุขภาพที่มีทรัพยากรจำกัด ความไวของวิธี ZN มีค่าแตกต่างกันตั้งแต่ร้อยละ 59 ถึง 75 ขึ้นอยู่กับการศึกษา^(8, 12, 22) ในการศึกษาครั้งนี้เมื่อใช้วิธี real-time PCR เป็นวิธีอ้างอิง พบค่าความไวของวิธี ZN มีค่าร้อยละ 77.8 โดยค่า PPV มีค่าสูง (ร้อยละ 100) แสดงว่าโอกาสการมีผลบวกปลอมจะน้อย ทางเลือกอีกวิธีสำหรับใช้ย้อมตัวอย่างที่ได้จากการทำ SSS คือวิธีการย้อมสี AO ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าค่าความไวและค่า NPV ของวิธี AO สูงกว่าวิธี ZN แต่ค่าความจำเพาะและค่า PPV ต่ำกว่าวิธี ZN โดยค่า PPV ที่มีค่าต่ำแสดงว่าโอกาสการมีผลบวกปลอมจะเกิดได้สูง ถึงแม้จะมีค่าความไวที่สูงขึ้น แต่หากมีผู้ป่วยจำนวนมากเข้ารับการตรวจวินิจฉัยอาจจะได้ผู้ที่มีผลบวกปลอมจำนวนมาก ทำให้สิ้นเปลืองทั้งเวลาและทรัพยากรในการตรวจวินิจฉัยเพิ่มเติมและผู้ป่วยอาจจะได้รับการรักษาเกินความจำเป็น สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่า วิธี AO จะมีความไวมากกว่าวิธี ZN โดยมีค่าความไวเป็นร้อยละ 65.5 ค่า PPV ร้อยละ 100 และค่า NPV ร้อยละ 38.1⁽²²⁾ นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถยืนยันผลด้วยการตรวจทางพยาธิวิทยา (histopathological examination) แต่ละรายได้ ดังนั้น จึงยืนยันไม่ได้ว่าการพบ AO

ให้ผล BI เป็น 1+ จำนวนสองรายนั้นเป็นผลบวกจริงหรือเป็นผลบวกปลอมจากการย้อมสี^(15, 16, 27) สาเหตุการเกิดผลบวกปลอมจากการย้อมสีด้วยวิธี AO อาจเกิดจากการปนเปื้อนสิ่งแปลกปลอมในขั้นตอนการย้อม ปริมาณสาร fluorophore มีการกระจายตัวไม่ดีเห็นเป็นกลุ่มสี สารประกอบในตัวอย่างสามารถเรืองแสงได้เอง หรือการย้อมสีติดพื้นหลัง (background staining) เป็นต้น⁽²⁸⁾

ส่วนการย้อมสีเพื่อตรวจหา AFB อีกวิธีที่นิยมกัน คือ วิธี Fite-Faraco (FF) โดยมักนิยมใช้ย้อมสิ่งส่งตรวจที่เป็นตัวอย่างชิ้นเนื้อ (biopsy) ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ตัวอย่างที่ได้จากการทำ SSS และได้ปรับวิธีการย้อม FF โดยการตัดชิ้นตอน deparaffinization แล้วแช่สไลด์ในน้ำมันถั่วเหลืองอย่างเดียวก่อนย้อม 10 นาที ก่อนย้อมตามวิธีปกติ ผลการศึกษาพบว่า วิธี FF มีค่าความไวสูงกว่าวิธี ZN รวมทั้งมีค่า PPV และค่า NPV เป็นร้อยละ 100 การมีความไวเพิ่มขึ้นอาจเนื่องจากการปรับวิธีการย้อมในการศึกษาครั้งนี้ โดยการแช่ในน้ำมันถั่วเหลืองก่อนทำการย้อมปกติอาจช่วยเคลือบปกป้องผนังเซลล์ของแบคทีเรียและลดการสัมผัสกับสารละลาย acid-alcohol จนส่งผลให้ค่าความไวของการทดสอบเพิ่มขึ้นได้ สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ได้ตรวจหา AFB ในสิ่งส่งตรวจที่เป็นตัวอย่างชิ้นเนื้อ ที่พบว่าความไวของวิธี FF มีค่ามากกว่าค่าความไวของวิธี ZN โดยค่าความไวมีค่าแตกต่างกันตั้งแต่ร้อยละ 50 ถึง 77^(8, 16, 22) เนื่องจากวิธีการศึกษาก่อนหน้านั้นเป็นการย้อมสีวิธี FF กับตัวอย่างชิ้นเนื้อและใช้วิธี FF เป็นวิธีมาตรฐาน ส่งผลให้ผลการวิเคราะห์ได้ค่าความไวแตกต่างจากการทดลองครั้งนี้ได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้วิเคราะห์เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการย้อมสีโดยใช้วิธี ZN เป็นวิธีอ้างอิง เนื่องจากการย้อมสี SSS เพื่อหา AFB จะใช้วิธี ZN เป็นวิธีมาตรฐาน จากผลการศึกษาพบวิธี FF และวิธี AO มีความไวเท่ากัน

(Table 5) แสดงว่าวิธี FF กับ วิธี AO สามารถใช้ทดแทนกันได้โดยความไวยังใกล้เคียงเดิม นอกจากนี้วิธี FF และ วิธี AO มีอัตราการตรวจพบเชื้อ AFB และมีความไวมากกว่าวิธี ZN บ่งชี้ว่าควรใช้การย้อมสีวิธี FF หรือวิธี AO ในการตรวจวินิจฉัยโรคเรื้อนแทนการใช้วิธี ZN

