

วารสาร



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 61 ฉบับที่ 2 เมษายน - มิถุนายน 2562 Vol. 61 No. 2 April - June 2019

ISSN 0125-684X

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จัดทำโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เพื่อเผยแพร่ผลงานวิชาการด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ทุกสาขา

เจ้าของ	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข	
ที่ปรึกษาด้านบริหาร	นพ.โอภาส การย์กวินพงศ์ นพ.สมฤกษ์ จิงสมาน	นพ.พิเชฐ บัญญัติ นพ.สมชาย แสงกิจพร
ที่ปรึกษาด้านวิชาการ	ศ.เกียรติคุณ นพ.ประเสริฐ ทองเจริญ พญ.มยุรา กุสุมภ์ ภญ.ดร.จงดี ว่องพินัยรัตน์ นางปนัดดา ชิลวา นางธีรนาถ จิระไพศาลพงศ์	ภญ.อมรา วงศ์พุทธพิทักษ์ นางพิมพ์ใจ นัยโกวิท นางสาวสุมล ปวีตรานนท์ นางปราณี ชวลิตธำรง
บรรณาธิการ	ดร.บุษยวรรณ ศรีวรรณะ	
รองบรรณาธิการ	ดร.เดือนฉนอม พรหมชาติแก้ว นายสุธน วงษ์ชีรี ดร.อภิวัฏ ธวัชสิน	นางกนกพร อธิสุข นางวิชชุดา จริยะพันธุ์ นางสาวมาลินี จิตตกานต์พิชัย
คณะบรรณาธิการ	ศ.เกียรติคุณ ดร.ไพโรจน์ พุฒินะ ศ.ดร.นพ.ประเสริฐ เอื้อวรากุล ศ.พญ.พรรณิ ปิติสุทธิธรรม ดร.นพ.ปฐม สวรรค์ปัญญาเลิศ รศ.ดร.พญ.พิมพ์พิภพ พงษ์เพชร ผศ.สุชาดา ไชยสวัสดิ์ ดร.दनัย ทิวาเวช ภญ.สุวรรณา จารุณช ดร.สลักจิต ชูติพงษ์วิเวท ศ.ดร.นพ.เผด็จ สิริยะเสถียร ศ.ดร.พรพิมล กองทิพย์ รศ.ดร.ศรีสุรางค์ ตันติมาวานิช รศ.ดร.นวลฉวี เวชประสิทธิ์ ดร.สุณี ศิริวิชัยกุล ภญ.ดร.สุภาณี ดวงธีรปรีชา ดร.ปิยะดา หวังรุ่งทรัพย์ ดร.วันทนา ปวีณกิตติพร ดร.ดวงเพ็ญ ปัทมดิลก ภญ.ดร.ไตรพร วัฒนนาถ	มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยมหิดล สำนักงานปลัดกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี มหาวิทยาลัยนเรศวร มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยรามคำแหง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
ฝ่ายจัดการ	นางสาวน้ำฝน น้อยประเสริฐ นางสาวประสาน จุลวงษ์	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
กำหนดออก อัตราสมาชิก	ราย 3 เดือน ในประเทศปีละ 200.- บาท ต่างประเทศปีละ 50.00 เหรียญสหรัฐอเมริกา	
สำนักงานวารสาร	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 88/7 ซอยติวานนท์ 14 ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000 โทร. 0-2951-0000 โทรสาร 0-2951-1297	
พิมพ์ที่	หจก. อรุณการพิมพ์ 457/6-7 ถนนพระสุเมรุ แขวงบวรนิเวศ เขตพระนคร กรุงเทพฯ 10200 โทร. 0-2282-6033-4	

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 61 ฉบับที่ 2 เมษายน - มิถุนายน 2562

Vol. 61 No. 2 April - June 2019

สารบัญ

หน้า

นิพนธ์ต้นฉบับ

- การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์กรดเบนโซอิก กรดซาลิซิลิก และกรดซอร์บิก
ในหมุยอ โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
พัชรिता พิชัย 48
- ประสิทธิภาพเชิงปริมาณในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของเจลทามือในประเทศไทย ชนิดที่มีแอลกอฮอล์
เป็นส่วนประกอบ เมื่อทดสอบด้วย **Modified EN 1276: 2009 method**
สุวรรณา เอียรอังกูร ปรียา ปิ่นนิล กนกอร กรีเหลี่ยม และสิริววรรณ อันเกตุ 60

รายงานจากห้องปฏิบัติการ

- ความชุกของการติดเชื้อไวรัส **Human papillomavirus (HPV)** และไทป์ต่างๆ
ในสตรีไทยที่มีผลแปปสเมียร์ปกติ 73
ทุมวดี ตั้งศิริวัฒนา สุขใจ ผลอำไพสถิตย์ อัญชลี ชัยนวล กรองทิพย์ บุญสม สังคม วิทยนันท์
สมคิด ธิจักร์ ปริศนา วงศ์วีรพันธ์ เยาวมาลย์ สุตวิจิตร จารุวรรณ ทองนาค
พิไลลักษณ์ อัดคไพบูลย์ โอภาตะ สมรัตน์ เลิศมหาฤทธิ์ และสมชาย แสงกิจพร
- การประเมินคุณภาพของชุดน้ำยาตรวจแอนติเจนของไวรัสตับอักเสบบีแบบรวดเร็วในประเทศไทย 86
เกรียงศักดิ์ ฤชศาวัต จงกลนี วงศ์ปิยะบวร ลัดดาวัลย์ เทียมสิงห์ ชลธิชา กาวิดำ
สุทธวิวัฒน์ ลำไย เพทาย อุ่นผล สุนิดา วานเดอลาร์ ปิยะ วงศ์จำปา วิไล เฉลิมจันทร์
และสมชาย แสงกิจพร

CONTENTS

Page

Original Articles

- Method Validation for Determination of Benzoic Acid, Salicylic Acid and Sorbic Acid in Vietnamese Pork Sausage by High Performance Liquid Chromatography** 48
Patcharida Pichai

- Quantitative Bactericidal Efficacy of Alcohol-Based Handrub in Thailand Using Modified EN 1276: 2009 Method** 60
Suwunna Tienungoon Preeya Pinnil Kanok-on Kreelieng and Sirawan Onket

Laboratory Findings

- Prevalence of Human papillomavirus (HPV) Infection and Genotypes in Thai Women with Normal Cervical Cytology** 73
Thumwadee Tangsiriwatthana Sukjai Pholampaisathit Anchalee Chainual Krongthip Boonsom Sangkom Vittayanan Somkhid Thichak Prissana Wongveerakhant Yavamal Sutivigit Jaruwan Thongnark Pilailuk Akkpaiboon Okada Somrat Lertmaharit and Somchai Sangkitporn

- Evaluation of HBsAg Rapid Test Kits in Thailand** 86
Kriangsak Ruchusatsawat Jongkonnee Wongpiyabovorn Laddawan Thiemsing Chonthicha Kawidam Suttiwat Lumyai Petai Unpol Sunida Vandelaer Piya Wongchampa Wilai Chalermchan and Somchai Sangkitporn



บรรณาธิการแถลง



เนื่องจากพบข้อผิดพลาดในการพิมพ์ของบทความที่ได้เผยแพร่แล้ว 2 เรื่อง ดังนี้

1. เอกสารอ้างอิงของบทความเรื่อง การวิเคราะห์การปนเปื้อน *Clostridium botulinum* และสารพิษโบทูลินัม ในน้ำปลาไทย ที่ตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปีที่ 60 ฉบับที่ 4 ตุลาคม-ธันวาคม 2561 หน้า 196-204
2. Revised Date ของบทความเรื่อง การสร้างเซลล์ลูกลูกผสม Dendritic cells กับเซลล์มะเร็งเต้านมในหลอดทดลองเพื่อกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกัน ที่ตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปีที่ 61 ฉบับที่ 1 มกราคม-มีนาคม 2562 หน้า 18-30

ข้อผิดพลาดดังกล่าวได้รับการแก้ไขเรียบร้อยแล้วดังปรากฏในวารสารออนไลน์ฉบับดังกล่าว

บุษราวรรณ ศรีวรรณะ

บรรณาธิการวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ กรดเบนโซอิก กรดซาลิซิลิก และกรดซอร์บิกในหมุยอ โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

พัชรिता พิชัย

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 เชียงใหม่ อำเภอแมริม จังหวัดเชียงใหม่ 50180

บทคัดย่อ วัตถุเจือปนอาหาร กลุ่มเบนโซเอต (กรดเบนโซอิกและเกลือของกรดเบนโซอิก) และกลุ่มซอร์เบต (กรดซอร์บิกและเกลือของกรดซอร์บิก) เป็นวัตถุกันเสียตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 281 พ.ศ. 2547 และตั้งแต่ พ.ศ. 2559 กระทรวงสาธารณสุขได้ออกประกาศ ฉบับที่ 381 เรื่อง วัตถุเจือปนอาหาร (ฉบับที่ 4) ไม่อนุญาตให้ใช้วัตถุเจือปนกลุ่มเบนโซเอตในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ สำหรับวัตถุเจือปนกลุ่มซอร์เบต กฎหมายอนุญาตให้ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บดและผ่านกรรมวิธีได้ 1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนกรดซาลิซิลิกได้ถูกกำหนดให้เป็นวัตถุที่ห้ามใช้ในอาหาร ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 391 พ.ศ. 2561 จึงได้ศึกษาและพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ กรดเบนโซอิก กรดซาลิซิลิก และกรดซอร์บิก ในลูกชิ้นและหมุยอ โดยการสกัดตัวอย่างด้วย ammonium acetate buffer กับ methanol (60:40) และฉีดเข้าเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงในสภาวะที่กำหนด และได้ทดสอบความถูกต้อง พบว่าวิธีมีความเหมาะสมโดยมีขีดจำกัดของการตรวจพบ และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณของกรดเบนโซอิก กรดซาลิซิลิก และกรดซอร์บิก เท่ากับ 6 และ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ช่วงกราฟมาตรฐานให้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง คือ 0.5–60.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และช่วงการใช้งาน คือ 10–1,200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.9999 ทั้ง 3 ชนิด ความแม่นยำแสดงด้วยค่าเฉลี่ยของ % recovery โดยกรดเบนโซอิก กรดซาลิซิลิก และกรดซอร์บิก อยู่ในช่วง 97.06–100.01%, 95.75–100.02% และ 98.30–100.29% ตามลำดับ ความเที่ยงแสดงด้วยค่า % Relative Standard Deviation อยู่ในช่วง 0.14–0.90, 0.18–0.94 และ 0.15–0.83 ตามลำดับ ในการแผ้วถางความปลอดภัยของลูกชิ้นและหมุยอที่จำหน่ายในจังหวัดเชียงใหม่ในระหว่างเดือนตุลาคม 2558 ถึงเดือนกันยายน 2560 ได้ตรวจวิเคราะห์รวม 84 ตัวอย่าง โดยใช้วิธีที่ทดสอบความถูกต้องแล้ว พบว่า ทุกตัวอย่างตรวจไม่พบกรดซาลิซิลิก แต่พบกรดเบนโซอิกร้อยละ 78.6 ของตัวอย่าง ซึ่งนับว่าไม่เป็นไปตามมาตรฐาน และตรวจพบกรดซอร์บิกร้อยละ 11.9 แต่ปริมาณต่ำกว่าที่กฎหมายกำหนดทั้งหมด แสดงให้เห็นว่าวิธีนี้สามารถนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์และสำรวจกรดเบนโซอิก กรดซาลิซิลิก และกรดซอร์บิกในตัวอย่างหมุยอ เพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคต่อไป

Corresponding author E-mail: patcharida.p@dmsc.mail.go.th

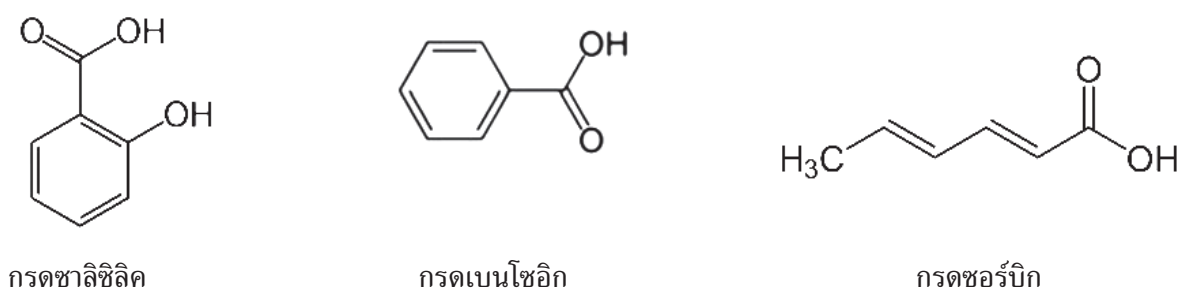
Received: 14 February 2018

Revised: 12 February 2019

Accepted: 6 June 2019

บทนำ

วัตถุเจือปนอาหาร ใช้เจือปนอาหารเพื่อประโยชน์ทางเทคโนโลยีการผลิต การแต่งสีอาหาร การปรุงแต่งกลิ่นรส การบรรจุ การเก็บรักษา และการขนส่ง จากประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 281 พ.ศ. 2547⁽¹⁾ เรื่อง วัตถุเจือปนอาหาร และฉบับที่ 381 พ.ศ. 2559⁽²⁾ เรื่อง วัตถุเจือปนอาหาร (ฉบับที่ 4) กำหนดให้ต้องใช้วัตถุเจือปนอาหาร หมวดหรือชนิดอาหาร และปริมาณสูงสุดที่อนุญาตที่กำหนดไว้ ซึ่งปริมาณดังกล่าวสอดคล้องกับปริมาณที่คณะกรรมการอาหารระหว่างประเทศ (Codex Alimentarius Commission; Codex) อนุญาตให้นำมาใช้ในการผลิตอาหารได้ เพราะผ่านการประเมินความปลอดภัยทางพิษวิทยาแล้วว่ามีความเป็นพิษต่ำ โดย The Joint FAO/WHO Expert Committee of Food Additives (JECFA) ได้กำหนดค่าความปลอดภัยไว้เป็นค่า Acceptable Daily Intake (ADI) เป็นปริมาณที่ร่างกายสามารถได้รับสารนั้นต่อวันตลอดชีวิต โดยที่ไม่ก่อให้เกิดผลกระทบใด ๆ ต่อสุขภาพ⁽³⁾ ผลิตภัณฑ์อาหารของไทยต่าง ๆ ในหมวดอาหารแปรรูป หรืออาหารพร้อมบริโภค เช่น ลูกชิ้น หมุยอ เป็นต้น นิยมใช้วัตถุเจือปนอาหารเพื่อทำหน้าที่สารกันเสีย โดยวัตถุเจือปนอาหารที่มีการใช้มาก ได้แก่ กลุ่มเบนโซเอต (กรดเบนโซอิก และเกลือของกรดเบนโซอิก) กลุ่มซอร์เบต (กรดซอร์บิกและเกลือของกรดซอร์บิก) และอาจมีการใช้กรดซาลิซิลิกด้วย ปัจจุบันกฎหมายอาหารของประเทศไทยไม่อนุญาตให้ใช้วัตถุเจือปนกลุ่มเบนโซเอตในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ อีกทั้งยังมีรายงานผลการวิจัยว่าการใช้โซเดียมเบนโซเอตไม่ได้ช่วยยืดอายุการเก็บรักษาหมุยอ⁽⁴⁾ สำหรับวัตถุเจือปนกลุ่มซอร์เบต กฎหมายอนุญาตให้ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์สดและผ่านกรรมวิธีได้ 1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม⁽²⁾ ส่วนกรดซาลิซิลิก กำหนดให้เป็นวัตถุที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือจำหน่าย ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 391 พ.ศ. 2561⁽⁵⁾ กรดซาลิซิลิกเป็นกรดที่อันตรายต่อร่างกายมาก ถ้าบริโภคกรดซาลิซิลิกที่มีความเข้มข้นในเลือดปริมาณ 25 ถึง 35 มิลลิกรัมต่อเลือด 100 มิลลิกรัม จะมีอาการอาเจียน หูอื้อ มีไข้ กระวนกระวาย ชัก ไตวาย และอาจถึงเสียชีวิตได้⁽⁶⁾ โดยที่กรดทั้ง 3 ชนิด มีสูตรโครงสร้าง⁽⁷⁾ ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างของกรดซาลิซิลิก กรดเบนโซอิก และกรดซอร์บิก