ปัจจุบันวิธีการตรวจทางชีวโมเลกุลที่รวดเร็วและมีความไวในการตรวจหาเชื้อ *M. leprae* เช่น PCR ถูกนำมาใช้เพื่อเสริมกับวิธีการตรวจวินิจฉัยทางคลินิกและการตรวจทางพยาธิวิทยา โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่สงสัยว่าเป็นโรคเรื้อนและเมื่อวิธีการตรวจทางคลินิกและการตรวจทางพยาธิวิทยาไม่สามารถหาข้อสรุปได้ เนื่องจากวิธี PCR มีความจำเพาะสูง (ร้อยละ 100) และความไวร้อยละ 34 ถึง 80 ในผู้ป่วยเชื้อน้อยและมากกว่าร้อยละ 90 ในผู้ป่วยเชื้อมาก⁽²⁹⁾ ดังนั้นวิธี PCR จึงถูกนำมาใช้เป็นวิธีอ้างอิงในการศึกษาครั้งนี้ โดยได้ตรวจหาเชื้อ *M. leprae* ด้วยวิธี real-time PCR โดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป มียีนเป้าหมายคือ *Pra* gene เนื่องจากยีนนี้มีความจำเพาะต่อเชื้อ *M. leprae* และมีอัตราการให้ผลบวกสูงถึงร้อยละ 74.8 ในผู้ป่วย PB ที่มีค่า BI เป็นลบ เมื่อเทียบกับการใช้ *M. leprae*-specific repetitive element (RLEP) เป็นยีนเป้าหมาย⁽³⁰⁾ จากการศึกษาพบว่าอัตราการตรวจพบ *M. leprae* จากตัวอย่างการขูดรอยกรีดผิวหนังเป็นร้อยละ 60 ในผู้ป่วยเชื้อมาก และเป็นร้อยละ 0 ในผู้ป่วยเชื้อน้อย ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Martinez และคณะ⁽⁷⁾ ซึ่งมีอัตราการตรวจพบเชื้อจากชิ้นเนื้อเป็นร้อยละ 100 ในผู้ป่วยเชื้อมาก และอยู่ระหว่างร้อยละ 62.5-79.2 ในผู้ป่วยเชื้อน้อย ตามชนิดของวิธี PCR ที่ใช้ ที่เป็นเช่นนี้อาจมีสาเหตุมาจากการศึกษาครั้งนี้ใช้วิธีการขูดเนื้อเยื่อจากรอยกรีดผิวหนังอาจทำให้ได้ตัวอย่างเนื้อเยื่อปริมาณน้อยกว่าการทำ biopsy เนื่องจากจำนวนแบคทีเรียในตัวอย่างจากผู้ป่วยเชื้อน้อยมี

จำนวนเชื้ออยู่น้อย ทำให้โอกาสในการตรวจพบ AFB หรือ *Mycobacterium leprae* *Pra* gene ที่ได้จากตัวอย่างการกรีดผิวหนังของผู้ป่วยเชื้อน้อยจึงต่ำด้วย⁽⁷⁾ และการใช้วิธีสกัดดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพต่างกัน ก็อาจทำให้อัตราการตรวจพบเชื้อต่างกันด้วยเนื่องจากเชื้อ *M. leprae* เป็นแบคทีเรียที่เจริญภายในเซลล์ รวมทั้งยังมีผนังเซลล์ที่สามารถทน acid-alcohol ได้ การใช้วิธีสกัดดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพไม่ดีพออาจทำให้ไม่สามารถสกัด DNA ออกมาได้^(7, 22)

การศึกษาค้นครั้งนี้ยังมีข้อจำกัดคือ การเก็บตัวอย่าง slit-skin sample โดยการขูดด้วยใบมีดไม่สามารถควบคุมสภาวะของการขูดได้ เช่น แรงกด ทิศทาง หรือจำนวนครั้งที่ขูด อาจทำให้ได้ตัวอย่างเนื้อเยื่อปริมาณไม่เท่ากันและส่งผลให้ได้ผลการตรวจในแต่ละวิธีแตกต่างกันได้ นอกจากนี้การศึกษาค้นครั้งนี้กลุ่มประชากรที่ศึกษามีขนาดเล็กเนื่องจากประเทศไทยมีความชุกของโรคเรื้อนลดน้อยลง รวมทั้งไม่มีผลตรวจทางพยาธิวิทยาเพื่อยืนยันและแยกชนิดของโรคเรื้อนซึ่งทำให้ไม่สามารถคาดการณ์ความน่าจะเป็นของการใช้วิธีตรวจทั้ง 4 วิธีเพื่อนำไปใช้ตรวจวินิจฉัยร่วมกับอาการทางคลินิกตามข้อบ่งชี้ที่แตกต่างกันในผู้ป่วยแต่ละคนได้ จึงควรมีการศึกษาในผู้ป่วยจำนวนมากขึ้นเพื่อเพิ่มความแม่นยำทางสถิติ

สรุป

การศึกษาค้นครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพวิธี real-time PCR วิธี ZN วิธี FF และวิธี AO เพื่อหาเชื้อ *M. Leprae* จากตัวอย่างที่เก็บจากการกรีดผิวหนัง การศึกษาพบว่าการตรวจ SSS ในผู้ป่วยเชื้อมากด้วยวิธี real-time PCR การย้อมสีวิธี FF และวิธี AO มีอัตราการให้ผลบวกเท่าเทียมกันและมีความไวสูงกว่าวิธี ZN แต่เนื่องจากวิธี real-time PCR และการย้อมสีด้วยวิธี AO ต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญสูงในการอ่านผลและต้องใช้อุปกรณ์เพิ่ม

ซึ่งอาจไม่เหมาะสมกับห้องปฏิบัติการทั่วไป ดังนั้นเมื่อพิจารณาประสิทธิภาพของการตรวจหา AFB จาก SSS ด้วยการย้อมสีวิธี FF ร่วมกับการประเมินอาการทางคลินิกสามารถใช้ตรวจวินิจฉัยยืนยันโรคเรื้อนได้

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. Guidelines for the diagnosis, treatment and prevention of leprosy. 2017 [cited 2023 April 30]:[106 p.]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789290226383>.
2. World Health Organization. Global leprosy (Hansen disease) update, 2021: moving towards interruption of transmission. *Wkly Epidemiol Rec* 2022; 97: 429-50.
3. WHO Expert Committee on Leprosy & World Health Organization. WHO Expert Committee on Leprosy [meeting held in Geneva from 17 to 24 November 1987] : sixth report. Geneva: World Health Organization; 1988.
4. WHO Expert Committee on leprosy & World Health Organization. WHO Expert Committee on leprosy: eighth report. WHO Technical Report Series [Internet]. 2012 [cited 2023 April 25]:[72 p.]. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/75151>.
5. Buhrer-Sekula S, Smits HL, Gussenhoven GC, *et al*. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1991-5.
6. Burgess PJ, Fine PE, Ponnighaus JM, Draper C. Serological tests in leprosy. The sensitivity, specificity and predictive value of ELISA tests based on phenolic glycolipid antigens, and the implications for their use in epidemiological studies. *Epidemiol Infect* 1988; 101: 159-71.
7. Martinez AN, Britto CF, Nery JA, *et al*. Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3154-9.
8. Reja AH, Biswas N, Biswas S, *et al*. Fite-Faraco staining in combination with multiplex polymerase chain reaction: a new approach to leprosy diagnosis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2013; 79: 693-700.
9. Job CK, Jayakumar J, Williams DL, Gillis TP. Role of polymerase chain reaction in the diagnosis of early leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1997; 65: 461-4.
10. Bishop PJ, Neumann G. The history of the Ziehl-Neelsen stain. *Tubercle* 1970; 51: 196-206.
11. Tharinjaroen CS. Review article: Tuberculosis diagnosis: From knowledge to innovation in public health. *JAMS* 2017; 50: 1-21. (in Thai)

12. Adiga DS, Hippargi SB, Rao G, Saha D, Yelikar BR, Karigoudar M. Evaluation of Fluorescent Staining for Diagnosis of Leprosy and its Impact on Grading of the Disease: Comparison with Conventional Staining. *J Clin Diagn Res* 2016; 10: EC23-EC6.
13. Ngamwachiraporn S, Chomean S, Rerksngarm T. Screening test of *Mycobacterium leprae* infection in paubacillary Leprosy patients by Rapid serological test. *TSTJ* 2018; 26: 1253-63. (in Thai)
14. Nayak SV, Shivarudrappa AS, Mukkamil AS. Role of fluorescent microscopy in detecting *Mycobacterium leprae* in tissue sections. *Ann Diagn Pathol* 2003; 7: 78-81.
15. Ulukanligil M, Aslan G, Tasci S. A comparative study on the different staining methods and number of specimens for the detection of acid fast bacilli. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000; 95: 855-8.
16. Kalagarla S, Alluri R, Saka S, Godha V, Undavalli N, Kolalapudi SA. Efficacy of fluorescent microscopy versus modified Fite-Faraco stain in skin biopsy specimens of leprosy cases - a comparative study. *Int J Dermatol* 2022; 61: 595-9.
17. Swamy AKC, Patra AK. A Study on Comparison between Ziehl Neelsen Staining with Auramine Rhodamine Staining in Diagnosis of Paucibacillary Leprosy. *IJSR* 2019; 10: 177-81.
18. World Health Organization. Laboratory techniques for leprosy.: World Health Organization; 1987. 177 p.
19. Clapasson A, Canata S. Laboratory investigations in leprosy. In: Nunzi E, Massone C, Portaels F, editors. *Leprosy and buruli ulcer: a practical guide*. Cham: Springer International Publishing; 2022. p. 61-70.
20. Rajapracha Samasai Institute. Guidelines for diagnosis of leprosy by slit-skin smear. 1st ed. Nonthaburi: National Buddhism Printing House; 2004. 73 p. (in Thai)
21. Truant JP, Brett WA, Thomas W, Jr. Fluorescence microscopy of tubercle bacilli stained with auramine and rhodamine. *Henry Ford Hosp Med Bull* 1962; 10: 287-96.
22. Girma S, Avanzi C, Bobosha K, *et al*. Evaluation of Auramine O staining and conventional PCR for leprosy diagnosis: A comparative cross-sectional study from Ethiopia. *PLoS Negl Trop Dis* 2018; 12: e0006706.
23. Wichitwechkarn J, Karnjan S, Shuntawut-tisetee S, Sornprasit C, Kampirapap K, Peerapakorn S. Detection of *Mycobacterium leprae* infection by PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 45-9.
24. Landis JR, Koch GG. An application of hierarchical kappa-type statistics in the assessment of majority agreement among multiple observers. *Biometrics* 1977; 33: 363-74.

25. Hayes AF, Krippendorff K. Answering the Call for a Standard Reliability Measure for Coding Data. *Commun Methods Meas* 2007; 1: 77-89.
26. Pattyn SR. The problem of cultivation of *Mycobacterium leprae*. A review with criteria for evaluating recent experimental work. *Bulletin of the World Health Organization* 1973; 49: 403-10.
27. Jariwala HJ, Kelkar SS. Fluorescence microscopy for detection of *M. leprae* in tissue sections. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1979; 47: 33-6.
28. Pollock HM, Wieman EJ. Smear results in the diagnosis of mycobacterioses using blue light fluorescence microscopy. *J Clin Microbiol* 1977; 5: 329-31.
29. Martinez AN, Talhari C, Moraes MO, Talhari S. PCR-based techniques for leprosy diagnosis: from the laboratory to the clinic. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; 8: e2655.
30. Dehe BR, Coulibaly NgD, Kouakou H, *et al.* Comparative assessments of polymerase chain reaction (PCR) assay of repetitive sequence (RLEP) and proline rich antigen (PRA) gene targets for detection of *Mycobacterium leprae* DNA from paucibacillary (PB) and multibacillary (MB) patients in Côte d'Ivoire. *GSCBPS* 2020; 11: 085-92.

อัตราความผิดพลาดในขั้นตอนก่อนการตรวจวิเคราะห์ ของห้องปฏิบัติการในโรงเรียนแพทย์ไทย