การตรวจวิเคราะห์วัตถุเจือปนกลุ่มดังกล่าวในอาหาร โดยใช้วิธีมาตรฐาน Official Method of Analysis of AOAC international มีขั้นตอนการวิเคราะห์คือ กลั่นด้วยไอน้ำ และตรวจวัดด้วย UV-Vis Spectrophotometer⁽⁸⁾ ข้อดีคือ สารที่สกัดได้สะอาด ไม่มีสารรบกวน แต่มีข้อเสียคือ อาจเกิดการสลายของสารที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ได้ง่าย หากมีการรบกวนของระบบ และวิธีการกลั่นใช้สารเคมีหลายชนิด ใช้เวลานานประมาณ 30 นาที ในการกลั่นแต่ละตัวอย่าง ดังนั้นเพื่อลดระยะเวลาการตรวจวิเคราะห์ ลดต้นทุนต่อหน่วย ลดการใช้สารเคมี และลดของเสียจากห้องปฏิบัติการ

จึงได้ศึกษาวิธีมาตรฐาน ISO 22855: 2008⁽⁹⁾ ประยุกต์ใช้วิธีนี้กับผลิตภัณฑ์อาหารคือ หมูยอ โดยสกัดตัวอย่าง และตรวจวัดปริมาณด้วยเครื่องมือ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยห้องปฏิบัติการเดียวตาม Eurachem Guide⁽¹⁰⁾ เพื่อให้ได้วิธีที่เหมาะสมสามารถนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์เพื่อเฝ้าระวังการใช้วัตถุกันเสียในหมูยอและผลิตภัณฑ์อาหารอื่น ๆ โดยใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นในการเฝ้าระวังคุณภาพผลิตภัณฑ์อาหาร ได้แก่ หมูยอ และลูกชิ้น ที่เก็บจากสถานที่จำหน่ายในเขตจังหวัดเชียงใหม่

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่าง

ตัวอย่างหมูยอที่ผลิตขึ้นโดยไม่มีการใช้วัตถุเจือปน สำหรับใช้เป็น sample blank เพื่อทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

ตัวอย่างหมูยอ ลูกชิ้น รวม 84 ตัวอย่าง เก็บจากสถานที่จำหน่ายในเขตจังหวัดเชียงใหม่ โดยเจ้าหน้าที่สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดเชียงใหม่ ระหว่างเดือนตุลาคม 2558 ถึงเดือนกันยายน 2560

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง, pH-meter, Magnetic stirrer with TFE-coated stirring bar, เครื่องปั่น, เครื่อง Ultrasonic bath, กระดาษกรองชนิด Nylon 66 ที่มีรูพรุนขนาด 0.45 ไมโครเมตร ขนาด 13 และ 47 มิลลิเมตร, กระดาษกรอง เบอร์ 42

เครื่อง HPLC: Agilent 1100 Series, Column: ZORBAX Eclipse XDB-C18 (150 mm x 4.6 mm x 5 μ m), Column temperature: 30° C, Injection volume: 10 μ L, Flow rate: 1.0 mL/min, UV detector wavelength: 235 nm

Mobile phase: Solvent A: 0.01 M Ammonium acetate buffer pH 4.5-4.6, Solvent B: Methanol

Gradient condition:

No.	Time (min)	% solvent (A)	% solvent (B)
1.	0.00	82.0	18.0
2.	10.00	55.0	45.0
3.	12.00	55.0	45.0
4.	12.50	82.0	18.0
5.	15.00	82.0	18.0

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารมาตรฐานทุกชนิดเป็นผลิตภัณฑ์ของ Sigma-Aldrich® ได้แก่ sodium benzoate (purity 99.9%), sodium salicylate (purity 99.8%) และ potassium sorbate (purity 100.2%)

สารเคมีทุกชนิดเป็น reagent grade ยกเว้นที่ระบุไว้ ได้แก่ methanol (HPLC grade), glacial acetic acid, ammonium acetate, potassium ferrocyanide, zinc acetate และ น้ำ Type I

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

Standard stock solution กรดเบนโซอิก (benzoic acid) กรดซาลิซิลิก (salicylic acid) และกรดซอร์บิก (sorbic acid) ความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชั่งสารมาตรฐานแต่ละชนิด (sodium benzoate, sodium salicylate และ potassium sorbate) อย่างแม่นยำให้มีเนื้อสาร (benzoic acid, salicylic acid และ sorbic acid) 500 มิลลิกรัม ละลายปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ ใช้เตรียมสารละลายมาตรฐานผสม ความเข้มข้น 1,000 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (mg/L)

การเตรียมสารละลาย

สารละลาย 0.01 M ammonium acetate buffer pH 4.5–4.6 เตรียมโดยละลาย ammonium acetate 0.77 กรัม ด้วยน้ำประมาณ 900 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วย acetic acid ให้ได้ pH 4.5–4.6 ปรับปริมาตรด้วยน้ำ เป็น 1,000 มิลลิลิตร กรองด้วย membrane filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

สารละลาย extracting solution นำสารละลาย buffer มา 60 ส่วน ผสมให้เข้ากันกับ methanol 40 ส่วน

สารละลาย Carrez I เตรียมโดยละลาย potassium ferrocyanide 150 กรัม ด้วยน้ำ ปรับปริมาตร เป็น 1,000 มิลลิลิตร

สารละลาย Carrez II เตรียมโดย ละลาย zinc acetate 230 กรัม ด้วยน้ำ ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

การตรวจวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่างหมอยอบแต่ละเม็ด น้ำหนัก 5 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร ล้างบีกเกอร์ด้วยน้ำร้อนประมาณ 10 มิลลิลิตร เติมสารละลาย extracting solution ประมาณ 80 มิลลิลิตร สารละลาย Carrez I และสารละลาย Carrez II อย่างละ 1 มิลลิลิตร ปรับให้ครบปริมาตรด้วย extracting solution เขย่าให้เข้ากัน วางไว้ใน ultrasonic bath เป็นเวลา 30 นาที ตั้งให้แยกชั้น 15 นาที กรองด้วย กระดาษกรองเบอร์ 42 แล้วกรองด้วยแผ่นกรองชนิด Nylon 66 นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณ benzoic acid, salicylic acid และ sorbic acid ด้วยเทคนิค HPLC ตามสภาวะที่กำหนดคำนวณปริมาณเทียบกับกราฟมาตรฐาน

การทดสอบความถูกต้องวิธีวิเคราะห์ (Method validation)⁽¹¹⁾

การทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

ฉีดสารละลายมาตรฐาน benzoic acid, salicylic acid และ sorbic acid ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 50.0 และ 60.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน กับ peak area คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r)

การทดสอบความจำเพาะเจาะจง

ฉีดสารละลายมาตรฐาน benzoic acid, salicylic acid และ sorbic acid ความเข้มข้น 600.0 มิลลิกรัม ต่อกลีโกรัม และสารละลายตัวอย่าง sample blank เข้าเครื่อง HPLC ภายใต้สภาวะที่กำหนด เพื่อตรวจสอบการแยก ของสารทั้ง 3 ชนิด จากการรบกวนของสารอื่นในตัวอย่าง สารทั้ง 3 ชนิด ต้องมีค่า retention time แยกจากกันชัดเจน

วิเคราะห์ตัวอย่างหมอยอ sample blank จำนวน 3 ซ้ำ

การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (*Limit of detection: LOD*)

เติมสารละลายมาตรฐาน benzoic acid, salicylic acid และ sorbic acid ปริมาณใกล้เคียงกับระดับต่ำที่สุดของ calibration curve ลงใน sample blank วิเคราะห์ 10 ซ้ำ

การหาขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (*Limit of quantitation: LOQ*)

วิเคราะห์ตัวอย่างหมวย sample blank ที่เติมสารละลายมาตรฐาน benzoic acid, salicylic acid และ sorbic acid ให้มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (mg/kg) วิเคราะห์ 10 ซ้ำ แล้วคำนวณ % recovery และ % Relative standard deviation (%RSD)

การทดสอบร้อยละของการคืนกลับ (%Recovery) และความเที่ยง (Precision)

วิเคราะห์ตัวอย่างหมวย sample blank ที่เติมสารละลายมาตรฐาน benzoic acid, salicylic acid และ sorbic acid ให้มีความเข้มข้น 20, 400 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์ 7 ซ้ำ คำนวณ % recovery และ %RSD

การทดสอบความเป็นเส้นตรง (*Linearity*) และช่วงของการวัด (*Working range*)

วิเคราะห์ตัวอย่างหมวย sample blank ที่เติมสารละลายมาตรฐาน salicylic acid, benzoic acid และ sorbic acid ให้มีความเข้มข้น 10, 20, 100, 200, 400, 600, 800, 1,000 และ 1,200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์ระดับละ 3 ซ้ำ สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานเฉลี่ยที่ตรวจพบ คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r)

การทดสอบ Matrix effect

Matrix effect คือ การเพิ่มขึ้นหรือลดลงของสัญญาณจากเครื่องมือวัด (HPLC) อันเป็นผลมาจากส่วนประกอบอื่น ๆ ที่มีในตัวอย่าง แต่ไม่ใช่สารที่กำลังศึกษา ทำโดยเตรียมสารละลายมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด และสารละลาย spiked sample โดยเติมสารละลายมาตรฐานลงใน sample blank ที่ระดับความเข้มข้น 6, 10, 20, 100, 200, 400, 600, 800, 1,000 และ 1,200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ลงใน sample blank วิเคราะห์ 3 ซ้ำ แล้วสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ของค่า peak area ของสารละลายมาตรฐาน และสารละลาย spiked sample ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ทดสอบความเป็นเส้นตรงและทดสอบช่วงของความเชื่อมั่น (confidence interval; CI) ของ slope กลุ่ม 1 หรือไม่ ถ้ากลุ่มแสดงว่าไม่มี matrix effect

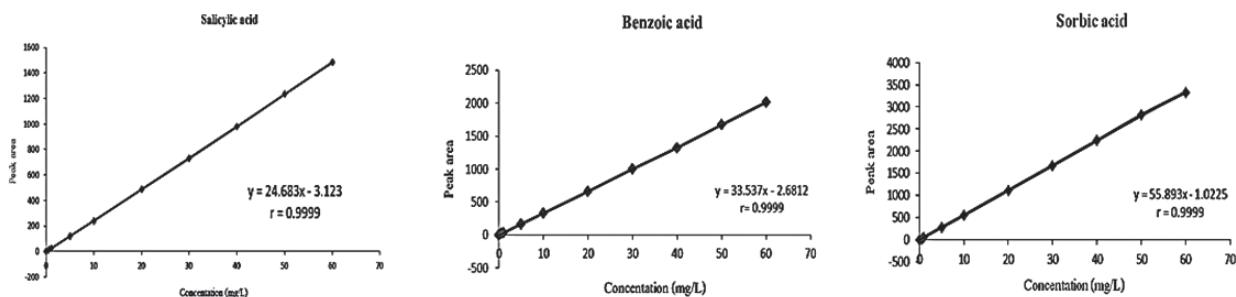
ความไม่แน่นอนของการวัด (*Measurement Uncertainty*)

ความไม่แน่นอนของการวัดปริมาณ benzoic acid, salicylic acid และ sorbic acid ในตัวอย่างหมวย โดยวิธี HPLC มีแหล่งที่มา ได้แก่ ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน การสอบเทียบเครื่องชั่ง เครื่องแก้วที่ใช้เตรียมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง ความเข้มข้นของสารทั้ง 3 ชนิด ในสารละลายตัวอย่างที่อ่านได้จากเครื่อง HPLC การทำซ้ำ (repeatability) และค่าร้อยละของการคืนกลับ (% recovery) ของการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ นำมาคำนวณค่าความไม่แน่นอนรวม (combined uncertainty) และค่าความไม่แน่นอนขยาย (expanded uncertainty: U) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ค่า (coverage factor: k) เท่ากับ 2

ผล

การทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน

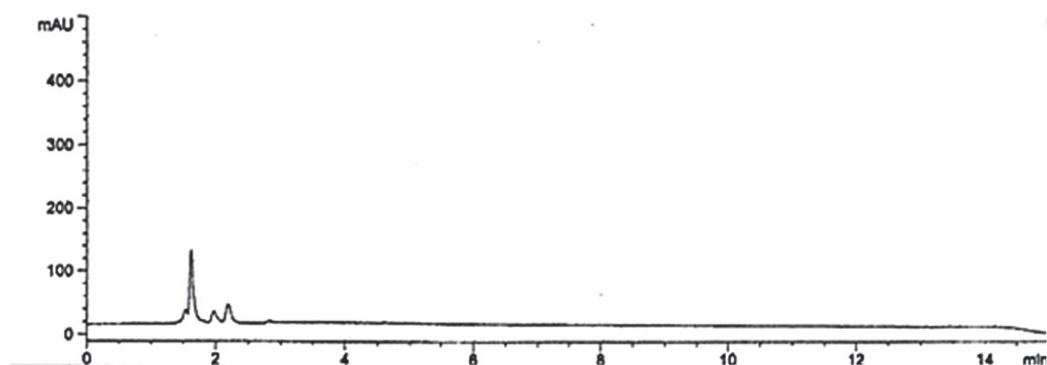
กราฟมาตรฐาน benzoic acid, salicylic acid และ sorbic acid ที่ช่วงความเข้มข้น 0.5–60.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) เท่ากับ 0.9999 ในสารทั้ง 3 ชนิด ดังแสดงในภาพที่ 2



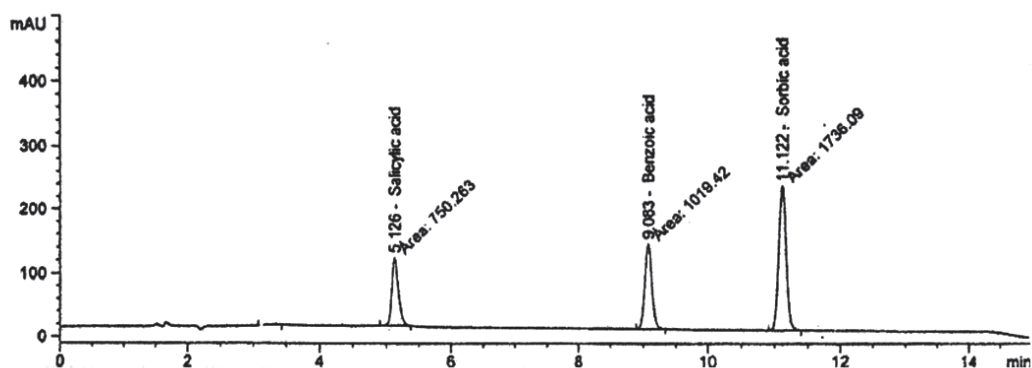
ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน salicylic acid, benzoic acid และ sorbic acid

การทดสอบความจำเพาะเจาะจง

จากการฉีดสารละลายมาตรฐาน benzoic acid, salicylic acid และ sorbic acid ภายใต้สภาวะของเครื่อง HPLC พบว่า สามารถแยก benzoic acid, salicylic acid และ sorbic acid ออกจากกันได้ มีค่า retention time ประมาณ 9.1, 5.1 และ 11.1 นาที ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างหมอยอ (sample blank) ไม่มีการรบกวนของสารอื่นในตัวอย่าง ดังแสดงในภาพที่ 3 และภาพที่ 4