นพดล อาชีพ ปรีชญา วงษ์กระจ่าง จิรายุ สุทัศนทรง และ สาทิมา ไหลเวชพิทยา*

ภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร

บทคัดย่อ

ความผิดพลาดที่เกิดขึ้นในขั้นตอนก่อนการตรวจวิเคราะห์ถูกรายงานมามากกว่า 50 ปี แต่ข้อมูลเกี่ยวกับสถิติดังกล่าวในประเทศไทยยังมีค่อนข้างน้อย งานวิจัยนี้จึงรวบรวมข้อมูลสาเหตุและความถี่ของความผิดพลาดก่อนการวิเคราะห์ที่พบในห้องปฏิบัติการ ภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลศิริราช ซึ่งเป็นหนึ่งในโรงพยาบาลระดับตติยภูมิและโรงเรียนแพทย์ในประเทศไทย การศึกษานี้ใช้ข้อมูลในอดีตของสิ่งส่งตรวจที่ถูกปฏิเสธโดยห้องปฏิบัติการ ภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลศิริราช ในช่วงระยะเวลาตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2560 ถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2561 โดยแบ่งความผิดพลาดจาก 3 แหล่งที่มา คือ แผนกผู้ป่วยนอก แผนกผู้ป่วยใน และจากโรงพยาบาลหรือห้องปฏิบัติการอื่น ๆ ภายนอกโรงพยาบาลศิริราช ทำการวิเคราะห์ด้วยสถิติเชิงพรรณนาและคำนวณค่า Six Sigma scale จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจทั้งหมด 2,475,917 ตัวอย่าง พบความผิดพลาดก่อนการวิเคราะห์ทั้งหมด 4,147 ตัวอย่าง (0.17%) โดย 82% มาจากแผนกผู้ป่วยใน ผู้วิจัยแบ่งความผิดพลาดก่อนการวิเคราะห์ออกเป็น 6 ประเภท พบว่าการปฏิเสธสิ่งส่งตรวจเกิดขึ้นจากสาเหตุในระหว่างกระบวนการเก็บตัวอย่างมากที่สุด (84.9%) โดยเฉพาะการพบเลือดที่จับตัวเป็นก้อนเป็นความผิดพลาดประเภทย่อยที่พบบ่อยที่สุด คิดเป็น 63.7% จากสิ่งส่งตรวจที่ถูกปฏิเสธทั้งหมด ผลการศึกษานี้แสดงอัตราการปฏิเสธสิ่งส่งตรวจโดยรวมที่ 0.17% Sigma scale พบว่าค่าความผิดพลาดของแผนกผู้ป่วยนอก แผนกผู้ป่วยใน และจากโรงพยาบาลหรือห้องปฏิบัติการอื่น ๆ ภายนอก เท่ากับ 4.90, 4.10 และ 4.50 ตามลำดับ โดยแผนกผู้ป่วยในได้ค่าต่ำกว่าเกณฑ์การยอมรับ (4.15) ห้องปฏิบัติการและโรงพยาบาลจึงควรวางกลยุทธ์ในการตรวจสอบความผิดพลาดก่อนการตรวจวิเคราะห์และวางแนวทางป้องกันเพื่อลดความผิดพลาดนี้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: การปฏิเสธสิ่งส่งตรวจ ความผิดพลาดที่เกิดขึ้นในขั้นตอนก่อนการตรวจวิเคราะห์ เลือดที่จับตัวเป็นก้อน

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: sathima.lai@mahidol.edu

รับบทความ: 8 กันยายน 2566

แก้ไขบทความ: 20 พฤศจิกายน 2566

รับตีพิมพ์บทความ: 22 พฤศจิกายน 2566

Error Rate of Pre-Analytical Process at Laboratory in Thailand Medical School

Noppadol Arechep, Preechaya Wongkrajang, Jirayu Sutasanasuang
and Sathima Laiwejpithaya*

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

Abstract

Although the topic of pre-analytical errors has been investigated and reported for more than fifty years, pre-analytical error data from Thailand is scarce. Accordingly, this study aimed to monitor the causes and frequency of pre-analytical errors at the Department of Clinical Pathology of Siriraj Hospital — Thailand's largest national tertiary referral center. This study retrospectively evaluated the causes and frequency of clinical pathology specimens that were rejected at the center during the October 2017 to September 2018. The errors were analyzed separately for out-patient, in-patient and outside hospital. Descriptive statistics and the six-sigma scale were used to summarize our findings. Of the 2,475,917 specimens that were received during the study period, there were a total of 4,147 pre-analytical errors (0.17%). Eighty-two percent of those are from our center's in-patient department. Of the 6 broad types of pre-analytical errors that were evaluated, the vast majority occurred during the sample collection process (84.9%). Clotted blood was the single most common error (63.7%). The results of this study revealed an overall specimen rejection rate of 0.17%. The six-sigma scale for out-patient, in-patient and outside hospital were 4.90, 4.10 and 4.50, respectively. The six-sigma scale of in-patient was lower than acceptable limit (4.15). Appropriate detection and prevention strategies should be developed and implemented to effectively reduce this error rate.

Keywords: Specimen rejection, Pre-analytical errors, Clotted blood

*Corresponding author E-mail address: sathima.lai@mahidol.edu

Introduction

Laboratory results are an essential component of patient care management. Correspondingly, quality standards in laboratory medicine are established at the national healthcare policy level in most countries, such as the Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA) in the United States.⁽¹⁾

The evolution of laboratory error detection and quality improvement has been investigated and reported for more than 50 years.^(2, 3) The total testing process can be divided into three phases, including the pre-analytical, analytical, and post-analytical phases. Overall errors were reported to be as high as 0.31% to 0.47% of all tests analyzed in a laboratory. The highest error rate was found in the pre-analytical phase, accounting for 60-70% of all errors.⁽⁴⁻⁶⁾ This rate was lower than error rate in the pre-analytical phase in Thailand which ranged from 60-85%.^(7, 8)

Errors can occur during any of the steps of the pre-analytical process, including test ordering, patient preparation and identification, specimen identification, sample collection, sample handling, and transport to the laboratory.^(5, 9) The fact that most of these processes are performed outside the laboratory makes them difficult to control.⁽¹⁰⁾ Nevertheless, it is important to monitor the pre-analytical errors and to develop and implement strategies or interventions to reduce the error rate.^(5, 7-10) Improvement in this

parameter would hasten and improve the accuracy of diagnosis, treatment, lower costs, and improve patient outcomes.

Although pre-analytical error has been widely investigated in other countries, pre-analytical error data from Thailand is scarce. Accordingly, this study aimed to monitor the causes and frequency of pre-analytical errors at the Department of Clinical Pathology of Siriraj Hospital — Thailand's largest national tertiary referral center.

Materials and Methods

This retrospective study was performed at the Central Laboratory, Special Laboratory and Molecular Pathology Laboratory in the Department of Clinical Pathology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand. Pre-analytical errors that occurred during the October 2017 to September 2018 study period were included by Laboratory Information System (LIS). The protocol for this study was approved by the Siriraj Institutional Review Board (SIRB) [540/2561 (Exempt)].

The Department of Clinical Pathology provides 7 million tests per year (70% for out-patients, 29% for in-patients, 1% for outside hospital) for clinical chemistry, hematology, coagulation, clinical microscopy, molecular, and serology.

For in-patient ward, blood drawing and sample collection are performed by nurses from the individual wards while out-patient unit,

medical technologists of the Department of Clinical Pathology are the person who responsible for this service. All specimens are transported manually by ward staff and messengers of Siriraj hospital every 30-45 minutes. All specimens are analyzed within 30 minutes after registration at the Laboratory of Department of Clinical Pathology.

All identified pre-analytical errors were classified into 1 of the following 6 categories: 1) Incorrect identification or mislabeling 2) Inappropriate request form 3) Collection error 4) Inappropriate transportation 5) Sample interference 6) Miscellaneous

Statistical analysis

Descriptive statistics were used to summarize pre-analytical error data. Microsoft Excel software (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) was used to manage and process data. Error type data are shown as frequency and percentage.

The result of pre-analytical error rate in each source was evaluated with the six-sigma scale by Westgard calculator. The acceptable criterion for six-sigma is more than or equal to 4.15.⁽¹¹⁾

Results

Of the 2,475,917 specimens that were received during the study period, there were a total of 4,147 pre-analytical errors (0.17%). Eighty-two percent of those errors were from

our center's in-patient department, 17% from the out-patient department, and 1% from outside hospitals. Sigma scale ranged from 4.1-4.9: out-patient = 4.9, in-patient = 4.1, outside = 4.5, and total = 4.5. The sources (out-patient, in-patient, or outside) of rejected specimens are shown in Table 1.

Of the 6 major types of pre-analytical errors that were evaluated, the vast majority occurred during the sample collection process (84.9%). The second most common was miscellaneous (6.3%) while inappropriate transportation was the least common error (1.4%). The other three errors, which were sample interference, incorrect identification or mislabeling, and inappropriate request form showed nearly the same frequencies at around 2.4-2.6%. For the single cause of pre-analytical errors, clotted blood was the most common one (63.7%). The types and frequencies of pre-analytical errors are given in Table 2.

The distribution of rejected specimens by month is presented in Fig.1. The highest reported number of rejected specimens was 427 in August 2018 (14 specimens/day), and the lowest number was 276 in April 2018 (9 specimens/day). The average rejection rate was 346 specimens/month or 11 specimens/day.

Table 1 Sources of rejected specimens during October 2017 to September 2018.

Source	Number of rejected specimens	Total specimens	%	Sigma
Out-patient	692	1,733,142	0.04%	4.9
In-patient	3,413	718,016	0.48%	4.1
Outside	42	24,759	0.17%	4.5
Total	4,147	2,475,917	0.17%	4.5

Table 2 Types and frequencies of pre-analytical errors (total specimens = 2,475,917).

Cause of rejection	Number of rejected specimens	%
<u>Incorrect identification or mislabeling</u>		
Wrong patient identification	97	2.3
No patient identification on container or request form	4	0.1
<i>Subtotal</i>	101	2.4
<u>Inappropriate request form</u>		
Incorrect information in request form	87	2.1
Incomplete filling request form	13	0.3
<i>Subtotal</i>	100	2.4
<u>Collection error</u>		
Clotted sample	2,640	63.7
Inadequate specimen to anticoagulant volume ratio	274	6.6
Insufficient specimen volume	233	5.6
Specimen not received	167	4.0
Inappropriate specimen type or time for test analysis	147	3.5
Specimen contaminated with infusion fluid or other substance	50	1.2
Inappropriate container	6	0.1
Leaking specimen	5	0.1
<i>Subtotal</i>	3,522	84.9

Table 2 Types and frequencies of pre-analytical errors (total specimens = 2,475,917). (Cont.)

Cause of rejection	Number of rejected specimens	%
<u>Inappropriate transportation</u>		
Delay in specimen transport	24	0.6
Inappropriate temperature during transport	24	0.6
Delivered to wrong laboratory	8	0.2
<i>Subtotal</i>	56	1.4
<u>Sample interference</u>		
Hemolysis	39	0.9
Too viscous or turbid	30	0.7
Hemoconcentration (Hematocrit > 55%)	28	0.7
Other interference due to patient's condition	9	0.2
<i>Subtotal</i>	106	2.6
<u>Miscellaneous</u>		
Duplicate check in	89	2.1
Request additional test beyond acceptable limit	24	0.6
Patient's financial problem	20	0.5
Test not available	3	0.1
Hospital system error	3	0.1
Others, not specified	123	3.0
<i>Subtotal</i>	262	6.3
Total	4,147	100.0

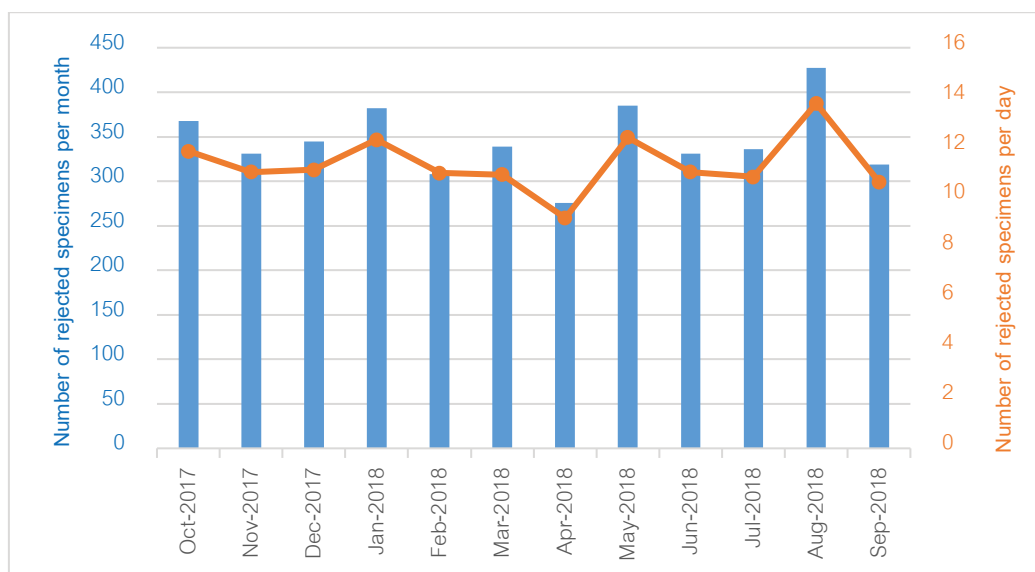


Fig. 1 Distribution of the specimen rejection rate at the Department of Clinical Pathology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University by month.