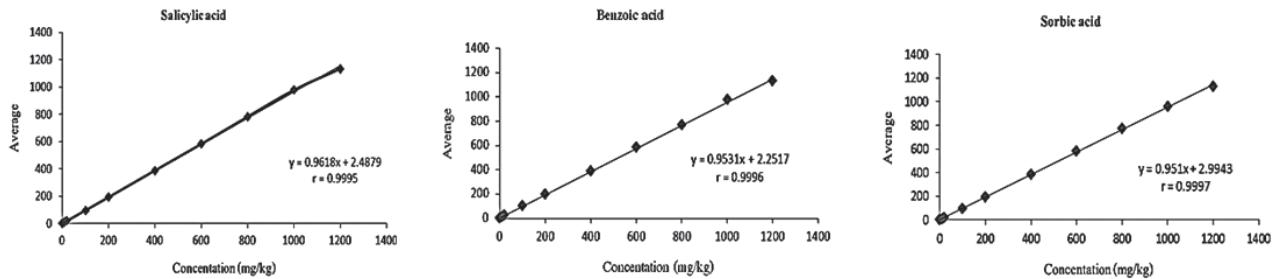
ภาพที่ 3 Chromatogram ของ sample blank



ภาพที่ 4 Chromatogram ของ salicylic acid, benzoic acid และ sorbic acid

การทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) และช่วงของการวัด (Working range)

กราฟระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานเฉลี่ยที่ตรวจพบ คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) เท่ากับ 0.9995, 0.9996 และ 0.9997 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 ความเป็นเส้นตรง (Linearity) และช่วงของการวัด (Working range) ของ salicylic acid, benzoic acid และ sorbic acid

การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ

ค่า LOD เท่ากับ 6 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทั้ง 3 ชนิด โดยมีค่า signal to noise ratio คือ 13.1, 19.6 และ 31.8 ตามลำดับ

การทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ

ค่า LOQ เท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทั้ง 3 ชนิด มีค่า % recovery อยู่ในช่วง 97.06–100.01%, 95.75–100.02% และ 98.30–100.29% ตามลำดับ และค่า %RSD เท่ากับ 0.84, 0.92 และ 0.60 ตามลำดับ

การทดสอบร้อยละของการคืนกลับ (% Recovery) และความเที่ยง (Precision)

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างหมุย spiked sample ที่ระดับความเข้มข้น 20, 400 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์ซ้ำระดับความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ พบว่าร้อยละของการคืนกลับ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ร้อยละของการคืนกลับ (% Recovery) และความเที่ยง (%RSD) ของวิธีวิเคราะห์ benzoic acid, salicylic acid และ sorbic acid ในตัวอย่างหมุย

Food additives	ความเข้มข้นระดับต่ำ 20 mg/kg (n = 7*)		ความเข้มข้นระดับปานกลาง 400 mg/kg (n = 7*)		ความเข้มข้นระดับสูง 1,000 mg/kg (n = 7*)	
	% Recovery	%RSD	% Recovery	%RSD	% Recovery	%RSD
Benzoic acid	97.06–99.31	0.59	99.66–99.91	0.90	99.87–100.01	0.14
Salicylic acid	95.75–99.33	0.80	99.68–100.00	0.94	99.83–100.02	0.18
Sorbic acid	98.30–100.29	0.38	99.64–99.97	0.83	99.82–99.94	0.15

* จำนวนครั้งของการวิเคราะห์

การทดสอบ Matrix effect

จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง peak area ของสารละลายมาตรฐาน benzoic acid, salicylic acid และ sorbic acid กับสารละลาย spiked sample ที่ความเข้มข้นเดียวกัน พบว่า ค่า slope ของ benzoic acid เท่ากับ 0.91 ถึง 1.03, salicylic acid เท่ากับ 0.94 ถึง 1.02 และ sorbic acid เท่ากับ 0.93 ถึง 1.01 โดยมีระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($p > 0.05$) อยู่ในช่วงคลุม 1 แสดงว่าไม่มี matrix effect และมีค่า intercept เท่ากับ -1.91 ถึง 1.80, -1.35 ถึง 1.16 และ -1.20 ถึง 1.11 ตามลำดับ โดยมีระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($p > 0.05$) อยู่ในช่วงคลุม 0 แสดงว่าไม่มี matrix effect

ความไม่แน่นอนของการวัด (Measurement Uncertainty)

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของวิธีวิเคราะห์ benzoic acid, salicylic acid และ sorbic acid ในหมุยอ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และค่า k เท่ากับ 2 พบว่ามีค่าความไม่แน่นอนขยายสัมพันธ์ (relative expanded uncertainties) เท่ากับ ร้อยละ 3.82, 3.50 และ 3.38 ตามลำดับ

ผลการตรวจตัวอย่างเฝ้าระวัง

ผลการตรวจตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ ได้แก่ ลูกชิ้น จำนวน 59 ตัวอย่าง และหมุยอ จำนวน 25 ตัวอย่าง รวม 84 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบ salicylic acid ทุกตัวอย่าง ตรวจพบ benzoic acid จำนวน 66 ตัวอย่าง (คิดเป็น 78.6%) และตรวจพบ sorbic acid จำนวน 10 ตัวอย่าง (คิดเป็น 11.9%)

ผลการตรวจลูกชิ้น แบ่งเป็นปี 2559 ตรวจจำนวน 21 ตัวอย่าง ไม่พบวัตถุกันเสียทั้ง 3 ชนิด เพียง 2 ตัวอย่าง คิดเป็น 9.52% พบ benzoic acid ชนิดเดียว จำนวน 19 ตัวอย่าง คิดเป็น 90.48% มีความเข้มข้นตั้งแต่ 276–5,229 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และปี 2560 จำนวน 38 ตัวอย่าง ไม่พบวัตถุกันเสียทั้ง 3 ชนิด เพียง 2 ตัวอย่าง คิดเป็น 5.26% พบ benzoic acid จำนวน 30 ตัวอย่าง คิดเป็น 78.95% มีความเข้มข้นตั้งแต่ 82–3,689 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบ sorbic acid ชนิดเดียว 1 ตัวอย่าง มีความเข้มข้น 414 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบ benzoic acid และ sorbic acid จำนวน 5 ตัวอย่าง คิดเป็น 13.16% (ปริมาณ benzoic acid 107–1,855 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ sorbic acid ปริมาณ 312–379 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)

ส่วนผลการตรวจหมุยอ แบ่งเป็นปี 2559 จำนวน 6 ตัวอย่าง ไม่พบวัตถุกันเสียทั้ง 3 ชนิด เพียง 1 ตัวอย่าง คิดเป็น 16.67% พบ benzoic acid ชนิดเดียว 5 ตัวอย่าง คิดเป็น 83.33% มีความเข้มข้นตั้งแต่ 79–5,800 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และปี 2560 จำนวน 19 ตัวอย่าง ไม่พบวัตถุกันเสียทั้ง 3 ชนิด จำนวน 2 ตัวอย่าง คิดเป็น 10.53% พบ benzoic acid ชนิดเดียว จำนวน 12 ตัวอย่าง คิดเป็น 63.16% มีความเข้มข้นตั้งแต่ 82–1,331 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบ sorbic acid ชนิดเดียว จำนวน 3 ตัวอย่าง คิดเป็น 15.79% มีความเข้มข้นตั้งแต่ 240–1,155 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และพบ benzoic acid และ sorbic acid จำนวน 2 ตัวอย่าง คิดเป็น 10.53% (ปริมาณ benzoic acid 99–867 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ sorbic acid ปริมาณ 400–907 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 จำนวนตัวอย่างลูกชิ้นและหมูยอที่ตรวจวิเคราะห์ benzoic acid, salicylic acid และ sorbic acid และจำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบวัตถุเจือปนแต่ละชนิด

ชนิดอาหาร	จำนวนตัวอย่าง (ตุลาคม 2558-กันยายน 2559)					จำนวนตัวอย่าง (ตุลาคม 2559-กันยายน 2560)				
	วิเคราะห์	ไม่พบ	ตรวจพบ benzoic acid	ตรวจพบ salicylic acid	ตรวจพบ sorbic acid	วิเคราะห์	ไม่พบ	ตรวจพบ benzoic acid	ตรวจพบ salicylic acid	ตรวจพบ sorbic acid
ลูกชิ้น	21	2	19	0	0	38	2	34	0	5
หมูยอ	6	1	5	0	0	19	2	14	0	5
รวม	27	3	24	0	0	57	4	48	0	10

วิจารณ์

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ benzoic acid, salicylic acid และ sorbic acid ในหมูยอในครั้งนี้ ได้ดัดแปลงจากวิธีวิเคราะห์มาตรฐาน ISO 22855: 2008 ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์ benzoic acid และ sorbic acid ในผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ มีลักษณะตัวอย่าง (matrix) แตกต่างจากผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ และมีความต้องการตรวจวัตถุเจือปนที่อาจจะมีการใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ให้ได้พร้อมกัน 3 ชนิด ในการสกัดคราวเดียว จึงได้ทำการปรับปรุงวิธีการ โดยในการสกัด เริ่มจากน้ำหนักตัวอย่าง 5 กรัม ใช้น้ำร้อนเล็กน้อยช่วยละลายส่วนที่เป็นไขมันในตัวอย่าง ใช้สารสกัดคือ สารละลายผสม ammonium acetate buffer 0.01 M: methanol (60:40) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใช้ ultrasonic bath ในการสกัด เพิ่มเวลาจาก 10 นาที เป็น 30 นาที และในการใช้เครื่องมือ HPLC จากเดิมวิธี ISO 22855: 2008 เป็นแบบ isocratic ใช้ column C8 เป็น gradient ผสมระหว่าง ammonium acetate buffer 0.01 M และ methanol ใช้ column C18 และใช้ UV detector ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร เช่นเดียวกับใน ISO 22855: 2008 และด้วยเครื่องมือ HPLC ที่ใช้ครั้งนี้เป็น UV ชนิด diode array detector (DAD) สามารถสแกน spectrum ของสารแต่ละชนิดได้ ทำให้มั่นใจผลการทดสอบชนิดของสารได้ถูกต้องมากยิ่งขึ้น

จากผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ พบว่าเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับ คือการทดสอบความเหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟี ได้ค่า %RSD ของ retention time ≤ 1 , %RSD ของค่า peak area ≤ 2.5 , ค่าสูงสุดของ tailing factor ≤ 2 , ค่าต่ำสุดของ theoretical plates $> 2,000$ และค่าต่ำสุดของ resolution > 2 เป็นไปตามเกณฑ์ของ Reviewer Guidance⁽¹²⁾ การทดสอบความจำเพาะเจาะจงพบว่าภายใต้สภาวะของเครื่อง HPLC การตรวจวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างหมูยอ ไม่พบการรบกวน (interfere) ไม่พบ peak ที่ตรงกับสารมาตรฐาน การทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) เท่ากับ 0.9999 ในสารทั้ง 3 ชนิด และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์จากการทดสอบ Linearity และ Working range ของ salicylic acid, benzoic acid และ sorbic acid ได้ r เท่ากับ 0.9995, 0.9996 และ 0.9997 ตามลำดับ การทดสอบร้อยละของการคืนกลับ (% Recovery) และความเที่ยง (Precision) จากการวิเคราะห์ตัวอย่างหมูยอ ที่เติมสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม), กลาง (400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) และสูง (1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) พบว่าเป็นไปตามเกณฑ์ยอมรับ คือ %RSD_r ไม่เกิน 4% และร้อยละของการคืนกลับของ benzoic acid, salicylic acid และ sorbic acid อยู่ระหว่าง 90-110%

วิธีวิเคราะห์นี้มีค่า LOD เท่ากับ 6 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และค่า LOQ เท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เหมาะสมที่จะใช้ในการเฝ้าระวังความปลอดภัยการใช้วัตถุกันเสียในอาหารประเภทหมุย ลูกชิ้น และผลิตภัณฑ์อื่น ๆ เมื่อพิจารณาจากผลการตรวจตัวอย่างลูกชิ้นและหมุยที่มีจำหน่ายในจังหวัดเชียงใหม่ พบว่า ลูกชิ้นและหมุยทุกตัวอย่างตรวจไม่พบ salicylic acid ซึ่งห้ามใช้ในอาหาร ตามกฎหมายประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 391 พ.ศ. 2561 เรื่อง กำหนดให้เป็นวัตถุที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือจำหน่าย รวมถึงฉบับที่ 281 พ.ศ. 2547 และฉบับที่ 381 พ.ศ. 2559 เรื่อง วัตถุเจือปนอาหาร (ฉบับที่ 4) และมาตรฐานสากล Codex ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ ไม่อนุญาตให้ใช้วัตถุเจือปนกลุ่มเบนโซเอต แต่อนุญาตให้ใช้กลุ่มซอร์เบตในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์และผ่านกรรมวิธีได้ 1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากการตรวจวิเคราะห์พบว่ายังมีการใช้สารกลุ่มเบนโซเอตในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์เป็นจำนวนมาก และใช้ในปริมาณมากซึ่งไม่มีความจำเป็น ส่วน sorbic acid ที่พบปริมาณอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานทั้งหมด ดังนั้นควรให้ความรู้ที่ถูกต้องแก่ผู้ประกอบการผลิตลูกชิ้น หมุย หากต้องการใช้วัตถุเจือปนควรใช้ให้ถูกประเภทและถูกกฎหมาย ทั้งนี้ นอกจากเพื่อลดค่าใช้จ่ายในการใช้วัตถุเจือปนที่ไม่มีประโยชน์ในการถนอมอาหารประเภทผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แล้ว ยังเป็นการปฏิบัติตามกฎหมายอาหารอีกด้วย

สรุป

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์วัตถุเจือปน benzoic acid, salicylic acid และ sorbic acid โดยใช้หมุยเป็นตัวแทนอาหารกลุ่มผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ในการทดสอบ โดยวิธี HPLC ซึ่งปรับปรุงจากวิธีมาตรฐานที่ใช้วิเคราะห์ benzoic acid และ sorbic acid ในผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ พบว่าวิธีนี้มีค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 6 และ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีผลการทดสอบคุณลักษณะต่าง ๆ อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ วิธีนี้จึงมีความเหมาะสมและมีประโยชน์ในการใช้ตรวจวิเคราะห์ benzoic acid, salicylic acid และ sorbic acid ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ได้ครั้งเดียวกัน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณวิทยาคุณ ผาพิศาล คุณนงคราญ เรืองประพันธ์ และคุณปิ่นนรี ชินวรรณวงศ์ ที่ให้คำแนะนำ และตรวจทานความถูกต้อง เรื่องการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

เอกสารอ้างอิง

1. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 281 (พ.ศ. 2547) เรื่อง วัตถุเจือปนอาหาร. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 121 ตอนพิเศษ 97 ง (วันที่ 6 กันยายน 2547).
2. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 381 (พ.ศ. 2559) เรื่อง วัตถุเจือปนอาหาร (ฉบับที่ 4). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 133 ตอนพิเศษ 298 ง (วันที่ 20 ธันวาคม 2559).
3. WHO. Benzoic acid and sodium benzoate (Concise international chemical assessment document 26). Geneva: World Health Organization; 2000.
4. อัญญา ดุจจันทน์. การยืดอายุการเก็บรักษาหมุยโดยใช้โซเดียมเบนโซเอต [วิทยานิพนธ์]. ภาควิชาอาหารเคมี, คณะเภสัชศาสตร์. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2545.

5. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 391 (พ.ศ. 2561) เรื่อง กำหนดอาหารที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือจำหน่าย. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 135 ตอนพิเศษ 237 ง (วันที่ 25 กันยายน 2561).
6. สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. รายงานผู้บริโภคและข่าวแจ้งเตือนภัยด้านอาหาร. [ออนไลน์]. [สืบค้นวันที่ 31 มกราคม 2562]. เข้าถึงได้จาก : URL: <http://bqsf.dmsc.moph.go.th/bqsfWeb>.
7. สมาคมพิษวิทยาแห่งประเทศไทย. กรดเบนโซอิก; วัตถุกันเสียที่นิยมใช้ในอาหาร. [ออนไลน์]. [สืบค้น 31 มกราคม 2562]. เข้าถึงได้จาก : URL: <http://www.thaitox.org/knowledge/detail.php?section=8&category=7&id=8>.
8. Latimer GW, Editor. Official methods of analysis of AOAC International. 20th ed. Maryland: AOAC International; 2016. Ch. 47 p.17-19.
9. ISO 22855: 2008. Fruit and vegetable products-determination of benzoic acid and sorbic acid concentrations-high performance liquid chromatography method. Geneva: International Organization for Standardization; 2009.
10. Eurachem Guide. The Fitness for purpose of analytical methods. a laboratory guide to method validation and related topics. 2nd ed. Torino: Eurachem; 2014.
11. ทิพวรรณ นิ่งน้อย. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.
12. Reviewer guidance validation of chromatographic methods. [Online]. 1994 [cited 2019 Feb 8]. Available from: URL: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM134409.pdf>.

Method Validation for Determination of Benzoic Acid, Salicylic Acid and Sorbic Acid in Vietnamese Pork Sausage by High Performance Liquid Chromatography

Patcharida Pichai

Regional Medical Sciences Center 1 Chiang Mai, Amphoe Mae Rim, Chiang Mai 50180 Thailand

Abstract Benzoates (Benzoic acid and its salt) and sorbates (sorbic acid and its salt) are allowed to use as preservatives in food according to the Ministry of Public Health (MOPH) Notification No. 281 (2004). Later in 2016, the ministry prescribed the maximum limit (ML) for sorbates in processed comminuted meat products at 1,500 mg/kg and no ML set for benzoates. While salicylic acid is controlled as prohibited substance for food production according to the MOPH Notification No. 391 (2018). To protect consumer, we developed method for determination of these food additives namely benzoic acid, salicylic acid and sorbic acid in pork ball and vietnamese pork sausage. Food additives were extracted from food by ammonium acetate buffer mixed with methanol (60:40) and determined by HPLC under optimum conditions. The method validation results using vietnamese pork sausage as representative matrix showed that the limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) were 6 and 10 mg/kg, respectively. The linearity of calibration curves of all food additives ranged from 0.5 to 60.0 mg/L and working range was 10 to 1,200 mg/kg with the correlation coefficient (r) were 0.9999. The accuracy was shown as percentages of recovery of benzoic acid, salicylic acid and sorbic acid from spiked sample was 97.06–100.01%, 95.75–100.02% and 98.30–100.29%, respectively. The precision as % of relative standard deviation was in the range of 0.14–0.90, 0.18–0.94 and 0.15–0.83, respectively. The validated method was used to determine these food additives in 84 samples of pork balls and vietnamese pork sausages collected from local markets in Chiang Mai in October 2015 to September 2017. Salicylic acid was not detected in any samples. Benzoic acid was found 78.6% of samples which was considered as substandard food. Sorbic acid was found in 11.9% of samples, the concentration found were lower than the maximum limit. The study suggested that the validated method could be used to survey and examine benzoic acid, salicylic acid and sorbic acid in vietnamese pork sausages.

Keywords: Benzoic acid, Sorbic acid, Salicylic acid, HPLC, Vietnamese pork sausage

Quantitative Bactericidal Efficacy of Alcohol-Based Handrub in Thailand Using Modified EN 1276: 2009 Method

Suwunna Tienungoon Preeya Pinnil Kanok-on Kreelieng and Sirawan Onket

*Bureau of Cosmetics and Hazardous Substances, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road,
Nonthaburi 11000 Thailand*

Abstract Alcohol-based handrub (ABHR) products are widely used to reduce hands contamination in Thailand due to their convenience and ease to use in areas where water is not available. In Thailand, ABHR bactericidal efficacy and its test method have not been established. In this study, European Standard EN 1276: 2009 was modified and validated to obtain suitable conditions. The modified method was validated at 34°C with minimizing a test system volume. The bactericidal efficacy was determined at 1 minute contact time in the presence of Bovine Albumin Fraction V using 4 reference bacterial strains; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Enterococcus hirae* ATCC 10541 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. The ABHR product was considered as bactericidal effective when log reduction (lg R) of the reference bacterial amount after one minute contact time was ≥ 5 . Furthermore, twenty-nine ABHR products marketed in Bangkok Metropolitan Region were evaluated using the proposed method. It was found that 6 ABHR products (20.7%) failed the bactericidal efficacy criterion. The finding emphasized a need for regulatory consideration of bactericidal efficacy of the ABHR product as a supportive scientific data. In addition, regular post-marketing surveillance of ABHR should be undertaken to ensure the bactericidal effectiveness of the products.

Keywords: Alcohol-based handrub, hands disinfection, bactericidal efficacy

Corresponding author E-mail: suwunna.t@dmasc.mail.go.th

Received: 30 October 2018

Revised: 7 April 2019

Accepted: 29 April 2019

Introduction

Acquired infection through hands of healthcare workers, commuters, including children is one of the critical factors in diseases transmission. Ethyl alcohol (ethanol) and isopropyl alcohol, nonspecific intermediate level germicides, act rapidly by precipitating proteins and solubilising lipids present on cell membranes of vegetative forms of gram-negative and gram-positive microorganisms.⁽¹⁾ World Health Organization⁽¹⁾ and Centers for Disease Control and Prevention⁽²⁾ hand hygiene guidelines recommend ethanol as a common active agent in handrub formulations as alcohol-based handrub (ABHR) products for hand hygiene when no water is available.⁽¹⁻⁴⁾ ABHR products usually found in a ready-to-use form and consisted of 60% to 70% alcohol as a major antibacterial ingredient, however, other additional antimicrobial ingredient such as triclosan may be found in some ABHR formulations.

During the Thailand Great Flood 2011 and several outbreak events of infectious diseases in Thailand, ready-to-use ABHR products in gel form have become popular and frequently used in workplace, hospitals, kindergartens and community as a convenient waterless hand cleansing product for reduction of transient microbial flora from touching soiled surfaces from common objects. In addition, increasing public awareness about personal daily risks of acquired infection has given rise to a large variety of convenient ABHR products. In Thailand, ABHR products in all forms are categorized by the Thai Food and Drug Administration (Thai FDA) as a controlled cosmetic product with alcohol content shall be less than 70% and shown on notification formulation document but may not on the product labelling.⁽⁵⁾ To be marketed, ABHR products shall have a Thai language labelling and registration number as regulated but no requirement for quality of ABHR products regard to bactericidal efficacy. Low efficacy ABHR products may not be able to reduce but rather spread out the infectious microorganism.⁽⁶⁾

Chemical methods for determination of alcohol content in the formulation are available but there may be some disadvantages of techniques including interferences from preservatives and other ingredients which may also exert antimicrobial effect.^(7,8) The International standard methods for evaluation of bactericidal efficacy on ABHR products are (1) *in vitro* tests in laboratory such as European Standard EN 1276: 2009,⁽⁹⁾ a quantitative dilution-neutralization method, under simulated practical conditions appropriate to its intended use, (2) *in vivo* tests under simulated practical conditions in laboratory and (3) *in vivo* field tests.⁽¹⁰⁾ EN 1276: 2009⁽⁹⁾ is the recommended *in vitro* method to be used to substantiate claims for hygienic handrub products used in food, industrial, domestic and institutional area which included essential factor simulated a practical use,⁽⁶⁾ i.e. organic soil load (dirty condition), and suitable for controlled conditions routinely setting in a laboratory.^(7,11) Taylor *et al.* also recommended EN 1276 : 2009 as a useful method to harmonize disinfectant testing across Europe.⁽¹²⁾ According to testing process in EN 1276: 2009 method, addition of test organism and interfering substance which consequencely dilute the product concentration to be only 80% of the original concentration. Performing the test on ABHR products

with less than 70% alcohol by this standard method, its active ingredients will be diluted to be only 55.9% or may be less for other formulations which may not demonstrate an actual efficacy of the product.

In another aspect, the obligatory temperature specified in this European standard is 20°C with additional temperatures may be chosen from 4°C, 10°C, 30°C or 40°C. While temperature has been reported to be one of the several factors affecting the antimicrobial products activity,⁽¹³⁻¹⁵⁾ WHO Guidelines⁽¹⁾ also stated that “Conditions in suspension and *in vitro* or *ex vivo* testing do not reflect those on human skin”. Therefore, in regard to EN 14885,⁽¹⁰⁾ scientific justification for applying the scheme of testing for specific activity other than the tests specified in this European Standard is recommended. In this study, we modified and validated EN 1276: 2009 method to be suitable for testing the efficacy of a ready-to-use ABHR product at the concentration as high as 98% instead of 80% of original concentration and simulate in-use conditions on human skin temperature by testing at 34°C ± 1°C which is an average human skin temperature.⁽¹⁶⁻¹⁸⁾ The validated modified EN 1276: 2009 method was performed using a range of standard ethanol solutions against each of the 4 reference ATCC bacterial strains in the presence of interfering substance (dirty condition) that was bovine albumin fraction V. For consumer protection, the bactericidal activity of 29 ABHR products marketed in Thailand was also determined using the validated and modified EN 1276: 2009 method. Acceptance criterion for bactericidal efficacy of the ABHR products indicated by a decimal log reduction (lg R) of the reference bacterial amount after 1 minute contact time to be at least 5 lg or 99.999% reduction.⁽⁹⁾

Materials and Methods

Samples: Twenty-nine ABHR products in gel form, collected from retailed and wholesale shops in Bangkok Metropolitan Region during 2013–2015, were tested for bactericidal efficacy.

Standard cultures: Four standard bacterial cultures, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Enterococcus hirae* ATCC 10541 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 were used.

Culture media and Reagents: Bovine albumin fraction V (BA; Sigma, USA), Distilled-purified water (Dw; ELGA Purelab option, UK) Dey/Engley neutralizing broth (D/E; DifcoTM, USA), tryptic soy agar (TSA; DifcoTM, USA), tryptone water (Tw; BD, Germany) and Ethanol (Merck, 99.9% purity, Germany)

Equipment: Temperature controlled water bath at 34°C ± 1°C (American Optical, Model 406016 serial, USA), incubator 36°C ± 1°C (Binder, Model BD 720/E2, Germany), Spectrophotometer at wavelength 620 nm (Metertech, Model UV/VIS SP-8001, Taiwan)

Methods: A modified dilution neutralization method specified in European standard EN 1276: 2009 was performed as described.

Preparation of bacterial suspensions: Each of the standard bacterial strains was subcultured. The second and third subcultures were used as working cultures to prepare a test suspension “N” (Figure 1). In parallel to the dilution neutralization tests, the test suspension was determined for bacterial amount “N” which shall be between 1.5×10^9 and 5.0×10^9 cfu/mL. When the test suspension “N” was used in the dilution neutralization method, bacterial amount “N” was diluted 1:100 to be “N₀” (=N/100) which shall be between 1.5×10^7 and 5.0×10^7 cfu/mL. Validated bacterial suspension “N_v” was prepared for the amount between 3.0×10^3 and 1.6×10^4 cfu/mL by diluting 1 mL of 10^{-5} “N” with 3 mL of Tw. When the validated bacterial suspension “N_v” was used in the quality control procedure, bacterial amount “N_v” was diluted 1:100 to be “N_{v0}” (=N_v/100) which shall be $\geq 0.5 \times N_{v0}$. The amount of bacterial suspensions used in this study as specified in EN 1276: 2009 was shown in Table 1.

Bactericidal efficacy of ABHR product: The efficacy (Test) was determined including quality control and validation procedures (A, B and C) as followed (Figure 2).

Test: The bacterial suspension “N” (0.1 mL) was added into a tube containing 0.1 mL of 30.0% (w/v) BA. The tube was mixed and placed at $34^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ for 2 min $\pm$ 10 s, then 9.8 mL of ABHR sample was added, mixed and further placed at $34^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ for 1 min $\pm$ 5 s (contact time). The test mixture (1.0 mL) was then pipetted to 9.0 mL of D/E. After 5 min $\pm$ 10 s (a neutralization period), the test mixture (1.0 mL) was pour plated with TSA in duplicate and incubated at $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ for 18 h to 24 h prior to enumeration. After the end of contact time, the bacterial amount (cfu/mL) survived from the product test, “N_a”, was counted.

Experimental conditions control (A): To ensure no biocidal effect from other experimental parameters, the same procedure as Test was performed. Validated bacterial suspension “N_v” (between 3.0×10^3 and 1.6×10^4 cfu/mL) and distilled purified water (Dw) were used in place of “N” and D/E, respectively.

Neutralizer control (B): To verify the absence of toxicity of the neutralizer, the test mixtures of 9.8 mL D/E, 0.1 mL Dw and 0.1 mL “N_v” were prepared and pour plated with TSA at 5 min $\pm$ 10 s.

Method validation (C): To validate the dilution neutralization method, the test mixtures of 0.1 mL of BA, 0.1 mL of 0.1% Tw and 9.8 mL of ABHR sample were prepared, mixed and placed at $34^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ for 1 min $\pm$ 5 s (contact time), then 1.0 mL of the test mixture was transferred to 8.9 mL of D/E. After 5 min $\pm$ 10 s, 0.1 mL of “N_v” was added and pour plated with TSA after 30 min $\pm$ 1 min.

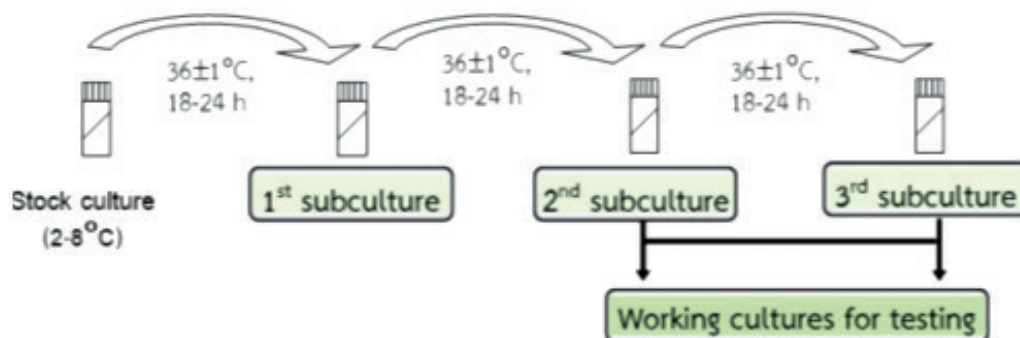


Fig. 1 Preparation of working cultures: each bacterial strain was subcultured on Tryptic Soy Agar and incubated at $36 \pm 1^\circ\text{C}$ for 18 h to 24 h. The second and third subcultures were used as the working cultures to prepare a test suspension “N” for testing.