Discussion

Pre-analytical error in our laboratory was studied by analyzing the rejection data from our LIS. The 0.17% pre-analytical error rate observed in this study was similar to the results of many previous studies (range from 0.11% to 0.75%).^(4, 8, 12-18) Other studies reported higher rates of pre-analytical errors (range from 1.5% to 7.7%).⁽¹⁹⁻²¹⁾ The heterogeneity of pre-analytical error rates may be in part attributable to different study designs and different settings among hospitals.^(14, 15, 22) The sigma of preanalytical error from the in-patient department was the only one that was below acceptable limit. However, sigma scale for overall preanalytical errors found in total specimen sent to our laboratory was 4.5. This

result was similar to the research performed by Phattanapong, *et al.* (six-sigma 4.50) but they evaluated all specimens in hospital.⁽⁸⁾

Most previous studies, except for the study by Wiwanikit, reported a greater number of pre-analytical errors among in-patient department samples, which is comparable to the findings of our study.^(18, 22-24) These higher rates among in-patient samples compared to out-patient and outside samples may be due to the likely worse condition of in-patients or variations among in-patient staff that are responsible for collecting samples.^(9, 15) However, our data revealed a markedly higher proportion of pre-analytical errors among inpatient samples than those previous studies. The status of in-patients is commonly

more severe, and this can lead to more difficult venipuncture. Moreover, in-patient specimens are most often collected by non-laboratory staff (i.e., nurses) whose venipuncture training may be inferior to that of their laboratory-based counterparts. This assertion was supported by a previous study that reported that 64.6% of pre-analytical errors were caused by nurses, compared to 33.2% that were caused by laboratory technicians.⁽⁹⁾ The reason for this problem might be due to lack of knowledge such as inappropriate mixing after blood collection⁽²⁵⁾ or inadequate specimen to anticoagulant volume ratio. Moreover, there is no effective feedback system about the rate of rejection to staff as well as the well-training of blood collection procedures in our hospital.

Our analysis of the distribution of specimen rejection by month revealed that approximately 11-12 specimens were rejected per day during the study period. The rejection rate was higher in August, which might be due to the start of internships for new nurses. The lowest rejection rate was observed in April, and this might be explained by a lower number of test orders due to lower admissions during the long holidays that take place in Thailand during the month of April.

The current study found that more than 80% of pre-analytical errors were attributed to the specimen collection process. The majority of those rejected specimens were clotted blood, which corresponds with the results reported from studies by Alpdemir and Narang. Both of

those studies also found the second most common mistake to be insufficient sample/specimen quantity.^(12, 26) Their classifications might be equivalent to our “inadequate sample to anticoagulant volume ratio” and “insufficient sample volume” categories, which ranked as the second and third most common pre-analytical errors in our study, respectively. In contrast, several other studies reported hemolysis as the most commonly occurring pre-analytical mistake.^(14, 15, 17, 24, 27, 28) Apart from those studies, many others reported a range of pre-analytical error types and frequencies.^(4, 16, 19-21, 23) This variation in findings supports the previously reported assertion that variation in laboratory error rates can be influenced by study design.^(14, 15, 22)

Since pre-analytical errors most often occur outside the laboratory, the development and implementation of strategies to detect and prevent pre-analytic mistakes is essential.^(1, 14, 22, 29)

This study has some mentionable limitations. First, the retrospective design of our study renders it vulnerable to missing or incomplete data. Second, some specimens were rejected without comment, so we were unable to identify the cause of rejection. Third, only the cause and frequency of errors were evaluated in this study, and no system improvement intervention was implemented or evaluated. The findings of this study will be used to develop an educational program designed to lower the specimen rejection rate

at our center. Future studies will evaluate the outcome of that program by comparing that data with the data collected from the present study.

Conclusion

The results of this study revealed an overall specimen rejection rate of 0.17%. Of those, the vast majority (82.3%) were from the inpatient department, and the most commonly occurring error (63.7%) was clotted blood. The six-sigma scale of in-patient unit was outside acceptable limit. Appropriate detection and prevention strategies should be developed and implemented.

Conflict of interest statement

Authors' conflict of interest disclosure:

All authors declare no personal or professional conflicts of interest, and no financial support from the companies that produce and/or distribute the drugs, devices, or materials described in this report.

Research funding: Chalermphrakiat grant, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University.

Employment or leadership: Authors of this study are employees of Department of Clinical Pathology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand

Honorarium: None declared.

References

1. Hammerling JA. A Review of Medical Errors in Laboratory Diagnostics and Where We Are Today. *Lab Med* 2012; 43: 41-4.
2. Plebani M. Diagnostic Errors and Laboratory Medicine - Causes and Strategies. *EJIFCC* 2015; 26: 7-14. [cited 2019 Jan. 28]. Available from: <http://www.ifcc.org/media/331924/eJIFCC2015Vo126No1pp007-014.pdf>.
3. Plebani M. Quality in laboratory medicine: on. *Clin Biochem* 2017; 50: 101-4.
4. Carraro P, Plebani M. Errors in a Stat Laboratory: Types and Frequencies 10 Years Later. *Clin Chem* 2007; 53: 1338.
5. Lippi G, Mattiuzzi C, Bovo C. Are we getting better at the preanalytical phase or just better at measuring it? *J Lab Precis Med* 2018; 3: 11.
6. Plebani M, Carraro P. Mistakes in a stat laboratory: types and frequency. *Clin Chem* 1997; 43: 1348.
7. Kongthong P, Thongsuksai P, Rengrairattanakorn P, Boonyaphiphat P, Chusongsang P, Apirakthunyakorn P. Error in laboratory specimen using barcode system. *Songkla Med J* 2009; 27: 323-3.
8. Phattanapong C, Nucharat W, Pensiri C, *et al.* Evaluation of analytical errors in the clinical chemistry laboratory of Songklanagarind hospital: A 5-year experience. *Arch AHS* 2017; 29: 25-33.