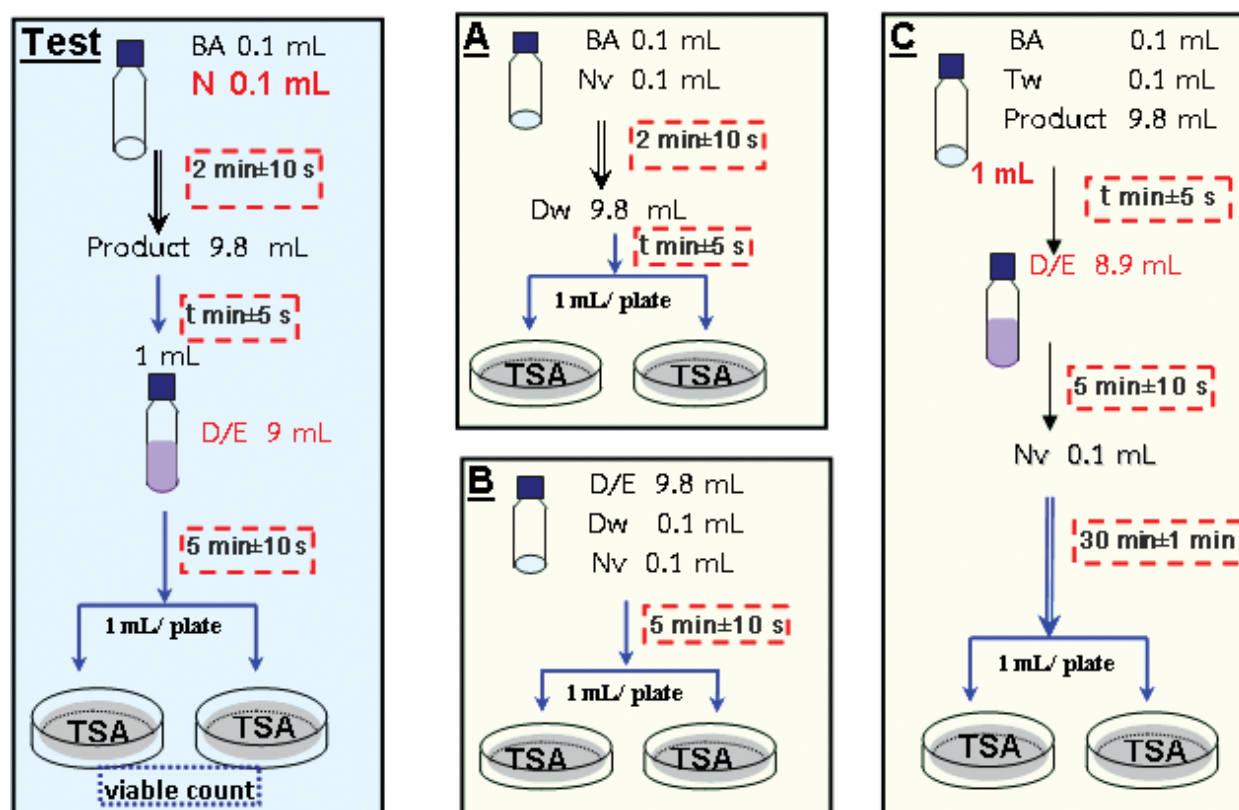


Fig. 2 Diagrams illustrated dilution neutralization method “Test” including quality control “A”, “B” and “C”. Viable counts of testing bacteria were determined after incubation at $36 \pm 1^\circ\text{C}$ for 18 h to 24 h.

BA; Bovine albumin fraction V, N; Culture test suspension, D/E; Dey/Engley neutralizing broth, TSA; Tryptic Soy Agar, Nv; Validation suspension, Dw; Distilled-purified water, Tw; Tryptone water, t; 1 min contact time

The amount of bacterial inoculum, i.e. N , N_0 , N_v , N_{v0} and N_a in the test mixtures i.e. “Test” including quality controls “A, B and C” at different contact times must be controlled to achieve the acceptance criterion specified (Table 1).⁽⁹⁾ Under the conditions defined by this modified method, $\lg R$ for each reference bacterial strain was separately calculated using equation: $\lg R = \lg N_0 - \lg N_a$. The $\lg R \geq 0.5$ indicated the bactericidal efficacy of the product against the test bacteria.⁽⁹⁾ The modified EN 1276: 2009 method was validated with the concentrations of standard ethanol suspensions at 20%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60% and 70% (by volume) against 4 reference bacterial ATCC strains. Positive control using 60% (v/v) ethanol was included in each experiment. The bactericidal efficacy of the 29 ABHR products was evaluated using this modified method. Test results of products demonstrated $\lg R$ less than 5 were repeated.

Table 1 Basic limits of bacterial amount in the test mixtures at the beginning, i.e. N_0 and N_{v0} , and at the end of contact times, i.e. “A, B and C” as specified in EN 1276: 2009

Experimental Condition	Bacterial suspension (cfu/mL)	Bacterial Amount (cfu/mL) in the test mixtures at different contact times	
		at the beginning of contact time (time = 0)	at the end of contact time (survivors)
Test	N $1.5 \times 10^9 - 5 \times 10^9$	$N_0 (=N/100)$ $1.5 \times 10^7 - 5 \times 10^7$ cfu/mL	$N_a^\#$ (t^* min before Neutralization) = viable count $\times 10$
Controls	N_v $3.0 \times 10^3 - 1.6 \times 10^4$	$N_{v0} (=N_v/100)$ 30 – 160 cfu/mL	A (t^* min), B (5 min), C (30 min) $\geq 0.5 \times N_{v0}$ (50% recovery)

[#] Bacterial amount (cfu/mL) survived from the product test after the end of contact time

* 1 min for hands disinfection test

Results

The modified EN 1276: 2009 method was controlled by preparation of 4 bacterial culture suspensions through the quality control conditions. “Method validation C” using 60% (by volume) standard ethanol solution in 4 separate experiments was carried out in 4 different days (Table 2). The concentrations of bacterial suspensions and validation suspensions were prepared to be within the acceptance criterion (Tables 1 and 2). In addition, quality control conditions justified by the recovery ratios were demonstrated to fulfill the acceptance criterion $\geq 0.5 \times N_{v0}$.

Table 2 Validation of preparation of bacterial culture suspensions and testing conditions including quality controls “A, B and C” in 4 separate experiments carried out in 4 different days

Acceptance Criteria Reference Cultures	Validation suspension (cfu/mL)		Recovery Ratio ($\geq 0.5 \times Nv0$) Quality Control Conditions		
	<i>No</i>	<i>Nv0</i>	<i>Experimental control A</i>	<i>Neutralizer control B</i>	<i>Method validation C</i>
	$1.5 \times 10^7 - 5 \times 10^7$	30-160			
<i>S. aureus</i>	$1.5 \times 10^7 - 4.8 \times 10^7$	37-117	1.1-1.9	0.9-1.5	1.1-1.7
<i>P. aeruginosa</i>	$3.6 \times 10^7 - 5.1 \times 10^7$	70-127	0.95-1.2	0.8-1.3	0.6-1.2
<i>E. coli</i>	$1.5 \times 10^7 - 2.5 \times 10^7$	35-70	1.0-1.7	1.1-2.0	1.0-1.4
<i>E. hirae</i>	$2.5 \times 10^7 - 4.1 \times 10^7$	65-104	0.9-1.1	0.9-1.2	0.8-1.6

The modified EN 1276: 2009 method was validated also with the concentration ranges of standard ethanol suspensions from 20% to 70% (by volume) against 4 reference bacterial ATCC strains in 2-4 separate experiments carried out in 2 different days (Table 3). Under the defined conditions, lg R for each reference bacterial strain was calculated. The lg R ≥ 0.5 indicated the bactericidal efficacy of the product against the test bacteria.⁽⁹⁾

Table 3 Bactericidal efficacy of standard ethanol suspensions ranged from 20% to 70% (by volume) evaluated by modified EN 1276: 2009 method against 4 reference bacterial strains at 34°C, in dirty condition within 1 min contact time

Ethanol %(v/v)	Mean lg R*			
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. hirae</i>
20	0 [#]	0.3	0.0	0.1
30	0.4	1.6	0.7	0.1
40	6.7	7.7	6.7	3.9
45	6.0	6.0	5.0	6.0
50	6.0	6.0	5.0	6.0
55	6.0	6.0	5.0	6.0
60	7.3	7.6	7.3	7.5
70	6.7	7.7	6.7	7.4

* Mean lg R was an average from 2-4 separate experiments carried out in 4 different days

[#] No reduction of the bacterial amount before and after contact time

The modified EN 1276: 2009 method was used to evaluate the bactericidal efficacy of 29 ABHR products. It was found that 23 samples reduced all of the 4 reference bacterial strains by lg R exceeding 5 within 1 min (Table 4). However, 6 samples (20.7%) failed the test criterion: 1 sample demonstrated no bactericidal efficacy against all 4 testing strains, 1 sample failed against 2 strains (i.e. *P. aeruginosa* and *E. hirae*) and 4 samples failed against 1 strain (either *P. aeruginosa*, *E. coli* or *E. hirae*).

Table 4 Bactericidal efficacy of 29 ABHR products evaluated by modified EN 1276: 2009 method against 4 reference bacterial strains at 34°C, in dirty condition within 1 min contact time

Product Code	Ingredients			Product of	lg R			
	Alcohol	Triclosan	Other		<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. hirae</i>
1	Alcohol	-	-	Thailand	7.3	7.7	7.3	7.7
2	Alcohol Denat.	-	-	Thailand	7.3	7.7	7.3	7.7
3	Alcohol Denat.	-	-	UK	7.3	7.7	7.3	7.4
4	Ethyl Alcohol	-	-	Thailand	6.2	6.4	6.4	6.3
5	Ethyl Alcohol	-	-	Thailand	6.6	6.3	6.4	6.3
6	Ethyl Alcohol	-	-	Thailand	6.7	6.9	6.0	7.5
7	Ethyl Alcohol 62%	-	-	USA	7.4	7.6	7.3	7.4
8	Ethyl Alcohol 68%	-	-	Thailand	6.4	6.4	6.5	6.2
9	Alcohol	-	Amino methyl propanol	Thailand	7.4	7.6	7.3	7.4
10	Alcohol	-	Glycerin	Thailand	7.3	7.7	7.3	7.7
11	Alcohol	-	Glycerin and Centella extract	Thailand	7.3	7.7	7.3	5.2
12*	Alcohol 69%	-	Aminomethyl propanol	Thailand	7.4	0 [#]	7.3	7.4
13	Alcohol Denat.	-	Aminomethyl propanol Denatonium benzoate	Thailand	7.4	5.9	7.3	5.3
14*	Alcohol Denat.	-	Potassium hydroxide	Thailand	0 [#]	0 [#]	0 [#]	0 [#]
15	Alcohol Denat.	-	Amnomethyl propanol	Thailand	7.4	7.6	7.3	7.4
16	Alcohol Denat.	-	Triethanolamine, Aloe, Barbadensis	Thailand	7.4	7.6	7.3	7.4
17	Alcohol Denat.	-	Tetrahydroxypropyl Ethylene- diamine, Aloe Barbadensis	Thailand	7.4	7.6	7.3	7.4
18	Ethyl Alcohol	-	Alo Vera Extract	Thailand	7.3	7.7	7.3	7.7
19*	Ethyl Alcohol	-	Vitamin E	Thailand	7.4	7.6	7.3	0 [#]
20	Alcohol	Triclosan	Alo Vera	Thailand	7.4	7.6	7.3	7.4
21*	Alcohol	Triclosan	Aloe Barbadensis with natural Pomelo essential oil	Thailand	7.3	7.7	7.3	4.8
22	Alcohol Denat.	Triclosan	Aloe Barbadensis	Thailand	7.4	7.6	7.3	7.4
23*	Alcohol Denat.	Triclosan	Aloe Barbadensis	Thailand	7.1	5.6	0 [#]	7.7
24	Alcohol Denat.	Triclosan	Cucumber Extract	Thailand	7.3	7.7	7.3	7.7
25	Alcohol Denat.	Triclosan	Triethanolamine	Thailand	7.1	7.7	7.1	7.7
26	Alcohol Denat.	Triclosan	Triethanolamine, Aloe Barbadensis	Thailand	7.3	7.7	7.3	7.7
27*	Alcohol 68.0%	Triclosan	Alo Vera	Thailand	7.1	0 [#]	7.3	2.7
28	Ethyl Alcohol 62%	Triclosan	Alo Vera, Cucumber Extract	Thailand	7.3	7.7	7.3	7.7
29	Ethyl Alcohol 64.13%	Triclosan	Menthol, Moisturizing beads Lemon Soda, Aloe Barbadensis	Thailand	7.1	7.6	7.3	7.4

* Product code 12, 14, 19, 21, 23 and 27 failed to comply with the bactericidal efficacy criterion against at least 1 test bacteria

[#] No reduction of the bacterial amount before and after contact time

Discussion

The modified EN 1276: 2009 method utilized 10-time minimizing the test system volume, i.e. volume of bacterial inoculum and interfering substance; BA, from 1 mL to 0.1 mL each, while the same final concentration of inoculum and BA as specified in the method was maintained. Consequently, the volume of tested samples could be increased from 8 mL to 9.8 mL. Alcohol rapidly loses its activity when diluted.⁽¹⁹⁾ The overall 2% additional volume, i.e. 1% inoculum and 1% BA, made the minimum change in the texture of ABHR samples which was in accordance with related international standards⁽²⁰⁾ that the testing condition shall not cause a substantial change of the test sample integrity.

The temperature is reported to be one of the several factors affecting the antimicrobial products activity.⁽¹⁴⁻¹⁶⁾ WHO Guidelines⁽¹⁾ also stated that “Conditions in suspension and *in vitro* or *ex vivo* testing do not reflect those on human skin”, while the obligatory temperature specified in the European standard is 20°C and additional temperatures could be chosen from 4°C, 10°C, 30°C or 40°C. Therefore, this study demonstrated the modification of testing temperature at 34°C ± 1°C to reflect the temperature of an average human skin temperature⁽¹⁶⁻¹⁸⁾ in practical condition that had been tested using volunteers’ hands⁽²¹⁾ or fingerpads⁽²²⁾ in *in vivo* testing methods.

The sequence of manipulations in each testing step including the preparation and standardization of reference inoculums is necessary to ensure repeatability of the bactericidal suspension test.^(13,15) Calibration data for each bacterial reference strain using spectrophotometer at wavelength of 620 nm^(9,20) was used to estimate and achieve a suitable amount of bacterial culture suspension. The quality control especially in the neutralization validation of the method should also be demonstrated.⁽⁹⁾ Diluents and/or agar containing neutralizer (s) used to neutralize the antimicrobial properties of each product formulation shall demonstrate that the testing conditions i.e. diluent and testing procedure were suitable and posed no toxic effect on the test bacteria.⁽²³⁾ It was observed that the choice of proper media used throughout the experimental conditions was necessary to achieve the neutralization validation criterion (Tables 2 and 3). Using D/E as a neutralizing diluent and TSA as an enumeration medium, repeatability of bacterial lg R were observed between the 2-4 separate experiments evaluated in our study (Table 3) over the ranges of ethanol standard solution from 20% to 70% (by volume).

Using this validated modified method, 6 ABHR products (Table 4) demonstrated an inadequate bactericidal efficacy even in the presence of triclosan. These results were in concordance with antibacterial efficacy of alcoholic hand rubs in the Kenyan market reported by Ochwoto *et al.*,⁽²⁴⁾ using a more complicated *in vivo* EN 1500 method,⁽²¹⁾ that the combination of alcohol and triclosan in a formulation did not show a synergistic effect but exhibited poor bactericidal efficacy to *E. coli*, *S. aureus* and *P. aeruginosa*. Combination of ethanol and aloe was also reported to be the least effective with lg R less than 3.⁽²³⁻²⁵⁾ Additionally, a study of 12 ABHR products in gel form produced in Brazil containing 70% ethyl alcohol revealed the differences of 17% and 67% of the products that failed in EN 1500 efficacy tests with contact time of 60 s⁽²⁶⁾ and 30 s,⁽²⁷⁾ respectively, suggesting that consumer should be aware of application of 60 s to provide adequate effectiveness.

ABHR products are categorized as controlled cosmetic product by the Thai FDA⁽⁵⁾ and labelling of ingredients may not show alcohol concentration. To ensure a sufficient effectiveness, regulatory authority should consider setting a criterion on alcohol concentration on ABHR labelling. This concept is confirmed by USFDA statement in “Guidance on studies necessary to support a Generally Recognized as Safe and Effective (GRAS/E)” that the final formulation efficacy testing of antiseptic handrub products marketed as over-the-counter (OTC) drug is necessary in order to confirm effectiveness and label the product appropriately for use.^(28,29) USFDA proposed the ABHR’s bactericidal efficacy tests to demonstrate only a 3-log reduction (99.9%) or greater in *in vitro* bacterial viability tests with all the 25 representative clinical isolates and 25 reference strains.⁽²⁹⁾ However, the susceptibility of 4 European test bacterial strains used in an obsolete prEN 12054 method which was identical to EN 1276: 2009, were reported to be comparable to the clinical isolates and reference strains specified by USFDA and sufficient to determine a comprehensive bactericidal activity of ABHR products.⁽³⁰⁾ In addition to the bactericidal efficacy evaluation of ABHR products, consumer shall also realize that ABHR may be used as an alternative to hand washing with soap and warm water which is the most effective washing.⁽³¹⁾

Conclusion

The modified EN 1276: 2009 method demonstrated minimizing the test system volume up to 98% concentration of ABHR products could be tested under the simulated used conditions. The modified method was not only suitable for *in vitro* testing but also practical for routine test of bactericidal effectiveness for any alcohol-based sanitizers with intention to use as undiluted. Using this modified EN 1276: 2009 method, 20.7% of ABHR products failed the bactericidal efficacy, suggesting that not all marketed products had adequate efficacy. Therefore, the bactericidal efficacy of the products is important and appropriate regulation and monitoring of the post-marketing surveillance for consumer protection are needed.