9. Plebani M. Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine? *Clin Chem Lab Med* 2006; 44: 750-9.
10. Lippi G, Guidi GC, Mattiuzzi C, Plebani M. Preanalytical variability: the dark side of the moon in laboratory testing. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44: 358-65.
11. Westgard JO. Six Sigma Calculators. [Internet]. 2009 [cited 2015 May 9] Available from: <https://www.westgard.com/six-sigma-calculators.htm>
12. Alpdemir M, Alpdemir MF, Temiz A. Evaluation of biochemistry laboratory quality indicators according to the national Laboratory Error Classification System. *Int J Med Biochem* 2018; 1: 65-71.
13. Atay A, Demir L, Cuhadar S, *et al.* Clinical biochemistry laboratory rejection rates due to various types of preanalytical errors. *Biochem Med (Zagreb)* 2014; 24: 376.
14. Bonini P, Plebani M, Ceriotti F, Rubboli F. Errors in Laboratory Medicine. *Clin Chem* 2002; 48: 691.
15. Plebani M, Ceriotti F, Messeri G, Ottomano C, Pansini N, Bonini P. Laboratory network of excellence: enhancing patient safety and service effectiveness. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44: 150-60.
16. Rattan A, Lippi G. Frequency and type of preanalytical errors in a laboratory medicine department in India. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46: 1657-9.
17. Romero A, Cobos A, Gómez J, Muñoz M. Role of training activities for the reduction of pre-analytical errors in laboratory samples from primary care. *Clin Chim Acta* 2012; 413: 166-9.
18. Wiwanitkit V. Types and frequency of preanalytical mistakes in the first Thai ISO 9002:1994 certified clinical laboratory, a 6-month monitoring. *BMC Clin Pathol* 2001; 1: 5.
19. Ashakiran S, Sumati ME, Murthy NK. A study of pre-analytical variables in clinical biochemistry laboratory. *Clin Biochem* 2011; 44: 944-5.
20. Bouzid K, Zrelli S, Rebeh A, *et al.* Pre-analytical phase management: identification and control of nonconformities in the sampling room of a clinical laboratory in Tunisia. *J Lab Precis Med* 2018; 3: 1-6.
21. Tapper MA, Pethick JC, Dilworth LL, McGrowder DA. Pre-analytical Errors at the Chemical Pathology Laboratory of a Teaching Hospital. *J Clin Diagn Res* 2017; 11: BC16-BC18.
22. Lippi G, Guidi GC. Risk management in the preanalytical phase of laboratory testing. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45: 720-7.
23. Arul P, Pushparaj M, Pandian K, *et al.* Prevalence and types of preanalytical error in hematology laboratory of a tertiary care hospital in South India. *J Lab Physicians* 2018; 10: 237-40.

24. Chawla R, Goswami B, Tayal D, Mallika V. Identification of the Types of Preanalytical Errors in the Clinical Chemistry Laboratory: 1-Year Study at G.B. Pant Hospital. *Lab Med* 2010; 41: 89-92.
25. Getawa S, Aynalem M, Melku M, Adane T. Blood specimen rejection rate in clinical laboratory: A systematic review and meta-analysis. *Pract Lab Med* 2022 Dec 19; 33: e00303.
26. Narang V, Kaur H, Selhi P, Sood N, Singh A. Preanalytical Errors in Hematology Laboratory- an Avoidable Incompetence. *Iran J Pathol* 2016; 11: 151-4.
27. Lippi G, Bassi A, Brocco G, Montagnana M, Salvagno GL, Guidi GC. Preanalytic Error Tracking in a Laboratory Medicine Department: Results of a 1-Year Experience. *Clin Chem* 2006; 52: 1442.
28. Munilakshmi U, Shashidhar K, Susanna T. Preanalytical variables and its impact on total quality management of clinical biochemistry laboratory- A tertiary referral rural hospital study. *Int J Clin Biochem Res* 2018; 5: 467-72.
29. Rooper L, Carter J, Hargrove J, Hoffmann S, Riedel S. Targeting Rejection: Analysis of Specimen Acceptability and Rejection, and Framework for Identifying Interventions in a Single Tertiary Healthcare Facility. *J Clin Lab Anal* 2017; 31: e22060.



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

ค่าธรรมเนียมการเผยแพร่ ไม่เสียค่าใช้จ่าย

ประเภทของบทความ แบ่งออกเป็น 9 ประเภท คือ

1. บทบรรณาธิการ (Editorials) เป็นบทความซึ่งวิเคราะห์ผลงานทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่มีความสำคัญในวิชาชีพเทคนิคการแพทย์ หรือ

วิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้อง หรืออาจจะเป็นข้อคิดเห็นเพื่อประโยชน์ในด้านการยกระดับวิชาชีพเทคนิคการแพทย์ให้สูงขึ้น

2. บทความปริทัศน์ (Review Article)

เป็นบทความเพื่อฟื้นฟูวิชาการซึ่งรวบรวมผลงานเกี่ยวกับเรื่องใดเรื่องหนึ่งโดยเฉพาะ ที่เคยลงตีพิมพ์ในวารสารอื่นมาแล้วโดยนำเรื่องมาวิเคราะห์ วิวิจารณ์ และเปรียบเทียบเพื่อให้เกิดความกระจ่างแก่ผู้อ่านเกี่ยวกับเรื่องนั้น

3. นิพนธ์ต้นฉบับ (Original Article)

เป็นรายงานเกี่ยวกับผลการวิจัยทางด้านเทคนิคการแพทย์และวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่เกี่ยวข้องโดยไม่เคยตีพิมพ์ที่ไหนมาก่อน

4. บทความพิเศษ (Special Article)

เป็นบทความเกี่ยวกับเรื่องทั่ว ๆ ไปที่มีเนื้อหาและสาระที่เป็นประโยชน์และสร้างสรรค์ เพื่อพัฒนาผู้อ่านวารสารทุกระดับให้ได้รับความรู้ความสามารถ เพื่อนำองค์ความรู้ไปประยุกต์ใช้ในชีวิตประจำวัน เช่น เรื่องเกี่ยวกับหลักธรรมะ ศิลปะการพูด ฯลฯ

5. รายงานการประชุมวิชาการ (Seminar Report) เป็นรายงานจากการประชุมสัมมนาวิชาการที่เป็นประโยชน์แก่ผู้อ่านวารสารเทคนิคการแพทย์

6. รายงานกรณีศึกษา (Case Report)

เป็นรายงานเกี่ยวกับการวินิจฉัยโรคในผู้ป่วยรายที่นำเสนอทั้งทางด้านประวัติผลการตรวจร่างกาย และการตรวจทางห้องปฏิบัติการคลินิกร่วมกัน

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

8. จดหมายถึงบรรณาธิการ (Letter to the Editor) เป็นบทความซึ่งเสนอข้อคิดเห็นและประสบการณ์ทางด้านวิชาการที่เกี่ยวข้องกับงานในสาขาวิชาชีพเทคนิคการแพทย์อย่างสั้น ๆ ในรูปของจดหมายถึงบรรณาธิการ