Acknowledgements

This study was supported by the Bureau of Cosmetics and Hazardous Substances, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand.

References

1. World Health Organization. WHO guidelines on hand hygiene in health care: first global patient safety challenge clean care is safer care. [Online]. 2009 [cited 2018 Aug 11]; [270 screens]. Available from: URL: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44102/9789241597906_eng.pdf;jsessionid=797DC5A1EBB75963455_DB4DE6A10AC04?sequence=1.

2. Boyce JM, Pittet D. Guideline for hand hygiene in health-care settings: recommendations of the healthcare infection control practices advisory committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA hand hygiene task force. *MMWR*. [Online]. 2002 [cited 2018 Mar 10]; 51(RR-16): 1-45. Available from: URL: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5116a1.htm>.
3. Kilpatrick C, Hosie L, Storr J. Hand hygiene-when and how it should be done? *Nurs Times*. [Online]. 2013 [cited 2018 Mar 10]; 109: 16-8. Available from: URL: <https://www.nursingtimes.net/Journals/2014/04/09/x/n/p/Hand-hygiene---when-and-how-should-it-be-done-250913.pdf>.
4. Pratt RJ, Pellowe CM, Wilson JA, Loveday HP, Harper PJ, Jones SRLJ, et al. epic2: National evidence-based guidelines for preventing healthcare-associated infections in NHS hospitals in England. *J Hosp Infect* 2007; 65S: S1-S64.
5. Food and Drug Administration. Ingredients not listed in Ministry of Public Health Notification for Cosmetics. In: Criterion for determination of Cosmetic Notification. Nonthaburi, Thailand: Bureau of Controlled Cosmetics and Hazardous Substances, Food and Drug Administration; 2016.
6. Robinson AL, Lee HJ, Kwon J, Todd E, Rodriguez FP, Ryu D. Adequate hand washing and glove use are necessary to reduce cross-contamination from hands with high bacterial loads. *J Food Prot* 2016; 79(2): 304-8.
7. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Influence of organic matter, cations and surfactants on the antimicrobial activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil in vitro. *J Appl Microbiol* 1999; 86(3): 446-52.
8. Gaonkar TA, Geraldo I, Caraos L, Modak SM. An alcohol hand rub containing a synergistic combination of an emollient and preservatives: prolonged activity against transient pathogens. *J Hosp Infect* 2005; 59(1): 12-8.
9. EN 1276: 2009. Chemical disinfectants and antiseptics-Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic, and institutional areas-Test method and requirements (phase 2, step 1). Brussels, Belgium: European Committee for Standardization; 2009.
10. EN 14885: 2015. Chemical disinfectants and antiseptics-Application of European Standards for chemical disinfectants and antiseptics. Brussels, Belgium: European Committee for Standardization; 2015.
11. Messenger S, Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Assessment of the antibacterial activity of tea tree oil using the European EN 1276 and En 12054 standard suspension tests. *J Hospital Infection* 2005; 59(2): 113-25.
12. Taylor JH, Rogers SJ, Holah JT. A comparison of the bactericidal efficacy of 18 disinfectants used in the food industry against *Escherichia coli* O157: H7 and *Pseudomonas aeruginosa* at 10 and 20°C. *J Appl Microbiol* 1999; 87(5): 718-25.
13. Russell AD. Factors influencing the efficacy of antimicrobial agents. In: Russell AD, Hugo WB, Ayliffe GAJ, Editors. Principles and practices of disinfection, preservation, and sterilization. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1982.
14. Russell AD. Bacterial resistance to disinfectants. *J Infect Prevention* 2002; 3(3): 22-4.
15. Langsrud S, Sundheim G. Factors influencing a suspension test method for antimicrobial activity of disinfectants. *J Appl Microbiol* 1998; 85(6): 1006-12.

16. Marsh A. Facts about your skin-temperatures in and on the human body. [Online]. 2012 [cited 2018 Mar 10]; [4 screens]. Available from: URL: http://www.healthyheating.com/Definitions/facts_about_skin.htm.
17. Farzana A. Temperature of A healthy human (skin temperature). [Online]. 2001 [cited 2018 Mar 10]; Available from: URL: <https://hypertextbook.com/facts/2001/AbantyFarzana.shtml>.
18. Bierman W. The temperature of the skin surface. JAMA 1936; 106(14): 1158-62.
19. United States Pharmacopoeia and National Formulary (USP 41-NF 36). Chapter 1072 Disinfectants and antiseptics. Volume 2. Rockville, Md: United States Pharmacopeial Convention, Inc; 2018. p. 7090-7095.
20. ISO 11930: 2019. Cosmetics-microbiology-evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product. Geneva: International Organization for Standardization; 2019.
21. EN 1500: 2013. Chemical disinfectants and antiseptics-Hygienic handrub-Test method and requirements (phase 2, step 2). Brussels, Belgium: European Committee for Standardization; 2013.
22. ASTM E2276-10: Standard test Method for determining the bacteria-eliminating effectiveness of hygienic handwash and handrub agents using the fingerpads of adults. West Conshohocken, PA.: ASTM International; 2019.
23. Sutton SV, Proud DW, Rachui S, Brannan DK. Validation of microbial recovery from disinfectants. PDA J Pharm Sci and Technol 2002; 56(5): 255-66.
24. Ochwoto M, Muita L, Talaam K, Wanjala C, Ogeto F, Wachira F, et al. Anti-bacterial efficacy of alcoholic hand rubs in the Kenyan market, 2015. Antimicrob Resist Infect Control 2017; 6: 17. (6 p).
25. Ali Y, Dolan MJ, Fendler EJ, Larsoon EL. Chapter 12 Alcohols. In: Block SS. Disinfection, sterilization, and preservation. 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
26. Guilhermetti M, Marques Wiirzler LA, Castanheira Facio B, da Silva Furlan M, Campo Meschial W, Bronharo Tognim MC, et al. Antimicrobial efficacy of alcohol-based hand gels. J Hosp Infect 2010; 74(3): 219-24.
27. do Prado MF, Coelho AC, de Brito JP, Ferreira DO, Junior AW, Menecucci Cda S, et al. Antimicrobial efficacy of alcohol-based hand gels with a 30-s application. Lett Appl Microbiol 2012; 54(6): 564-7.
28. U.S. Food and Drug Administration. FDA requests additional information to address data gaps for consumer hand sanitizers. [Online]. 2016 Available from: URL: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-requests-additional-information-address-data-gaps-consumer-hand-sanitizers>.
29. Safety and effectiveness of consumer antiseptics; topical antimicrobial drug products for over-the-counter human use; proposed amendment of the tentative final monograph; reopening of administrative record. [Online]. 2016 [cited 2019 Mar 10]; [26 screens]. Available from: URL: <https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-2016-06-30/pdf/2016-15410.pdf>
30. Kampf G, Hollingsworth A. Validity of the four European test strains of prEN 12054 for the determination of comprehensive bactericidal activity of an alcohol-base hand rub. J Hosp Infect 2003; 55(3): 226-31.
31. Senior H, Booth CM, Beswick A. A review of the data on efficacy of hand cleaning products in industrial use as alternatives to handwashing. [Online]. 2014 [cited 2018 Mar 10]; [42 screens]. Available from: URL: <http://www.hse.gov.uk/research/rrpdf/rr1007.pdf>.

ประสิทธิภาพเชิงปริมาณในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของเจลตามือ ในประเทศไทย ชนิดที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบ เมื่อทดสอบด้วย **Modified EN 1276: 2009 method**

สุวรรณา เอียรอังกูร์ ปรียา ปันนิล กนกกร กริเหลียง และสิรารวรรณ อันเกตุ
สำนักเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ผลลัพธ์สำหรับรักษาสุขภาพอนามัยมือแบบพร้อมใช้ ที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบหลัก (alcohol-based handrub-ABHR) เป็นที่นิยมอย่างแพร่หลายในประเทศไทย เนื่องจากความสะดวกและรวดเร็วในการใช้งานแม้ในบริเวณที่ไม่มีน้ำเพื่อลดปริมาณเชื้อก่อโรคซึ่งอาจส่งผ่านจากมือที่ปนเปื้อน อย่างไรก็ตาม ผลิตภัณฑ์ ABHR ที่วางจำหน่ายในประเทศไทย ยังไม่มีการกำหนดเกณฑ์ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อรวมถึงวิธีทดสอบ จึงได้นำวิธีทดสอบสากล EN 1276: 2009 มาปรับให้เหมาะสม โดยทำการทดสอบที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส และปรับลดการเจือจางในขั้นตอนทดสอบ ในสภาวะที่มี Bovine Albumin Fraction V ในเวลาทดสอบ 1 นาที โดยทดสอบกับเชื้อมาตรฐาน 4 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Enterococcus hirae* ATCC 10541 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 ผลลัพธ์ที่สามารถลดปริมาณเชื้อได้ในเวลาสัมผัสเชื้อ 1 นาที ต้องมีค่า log reduction ($\lg R$) ≥ 5 จากการประเมินคุณภาพ ผลิตภัณฑ์ ABHR ที่จำหน่ายในท้องตลาด จำนวน 29 ตัวอย่าง ด้วยวิธีที่ปรับใหม่นี้พบว่า มีตัวอย่างไม่ผ่านเกณฑ์ 6 ตัวอย่าง (ร้อยละ 20.7) แสดงให้เห็นว่าข้อมูลด้านประสิทธิภาพ ด้านการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์ ABHR เป็นข้อมูลที่จำเป็นเพื่อสนับสนุนการควบคุมคุณภาพและพิจารณากำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์ ABHR ของประเทศ นอกจากนี้ควรมีการเฝ้าระวังคุณภาพหลังจำหน่ายเพื่อคุ้มครองผู้บริโภคและพัฒนาคุณภาพผลิตภัณฑ์ต่อไป

ความชุกของการติดเชื้อไวรัส Human papillomavirus (HPV) และไทป์ต่าง ๆ ในสตรีไทยที่มีผลแปปสเมียร์ปกติ

ทุมวดี ตั้งศิริวัฒนา¹ สุขใจ ผลอำไพสถิตย์² อัญชลี ชัยนวล³ กรองทิพย์ บุญสม⁴ สังคม วิทยนันท์⁵
สมคิด จิจักร⁶ ปรีศนา วงศ์วีรชันต์⁷ เยาวมาลย์ สุตวิจิตร⁸ จารุวรรณ ทองนาค¹ พิไลลักษณ์ อัครไพบูลย์ โอภาตะ²
สมรัตน์ เลิศมหาฤทธิ์⁹ และสมชาย แสงกิจพร²

¹โรงพยาบาลขอนแก่น อำเภอเมือง ขอนแก่น 40000 ²กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

³โรงพยาบาลศูนย์นครพิงค์ อำเภอแมริม เชียงใหม่ 50180 ⁴โรงพยาบาลสงขลา อำเภอเมือง สงขลา 90000

⁵ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 อำเภอเมือง นครสวรรค์ 60000 ⁶ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 อำเภอแมริม เชียงใหม่ 50180

⁷ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 7 อำเภอเมือง ขอนแก่น 40000 ⁸ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12 อำเภอเมือง สงขลา 90000

⁹จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

บทคัดย่อ มะเร็งปากมดลูกพบมากเป็นอันดับ 2 ในสตรีไทย โดยมีเชื้อ Human Papillomavirus (HPV) ซึ่งติดต่อทางเพศสัมพันธ์เป็นสาเหตุสำคัญ การฉีดวัคซีนเป็นแนวทางการป้องกันการติดเชื้อ แต่ข้อมูลการติดเชื้อไวรัส HPV ในประเทศมีค่อนข้างจำกัด จึงได้ทำการสำรวจความชุกของการติดเชื้อ HPV และไทป์ของ HPV ในสตรีไทยใน 4 ภูมิภาคของประเทศที่มีผลการตรวจแปปสเมียร์ปกติ จำนวน 487 ราย โดยดำเนินการในโรงพยาบาล 4 แห่ง คือ โรงพยาบาลนครพิงค์ โรงพยาบาลขอนแก่น โรงพยาบาลมะเร็งลพบุรี และโรงพยาบาลสงขลา จากการตรวจด้วยวิธี Liquid-based Pap test และหาไทป์ของเชื้อ HPV ด้วยวิธี Real-time Polymerase Chain Reaction พบว่า มีผลตรวจแปปสเมียร์ผิดปกติ 14 ราย (ร้อยละ 2.9) และมีผลปกติ 473 ราย ในผลปกตินี้พบการติดเชื้อ HPV 98 ราย (ร้อยละ 20.7) โดยร้อยละ 12.1 และร้อยละ 5.5 ติดเชื้อ HPV ไทป์ที่มีความเสี่ยงสูงและต่ำในการก่อมะเร็งตามลำดับ และพบว่าร้อยละ 3.4 ติดเชื้อมากกว่า 2 ไทป์ร่วมกัน ไทป์ที่มีความเสี่ยงสูงที่พบมาก คือ HPV 16 (ร้อยละ 17.5) HPV 66 (ร้อยละ 11.3) HPV 52 (ร้อยละ 10.0) และ HPV 53 (ร้อยละ 10.0) ขณะที่ไทป์ที่มีความเสี่ยงต่ำที่พบมาก คือ HPV 42 (ร้อยละ 20.8) HPV 6 (ร้อยละ 15) HPV 40 (ร้อยละ 15) และ HPV 54 (ร้อยละ 13) ผู้ติดเชื้อส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มอายุน้อยกว่า 30 ปี และอัตราการติดเชื้อน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในผู้ที่มีอายุสูงขึ้น ปัจจัยในการติดเชื้อ HPV คือ การมีคู่นอนมากกว่าหนึ่งคน และมีรายได้ต่ำ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาวัคซีนป้องกันมะเร็งปากมดลูกและการเลือกใช้วัคซีนที่เหมาะสมกับสตรีไทยต่อไป

Corresponding author E-mail: thumwadee@hotmail.com

Received: 2 April 2018

Revised: 1 April 2019

Accepted: 15 May 2019

บทนำ

มะเร็งปากมดลูกเป็นปัญหาสำคัญอันดับ 3 รองจากมะเร็งเต้านม มะเร็งตับและทางเดินน้ำดี ซึ่งจากรายงานของสถาบันมะเร็งแห่งชาติฉบับที่ 9 พบอุบัติการณ์ 11.7/100,000 ประชากรสตรี⁽¹⁾ และจากสถิติปี ค.ศ.2018 ของ The Catalan Institute of Oncology (ICO) and the International Agency for Research on Cancer (IARC) พบอุบัติการณ์ของมะเร็งปากมดลูกมากเป็นอันดับ 2 รองจากมะเร็งเต้านม คือ มีอุบัติการณ์ 16.2/100,000 ประชากรสตรี โดยพบผู้ป่วยรายใหม่ 8,622 รายต่อปี และมีอัตราการเสียชีวิต 9.0/100,000 ประชากรสตรี⁽²⁾