9. ย่อวารสาร (Abstract Review) เป็นการย่อบทความทางวิชาการด้านเทคนิคการแพทย์

และวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องและน่าสนใจ ซึ่งได้รับการตีพิมพ์แล้วในวารสารนานาชาติ เป็นภาษาไทย

การเตรียมต้นฉบับ

เพื่อให้การตีพิมพ์บทความเป็นไปอย่างถูกต้องและรวดเร็วผู้นิพนธ์จะต้องปฏิบัติตามรายละเอียด ดังนี้

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

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

ส่งต้นฉบับของบทความหรือบทความต่าง ๆ ทางเว็บไซต์ของวารสารฯ ผ่านระบบจัดการวารสารอิเล็กทรอนิกส์ Thai Journals Online (ThaiJo) <https://heo1.tci-thaijo.org/index.php/jmt-amtt>

3. ชื่อเรื่อง ชื่อผู้นิพนธ์ ชื่อหน่วยงานและสถาบันให้แยกไฟล์ต่างหาก

3.1 ชื่อเรื่อง มีทั้งภาษาไทย และภาษาอังกฤษ ซึ่งควรให้สั้นแต่ได้ใจความ ไม่ควรใช้คำย่อในเรื่อง ยกเว้นคำที่เป็นที่ยอมรับกันทั่วไป เช่น NADH ความยาวของชื่อเรื่องควรมีความชัดเจน สามารถบ่งบอกผู้อ่านให้ทราบถึงสาระสำคัญของเนื้อหาและรายละเอียดในตัวบทความ

3.2 ชื่อผู้นิพนธ์และผู้ร่วมนิพนธ์ทุกคน ให้เขียนชื่อต้นและนามสกุลตัวเต็มทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ไม่ต้องระบุปริญญา ตำแหน่งทางวิชาการ หรือ ตำแหน่งทางราชการ ในกรณีที่มิใช่ผู้แต่งหลายคน

ระบุชื่อผู้รับผิดชอบบทความและ E-mail address ที่สามารถติดต่อได้

3.3 ผู้ร่วมนิพนธ์ทุกคนให้ระบุชื่อหน่วยงาน และสถาบัน สถานที่ และ E-mail address ที่สามารถติดต่อได้

4. รายละเอียดของนิพนธ์ต้นฉบับและบทความวิจัยอย่างสั้นให้เรียงหัวข้อ ตามลำดับต่อไปนี้

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

5. ตาราง แผนภูมิ ภาพประกอบ ให้แยกไว้ท้ายบทความโดยใช้หนึ่งหน้าต่อหนึ่งตาราง หรือหนึ่งแผนภูมิ สำหรับภาพเป็นระบบอิเล็กทรอนิกส์ให้บันทึกภาพโดยใช้นามสกุล .jpg หรือ .tif สำหรับข้อความ และคำอธิบายในตารางและภาพใช้เป็นภาษาอังกฤษ

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) หน้าที่ต้นและหน้าสุดท้าย

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 ประ찬เป็นผู้แต่ง

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

6.2.4 บทในหนังสือ

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

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

6.2.5 สิ่งตีพิมพ์ขององค์กรต่างๆ

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

6.2.6 หนังสือรายเดือนและรายปักษ์

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

6.2.7 หนังสือพิมพ์รายวัน

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

6.3 ตัวอย่างการอ้างอิงเอกสารอิเล็กทรอนิกส์

6.3.1 CD-ROM

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

6.3.2 บทความวารสารทางอินเทอร์เน็ต (Journal article on the Internet)

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

6.3.3 หนังสือทางอินเทอร์เน็ต (Monograph on the Internet)

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

6.3.4 โฮมเพจ/เว็บไซต์ (Homepage/Website)

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



วสส.

เทคนิคการแพทย์

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย ในพระอุปถัมภ์ พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี กรมหมื่นสุทธนารีนาถ

Check list การเตรียมต้นฉบับ วสส.เทคนิคการแพทย์

เอกสารประกอบพิจารณา และความรับผิดชอบของผู้แต่งหรือคณะผู้แต่ง

- ☐ ผู้แต่งหรือคณะผู้แต่งออกหนังสือรับรองว่า กำลังส่งบทความให้วารสารเทคนิคการแพทย์พิจารณาเท่านั้น บทความนี้หรือบางส่วนของบทความไม่เคยตีพิมพ์ที่ไหนมาก่อน ถ้าบทความได้รับการตอบรับจากกองบรรณาธิการ บทความและบางส่วนของบทความนี้ จะตีพิมพ์โดย “วารสารเทคนิคการแพทย์” เพียงแห่งเดียวเท่านั้น
- ☐ การเสนอชื่อผู้ทรงคุณวุฒิเป็น Reviewer โดยผู้ทรงคุณวุฒิเป็นผู้มีผลงานวิชาการอย่างสม่ำเสมอ และต้องเป็นบุคคลจากภายนอกสถาบันของผู้แต่ง 3 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
- ☐ พิมพ์ยกระดับเหนือข้อความและมีวงเล็บ
- ☐ อ้างอิงท้ายบทความตามคำแนะนำผู้แต่ง (Suggestion for Authors)

หน้าแรก (title page) เขียนเป็นภาษาไทย และ อังกฤษ

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

ประเภทบทความ

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

นิพนธ์ต้นฉบับและบทความวิจัยอย่างสั้น ให้ลำดับเนื้อหาดังต่อไปนี้

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

บทความปริทัศน์

อนุโลมตามผู้แต่ง แต่ให้มีขอบข่ายรูปแบบการเขียน ประกอบด้วย บทคัดย่อ บทนำ เนื้อเรื่อง สรุป

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

ลงชื่อ ผู้รับผิดชอบบทความ

(.....)

Clinical Immunology Products

Immunology Analyzer

maccura



I1000

mindray



CL-900i

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

VTM

Transfer sample into the cartridge



30 mins

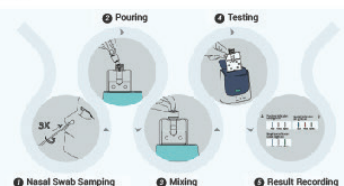
200 copies/mL
(SARS-CoV-2)



Thermo Cycler

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., Samsaenok, 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