เชื้อ human papillomavirus (HPV) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของโรคมะเร็งปากมดลูก สามารถติดต่อได้ทางเพศสัมพันธ์ การติดเชื้อ HPV สามารถหายได้เองตามธรรมชาติ ภายในระยะเวลา 1-5 ปี มีเพียงส่วนน้อยที่เชื้อไวรัสยังคงอยู่ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้มีความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งได้⁽³⁾ ไวรัส HPV แบ่งออกได้มากกว่า 200 ไทป์ เชื้อนี้ทำให้เกิดหูด เนื้องอก และมะเร็งชนิดต่าง ๆ มีการติดเชื้อในคนและสัตว์หลายชนิด HPV บางไทป์ติดเชื้อที่เซลล์เนื้อเยื่อบุผิว (epithelial cell) ของผิวหนังตามฝ่ามือฝ่าเท้า ซึ่งทำให้เกิดโรคหูด บางไทป์ติดเชื้อที่เซลล์บุเยื่อเมือก (mucosal cell) ของปาก ลำคอ ทางเดินหายใจ และอวัยวะสืบพันธุ์ ทำให้เกิดหูดหงอนไก่ ตึงเนื้องอก และมะเร็งปากมดลูก ไทป์ที่ติดต่อทางเพศสัมพันธ์เป็นไทป์ที่มีความเสี่ยงที่จะก่อมะเร็งปากมดลูกได้

เชื้อ HPV แบ่งตามความเสี่ยงที่จะก่อมะเร็งปากมดลูกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีความเสี่ยงสูงต่อการก่อมะเร็ง (high risk group) ได้แก่ HPV ไทป์ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 และ 68^(4,5) โดยไทป์ 16 และ 18 พบในมะเร็งปากมดลูกได้สูงถึงร้อยละ 70 และกลุ่มที่มีความเสี่ยงต่ำในการก่อมะเร็งหรืออาจไม่ก่อมะเร็ง ได้แก่ HPV ไทป์ 6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 56, 61, 72, 73 และ 81 โดยไทป์ 6 และ 11 เป็นไทป์ที่พบว่าทำให้เกิดหูดที่อวัยวะสืบพันธุ์หรือเรียกว่าหูดหงอนไก่สูงถึงร้อยละ 90^(6,7)

การฉีดวัคซีน HPV เพื่อป้องกันมะเร็งปากมดลูก เป็นแนวทางหนึ่งที่มีผลทำให้ลดการเกิดโรคได้ มีการใช้อย่างแพร่หลายในหลายประเทศทั่วโลกและในประเทศไทย วัคซีนรุ่นแรกที่ผลิตออกมาใช้นั้น ผู้ผลิตบางแห่งผลิตโดยใช้ไทป์เสี่ยงสูง HPV 16 และ 18 เท่านั้น ขณะที่บางแห่งเพิ่มไทป์เสี่ยงต่ำ HPV 6, 11 ด้วย และวัคซีนที่ผลิตล่าสุดประกอบด้วย 9 ไทป์ โดยเพิ่มไทป์ที่อยู่ในกลุ่มความเสี่ยงสูงอื่น ๆ อีก 5 ไทป์ คือ HPV 31, 33, 45, 52 และ 58 เพื่อครอบคลุมการติดเชื้อให้มากขึ้น⁽⁸⁾

จากการศึกษาการแพร่กระจายของไทป์ต่าง ๆ และการติดเชื้อในหลายประเทศทั่วโลก พบว่ามีความหลากหลายและแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่⁽⁹⁻¹⁰⁾ ดังนั้น จึงควรมีข้อมูลพื้นฐานของความชุกจากการติดเชื้อไวรัสไทป์ต่าง ๆ ในประชากรในแต่ละพื้นที่ เพื่อที่จะเลือกใช้วัคซีนที่เหมาะสมหรือนำไปสู่การพัฒนาวัคซีนในอนาคตที่ครอบคลุมไทป์เฉพาะมากขึ้น ซึ่งข้อมูลความชุกการติดเชื้อของสตรีไทยในช่วงอายุต่าง ๆ และไทป์ของ HPV ในประเทศไทยยังมีจำกัด และการศึกษาส่วนใหญ่ไม่ครอบคลุมพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศ รวมทั้งเป็นการศึกษาในสตรีที่มีผลแปป smear ผิดปกติ จึงได้ทำการสำรวจข้อมูลความชุกในการติดเชื้อ HPV และตรวจหาไทป์เฉพาะที่พบในสตรีไทยที่มีผลการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกปกติ หรือผลตรวจแปป smear ปกติในโรงพยาบาล 4 แห่ง จาก 4 ภูมิภาคของประเทศ

วัสดุและวิธีการ

กลุ่มศึกษา

อาสาสมัครสตรีไทยที่ได้รับการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกประจำปีรวมทั้งสิ้น 487 ราย ที่โรงพยาบาลนครพิงค์ (ภาคเหนือ) โรงพยาบาลขอนแก่น (ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ) โรงพยาบาลมะเร็งลพบุรี (ภาคกลาง) และโรงพยาบาลสงขลา (ภาคใต้) ในระหว่างปี 2557-2559 จำนวน 125, 127, 106 และ 129 ราย ตามลำดับ โดยที่ทั้งหมดไม่อยู่ในภาวะตั้งครรภ์ ไม่มีประวัติเป็นมะเร็งปากมดลูก หรือเคยเป็นมะเร็งปากมดลูกที่หายแล้ว และไม่มีประวัติการเป็นมะเร็งสืบพันธุ์ชนิดอื่น

อาสาสมัครทุกคนตอบคำถามที่เกี่ยวกับพฤติกรรมความเสี่ยงต่าง ๆ และข้อมูลทั่วไปเพื่อเป็นข้อมูลในการวิเคราะห์ปัจจัยเสี่ยงที่มีอิทธิพลต่อการติดเชื้อ HPV ได้แก่ อายุ สถานะ อาชีพ ระดับการศึกษา รายได้ ประวัติการฉีดวัคซีน HPV ประวัติการมีเพศสัมพันธ์ จำนวนคู่นอน อายุที่เริ่มมีเพศสัมพันธ์ การสูบบุหรี่ โรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ การตรวจมะเร็งปากมดลูก และผลการตรวจมะเร็งปากมดลูกที่ผ่านมา

การศึกษานี้ได้ผ่านการอนุมัติโดยคณะกรรมการการศึกษาวิจัยในคน กระทรวงสาธารณสุข หมายเลขอ้างอิงที่ 40/2556 และคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาลขอนแก่น หมายเลขอ้างอิงที่ KE57048

การตรวจทางเซลล์วิทยา

ตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกของอาสาสมัครถูกใส่ในน้ำยาเก็บรักษาเซลล์ (Surepath® liquid-based Pap test, ประเทศสหรัฐอเมริกา) โดยใช้อุปกรณ์เก็บเซลล์ชนิดมีด้ามจับ (Broom-type sampling device, Digene corporation, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ตามขั้นตอนโดยย่อ ดังนี้ นำตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกที่ได้จากการป้ายด้วยอุปกรณ์เก็บเซลล์ 2 ครั้ง และหักปลายด้ามจับออก ปลายอีกด้านหนึ่งลงในหลอดที่มีน้ำยาสำหรับเก็บรักษาเซลล์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (มล.) ปั่นผสมให้เข้ากัน แบ่งตัวอย่างมา 1 มล. นำไปตรวจหา HPV DNA ด้วยวิธี Real-time PCR HPV testing ส่วนที่เหลือ 9 มล. นำไปตรวจวัดความผิดปกติของเซลล์ปากมดลูกด้วยระบบเครื่องอัตโนมัติ (Prep Stain® system, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ซึ่งความผิดปกติของเซลล์จากการทำแปปสเมียร์ แปลผลตามระบบของ Besthesda system โดยแปลผลเป็นปกติ (Normal) หรือผิดปกติ (Abnormal) และแบ่งความผิดปกติของเซลล์เป็น ASCUS (atypical squamous cells of undetermined significance), LSIL (low-grade squamous intraepithelial lesions) และ HSIL (high-grade squamous intraepithelial lesions)

การวิเคราะห์ HPV ด้วยวิธี Real-time PCR

นำตัวอย่างตรวจซึ่งเก็บรักษาในน้ำยามาสกัดเอา DNA โดยใช้ชุดตรวจ DNA mini kit (QIAamp® DNA Mini kit 50 (QIAGEN), ประเทศ Germany) และตรวจหา HPV DNA ด้วยชุดตรวจสำเร็จรูป (See-gene Anyplex™ II HPV 28 Detection, ประเทศเกาหลี) ด้วยวิธี Real-time PCR (CFX96 Real-time PCR system®, Bio-Rad IVD, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ชุดตรวจสำเร็จรูปสามารถตรวจหาไวรัส HPV ได้ 28 ไทป์: เป็น HPV กลุ่มเสี่ยงสูง 19 ไทป์ (HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73, 82) และกลุ่มเสี่ยงต่ำ 9 ไทป์ (HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70) ควบคุมคุณภาพ DNA ของตัวอย่างด้วยการทดสอบ beta-globin gene และประเมินผลด้วยโปรแกรมเฉพาะ (Seegene viewer for Real-time Instrument, ประเทศเกาหลี)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยเสี่ยงต่าง ๆ ที่อาจมีผลต่อการติดเชื้อ ด้วย Chi-Square test โดยกำหนดค่า $p < 0.05$ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ผล

ความชุกของการติดเชื้อ HPV ในอาสาสมัคร

จากจำนวนสตรีไทยทั้งหมด 487 รายที่เข้ารับการตรวจแปปสเมียร์และตรวจหาการติดเชื้อ HPV ในโรงพยาบาล 4 แห่ง จาก 4 ภูมิภาค พบว่า มีผลการตรวจแปปสเมียร์เป็นปกติ จำนวน 473 ราย และผิดปกติ จำนวน 14 ราย (ร้อยละ 2.9) ในกลุ่มที่มีผลตรวจแปปสเมียร์ปกติ พบว่ามีการติดเชื้อ HPV จำนวน 98/473 ราย (ร้อยละ 20.7) เมื่อสำรวจความชุกของการติดเชื้อ HPV ในแต่ละโรงพยาบาลทั้ง 4 แห่ง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Chi-square test $p > 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความชุกของการติดเชื้อ HPV ในหญิงไทยที่มีผลแปปสเมียร์ปกติ ใน 4 โรงพยาบาล

โรงพยาบาล	จำนวน อาสาสมัคร	จำนวนผู้ติดเชื้อ (ร้อยละ)	HPV ไพบ่*
เชียงใหม่	119	23 (19.3)	<u>High Risk</u> 53, 58, 66, 16, 18, 51, 52, 59, 31, 35, 45, 68 <u>Low Risk</u> 70, 6, 44, 54, 40, 42, 43
ขอนแก่น	124	29 (23.4)	<u>High Risk</u> 16, 53, 66, 58, 59, 18, 31, 45, 51, 52, 73 <u>Low Risk</u> 6, 11, 40, 42, 43, 70
ลพบุรี	103	23 (22.3)	<u>High Risk</u> 16, 18, 66, 35, 39, 45, 51, 53, 58, 59, 69, 82 <u>Low Risk</u> 42, 40, 61, 6, 11, 43, 54, 70
สงขลา	127	23 (18.1)	<u>High Risk</u> 52, 51, 59, 18, 45, 53, 56, 66 <u>Low Risk</u> 42, 43, 54, 11, 40

* ชนิดของ HPV type เรียงตามลำดับจากมากไปน้อย

ในการศึกษานี้ได้ใช้วิธีทดสอบที่สามารถตรวจหา HPV ไทป์ต่าง ๆ ได้ทั้งสิ้น 28 ไทป์ ผลการทดสอบสามารถตรวจพบเชื้อ HPV ได้ทั้งสิ้น 26 ไทป์ (ไม่พบไทป์ 26 และ 33) แต่ละไทป์มีความชุกแตกต่างกัน ไวรัส HPV เสี่ยงสูงที่พบมากในหญิงไทยคือ HPV 16 (ร้อยละ 17.5), HPV 66 (ร้อยละ 11.25), HPV 52 (ร้อยละ 10) และ HPV 53 (ร้อยละ 10) ตามลำดับ สายพันธุ์เสี่ยงต่ำคือ HPV 42 (ร้อยละ 20.75) HPV 6 (ร้อยละ 15), HPV 40 (ร้อยละ 15) และ HPV 54 (ร้อยละ 13) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบผู้ที่มีการติดเชื้อ HPV มากกว่า 1 ไทป์ จำนวน 15 ราย (ร้อยละ 15.3) ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ความถี่ของการติดเชื้อ HPV สายพันธุ์ต่าง ๆ

HPV type	จำนวนผู้ติดเชื้อ				
	เชียงใหม่	ขอนแก่น	ลพบุรี	สงขลา	รวม
High Risk					
16	2	8	4	–	14
18	2	1	2	1	6
26	–	–	–	–	0
31	1	1	–	–	2
33	–	–	–	–	0
35	1	2	1	–	4
39	–	–	1	–	1
45	1	1	1	1	4
51	2	1	1	2	6
52	2	1	–	5	8
53	4	2	1	1	8
56	–	–	–	1	1
58	3	2	1	–	6
59	2	2	1	2	7
66	3	3	2	1	9
68	1	–	–	–	1
69	–	–	1	–	1
73	–	1	–	–	1
82	–	–	1	–	1
รวม	24	25	17	14	80

ตารางที่ 2 ความถี่ของการติดเชื้อ HPV สายพันธุ์ต่าง ๆ (ต่อ)

HPV type	จำนวนผู้ติดเชื้อ				
	เชียงใหม่	ขอนแก่น	ลพบุรี	สงขลา	รวม
Low Risk					
6	2	5	1	–	8
11	–	1	1	1	3
40	2	2	3	1	8
42	1	2	4	4	11
43	1	1	1	3	6
44	1	–	–	–	1
54	2	1	1	3	7
61	–	–	3	–	3
70	3	2	1	–	6
รวม	12	14	15	12	53
Mix types	5	6	2	2	15

ปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อ HPV

จากแบบสอบถามสตรีไทยที่เข้าร่วมในการศึกษานี้ พบว่ามีอายุเฉลี่ย 41.5 ± 13.2 ปี (14–75 ปี) เริ่มมีเพศสัมพันธ์ครั้งแรกเมื่ออายุ 16 ปี เคยได้รับวัคซีน HPV ร้อยละ 6.2 มีคู่นอนเดียวร้อยละ 78.6 มีเพียงร้อยละ 4.2 สูบบุหรี่

จากข้อมูลพื้นฐานที่ได้รับ เมื่อวิเคราะห์ถึงปัจจัยเสี่ยงต่าง ๆ ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อ HPV เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ติดเชื้อและกลุ่มผู้ไม่ติดเชื้อ พบว่าปัจจัยเสี่ยงที่อาจส่งผลทำให้มีการติดเชื้อ HPV สูงขึ้น ได้แก่ การมีคู่นอนมากกว่าหนึ่งคน มีเศรษฐกิจฐานะต่ำและอายุที่น้อยกว่า 30 ปี ($p < 0.05$) โดยในกลุ่มอายุน้อยกว่า 30 ปี พบการติดเชื้อ 33 จาก 121 ราย (ร้อยละ 27.3), อายุ 30–50 ปี พบได้ 46 จาก 202 ราย (ร้อยละ 22.7) และอายุมากกว่า 50 ปี พบได้ 19 จาก 150 ราย (ร้อยละ 12.7) ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ปัจจัยที่มีผลต่อการติดเชื้อ HPV ในสตรีไทยที่มีผลแปปสเมียร์ปกติ

ปัจจัย	จำนวนผู้ติดเชื้อ (ร้อยละ)	จำนวนผู้ไม่ติดเชื้อ (ร้อยละ)	p-value
ช่วงอายุ (ปี)			0.005
< 30	33 (28.7)	82 (71.3)	
30-50	46 (22.1)	162 (77.9)	
> 50	19 (12.8)	130 (87.2)	
สถานภาพสมรส			0.530
- โสด	10 (15.4)	55 (84.6)	
- สมรส	76 (21.2)	282 (78.8)	
- หย่าร้าง หม้าย	11 (22.4)	38 (77.6)	
อาชีพ			0.648
- รับจ้าง	41 (24.1)	129 (75.9)	
- รับราชการ	24 (17.8)	111 (82.2)	
- ธุรกิจส่วนตัว	9 (19.1)	38 (80.9)	
- แม่บ้าน	18 (19.8)	73 (80.2)	
- อื่น ๆ	4 (15.4)	22 (84.6)	
การศึกษา			0.642
- ประถมศึกษา	21 (19.8)	85 (80.2)	
- มัธยมศึกษา	26 (23.0)	87 (77.0)	
- อาชีวศึกษา	6 (14.0)	37 (86.0)	
- ปริญญาตรี	44 (21.5)	161 (78.5)	
รายได้			0.036
< 5,000	19 (20.2)	75 (79.8)	
5,000 - 10,000	26 (21.3)	96 (78.7)	
10,001 - 20,000	26 (28.3)	66 (71.7)	
> 20,000	17 (12.7)	117 (87.3)	
การฉีดวัคซีน HPV			0.594
- เคยฉีด	5 (16.7)	25 (83.3)	
- ไม่เคยฉีด	91 (20.7)	348 (79.3)	

ตารางที่ 3 ปัจจัยที่มีผลต่อการติดเชื้อ HPV ในสตรีไทยที่มีผลแปปสเมียร์ปกติ (ต่อ)

ปัจจัย	จำนวนผู้ติดเชื้อ (ร้อยละ)	จำนวนผู้ไม่ติดเชื้อ (ร้อยละ)	p-value
ประวัติโรคติดต่อ ทางเพศสัมพันธ์			0.586
- มีประวัติ	83 (21.1)	309 (78.8)	
- ไม่มีประวัติ	15 (18.5)	66 (81.5)	
จำนวนคู่นอน			0.034
- 1 คน	74 (19.7)	302 (80.3)	
- มากกว่า 1 คน	23 (30.7)	52 (69.3)	
อายุเมื่อมีเพศสัมพันธ์ ครั้งแรก			0.564
- < 20 ปี	32 (23.9)	102 (76.1)	
- 20-35 ปี	61 (19.7)	249 (80.3)	
- > 35 ปี	4 (25.0)	12 (75.0)	
การสูบบุหรี่			0.293
- สูบ	6 (30.1)	14 (70.0)	
- ไม่สูบ	91 (20.3)	358 (79.7)	

วิจารณ์

จากการศึกษาความชุกของการติดเชื้อในสตรีไทยที่มีผลการตรวจมะเร็งปากมดลูก (แปปสเมียร์) เป็นปกติ จำนวน 473 ราย ใน 4 จังหวัด ได้แก่ เชียงใหม่ ขอนแก่น ลพบุรี และสงขลา พบการติดเชื้อก่อนข้างสูงถึงร้อยละ 20.7 เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานการศึกษาระบาดวิทยาของประเทศต่าง ๆ เมื่อปี พ.ศ. 2553 พบค่าประมาณความชุกของการติดเชื้อ HPV ร้อยละ 11.7⁽¹¹⁾ โดยกลุ่มประเทศแอฟริกาที่มีความชุกสูงสุดร้อยละ 21 และความชุกต่ำสุดพบในเอเชียร้อยละ 9.4 ในขณะที่กลุ่มประเทศเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีความชุกค่อนข้างสูงกว่า (ร้อยละ 14) ซึ่งค่าความชุกที่ได้จากการศึกษานี้ใกล้เคียงกับการศึกษาความชุกในประเทศอื่น ๆ ได้แก่ แอฟริกาใต้ (ร้อยละ 20.4)⁽¹²⁾ โปรตุเกส (ร้อยละ 16.5)⁽¹³⁾ และจีน (ร้อยละ 13.3)⁽¹⁴⁾

รายงานการศึกษาอื่นของไทยปีต่าง ๆ กัน พบความชุกร้อยละ 13.3⁽¹⁵⁾ ในปี พ.ศ. 2555 และรายงานความชุกที่ค่อนข้างสูง คือ ร้อยละ 33.8 ปี พ.ศ. 2552⁽¹⁶⁾ ในขณะที่เมื่อเปรียบเทียบกับความชุกของการศึกษาของ Swangvaree และคณะ ในปี 2553 และการศึกษาของ Chansaenroj และคณะปี 2552 ที่รายงานความชุกร้อยละ 6.2 และ 7.6 ตามลำดับ⁽¹⁷⁻¹⁸⁾ ซึ่งค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษานี้ ซึ่งอาจเป็นผลจากการใช้วิธีการตรวจหาไทป์ที่ใช้ตรวจจำนวนไทป์ไม่เท่ากัน (13 ไทป์-35 ไทป์) วิธีการที่ใช้ตรวจหา HPV DNA แตกต่างกัน หรือจำนวนตัวอย่างที่ใช้ศึกษาและพื้นที่ที่เลือกใช้ในการศึกษาแตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม ความชุกของการติดเชื้อ HPV ในพื้นที่ศึกษา

ทั้ง 4 แห่ง นั้น ไม่มีความแตกต่างกัน อาจเป็นไปได้ด้วยสภาพความเจริญของความเป็นเมืองในปัจจุบันที่พฤติกรรมการใช้ชีวิตอิสระตามวัฒนธรรมประเทศตะวันตก นอกจากนี้ จากการศึกษาของ Marks และคณะ⁽¹⁹⁾ ซึ่งศึกษาความชุกของการติดเชื้อ HPV ในสตรีที่มารับบริการตรวจที่ห้องวางแผนครอบครัวของโรงพยาบาลในภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย พบว่าความชุกของการติดเชื้อในพื้นที่ภาคกลางมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 29.9 รองลงมาเป็นภาคใต้ (ร้อยละ 27.9) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ร้อยละ 21.2) และภาคเหนือ (ร้อยละ 20.5) ตามลำดับ ซึ่งมีความชุกของการติดเชื้อ HPV ของภูมิภาคต่าง ๆ ใกล้เคียงกับการศึกษานี้ แต่ลำดับความชุกของการศึกษานี้พบมากที่สุด ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ร้อยละ 23.4) รองลงมาเป็นภาคกลาง (ร้อยละ 22.3) ภาคเหนือ (ร้อยละ 19.3) และภาคใต้ (ร้อยละ 18.1) ตามลำดับ

ค่าความชุกของการศึกษานี้สอดคล้องกับอัตราอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งปากมดลูกใน 4 พื้นที่ ซึ่งมีอุบัติการณ์ใกล้เคียงกัน⁽²⁾ ปัจจัยความเสี่ยงที่พบว่ามีผลต่อการติดเชื้อ HPV สูงขึ้นคือ จำนวนคู่นอนมากกว่า 1 คน และการมีรายได้ต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาอื่น ๆ⁽³⁾ นอกจากนี้ อายุที่น้อยกว่า 30 ปี ก็มีส่วนสำคัญต่อการติดเชื้อสูงเมื่อเทียบกับกลุ่มอายุที่มากกว่า ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาอื่นที่พบการติดเชื้อ ในกลุ่มอายุน้อยกว่า 20-30 ปี และการติดเชื้อจะลดลงเมื่ออายุมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรูปแบบเฉพาะของการติดเชื้อในกลุ่มเอเชีย^(3,5) ในขณะที่ในกลุ่มประเทศส่วนใหญ่ ในทวีปอเมริกาและแอฟริกาพบการติดเชื้อสูงอีกครั้งเมื่ออายุมากขึ้น⁽¹⁰⁾ จากความชุกของการติดเชื้อ HPV ของทุกไทป์ในสตรีไทยร้อยละ 20.7 แบ่งเป็นการติดเชื้อไวรัสไทป์เสี่ยงสูง คิดเป็นร้อยละ 12.1 ซึ่งค่อนข้างสูงกว่าการศึกษาในสตรีที่มีผลตรวจคัดกรองปกติของ Laowahutanont และคณะ (ร้อยละ 5.3) แต่สอดคล้องกับการศึกษาในต่างประเทศ ที่รายงานความชุกของการติดเชื้อไทป์เสี่ยงสูงช่วงร้อยละ 13.4-14.8^(20,21)

แม้ว่าความชุกของการติดเชื้อของพื้นที่ศึกษาทั้ง 4 แห่ง ไม่แตกต่างกัน แต่ไทป์เสี่ยงสูงที่ตรวจพบมีชนิดแตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกันกับการศึกษาระบาดวิทยาในประเทศต่าง ๆ ทั่วโลก ที่มักพบความแตกต่างทั้งภายในพื้นที่ (sub-region) หรือระหว่างภูมิภาค (region)⁽¹¹⁾ ซึ่งก็อาจเป็นสาเหตุมาจากกลุ่มประชากรที่เลือกมาศึกษา หรือการเลือกศึกษาเป็นบางพื้นที่ไม่ครอบคลุมพื้นที่ทั้งหมด วิธีการตรวจที่แตกต่างกัน คุณภาพตัวอย่างตรวจ หรือสภาพภูมิประเทศที่แตกต่างกัน ไทป์ที่พบส่วนใหญ่ในพื้นที่เชียงใหม่ ขอนแก่น ลพบุรี และสงขลานั้น เป็นไทป์ที่มีความรุนแรงในการเกิดมะเร็งปากมดลูกอยู่ในกลุ่ม 14 ไทป์ ที่มีความเสี่ยงสูง (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)⁽⁴⁾ นอกจากนี้ ข้อมูลไทป์เฉพาะที่พบในแต่ละพื้นที่อาจมีประโยชน์ในการควบคุมป้องกัน ติดตามรอยโรคมะเร็งปากมดลูกได้ เช่น ในขอนแก่น พบทั้ง HPV 16 HPV 6 และ HPV 11 ซึ่งสอดคล้องกับไทป์ที่ใช้ในการผลิตวัคซีน 1st generation (HPV 16, 18, 6, 11) เช่นเดียวกันกับในลพบุรีที่พบไทป์ HPV 16 และ HPV 18 มากที่สุด ซึ่งตรงกับไทป์วัคซีน ในขณะที่ในสงขลาไม่พบไทป์ HPV 16, 31, 35, 58, 68 และ 73 แต่การศึกษาความชุกในสงขลาปี 2546 ของ Clifford และคณะ⁽⁹⁾ พบการติดเชื้อไทป์ HPV 16 จำนวน 3 ราย จาก 22 ราย ที่ติดเชื้อ ซึ่งไม่สอดคล้องกัน ซึ่งอาจเป็นผลจากจำนวนตัวอย่างที่ใช้ศึกษาครั้งนี้น้อยกว่าหรือความไวของวิธีตรวจที่แตกต่างกัน

ไทป์เสี่ยงสูงที่ตรวจพบมีการติดเชื้อมากที่สุดในสตรีไทยที่มีผลแปปสเมียร์ปกติคือ HPV 16, 66, 52 และ HPV 53 ซึ่งจากรายงานการศึกษาอื่นของประเทศไทยพบความแตกต่างของไทป์ที่พบมากที่สุดคือ พบไทป์ 72, 52, 62 และ 16⁽¹⁹⁾ หรือไทป์ 52, 16, 51, 58⁽¹⁰⁾ หรือไทป์ 16, 90, 31, 66, 52 และ 71⁽²²⁾ อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาในสตรีที่มีผลแปปสเมียร์ปกติของประเทศอื่น ๆ โดยพบสอดคล้องกันอย่างน้อย 2 ไทป์ กล่าวคือ การศึกษาในประเทศฝรั่งเศสพบไทป์ 16, 53, 51, 31 และ 61⁽²³⁾ หรือในประเทศสหรัฐอเมริกาที่พบไทป์ 16, 53, 52 และ 31 มากตามลำดับ⁽²⁴⁾

การศึกษาครั้งนี้ได้เน้นศึกษาในสตรีไทยที่มีผลแปปสเมียร์ปกติเพื่อให้ได้ข้อมูลความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งปากมดลูกในสตรีปกติ และเป็นการสำรวจข้อมูลเบื้องต้นในพื้นที่ซึ่งมีข้อมูลอุบัติการณ์มะเร็งปากมดลูกที่ใกล้เคียงกัน ทำให้การบริหารจัดการตัวอย่าง ความเชี่ยวชาญในการเก็บตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกและการวินิจฉัยผล การขนส่งตัวอย่าง สามารถดำเนินการได้เหมือนกันทั้ง 4 แห่ง อย่างไรก็ตาม ควรมีการเพิ่มจำนวนตัวอย่างมากขึ้นในแต่ละพื้นที่โดยใช้ค่าความชุกที่ถูกต้องมากขึ้น เพื่อให้ได้จำนวนตัวอย่างที่เหมาะสม และได้ข้อมูลไทป์ที่ติดเชื้อมากขึ้น การขยายพื้นที่ศึกษาให้มากขึ้น โดยครอบคลุมทั้งพื้นที่ความเสี่ยงสูงและต่ำในการเกิดมะเร็งปากมดลูก อาจจะทำให้ได้ข้อมูลที่ช่วยสนับสนุนการป้องกันมะเร็งปากมดลูกของประเทศได้สมบูรณ์มากขึ้น

สรุป

การตรวจหาความชุกของการติดเชื้อและตรวจหาไทป์ของไวรัส HPV ในกลุ่มประชากรสตรีไทยปกติที่ครอบคลุมพื้นที่ทั้ง 4 ภูมิภาคของประเทศนั้น นอกจากจะเป็นประโยชน์ในการเลือกใช้วัคซีนที่เหมาะสมในการป้องกันไทป์ที่ระบาดในสตรีไทยแล้ว ยังอาจนำไปพิจารณาเพิ่มไทป์ของวัคซีนให้มีประสิทธิภาพครอบคลุมไทป์ที่ระบาดในประเทศต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. National Cancer Institute, Ministry of Public Health (Thailand). Cancer in Thailand Vol. IX, 2013-2015. [Online]. Available from: URL: [http://www.nci.go.th/th/File_download/Nci%20Cancer%20Registry/Cancer%20in%20Thailand%20IX_\(Unpublished%20Edition\)03.pdf](http://www.nci.go.th/th/File_download/Nci%20Cancer%20Registry/Cancer%20in%20Thailand%20IX_(Unpublished%20Edition)03.pdf).
2. Bruni L, Barrionuevo-Rosas L, Albero G, Serrano B, Mena M, Gomez D, et al. ICO/IARC Information Center on HPV and Cancer. Human papillomavirus and related diseases in the world. Summary report 27 July 2017. [Online]. Available from: URL: <https://hpvcentre.net/statistics/reports/XWX.pdf>.
3. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. J Clin virol 2005; 32(Suppl 1): S16-S24.
4. Wentzensen N, Schiffman M, Dunn ST, Zuna RE, Walker J, Allen RA, et al. Grading the severity of cervical neoplasia based on combined histopathology, cytopathology, and HPV geno-type distribution among 1700 women referred to colposcopy in Oklahoma. Int J Cancer 2009; 124(4): 964-9.
5. Dunne EF, Unger ER, Sternberg M, McQuillan G, Swan DC, Patel SS, et al. Prevalence of HPV infection among females in the United States. JAMA 2007; 297(8): 813-9.
6. Bosch FX, de Sanjose S. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of; causality. J Natl Cancer Inst Monogr 2003; (31): 3-13.
7. Braaten KP, Laufer MR. Human papillomavirus (HPV), HPV-related disease, and the HPV vaccine. Rev Obstet Gynecol 2008; 1(1): 2-10.
8. Signorelli C, Odone A, Ciorba V, Cella P, Audicio RA, Lombardi A, et al. Human papilloma-virus 9-valent vaccine for cancer prevention: a systematic review of the available evidence. Epidemiol

- Infect 2017; 145(10): 1962-82.
9. Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Munoz N, Snijders PJ, Vaccarella S, et al. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the international agency for research on cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet* 2005; 366: 991-8.
 10. de Sanjose S, Diaz M, Castellsague X, Clifford G, Bruni L, Munoz N, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2007; 7(7): 453-9.
 11. Bruni L, Diaz M, Castellsague X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjose S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis* 2010; 202(12): 1789-99.
 12. Allan B, Marais DJ, Hoffman M, Shapiro S, Williamson AL. Cervical human papillomavirus (HPV) infection in South African women: implications for HPV screening and vaccine strategies. *J Clin Microbiol* 2008; 46(2): 740-2.
 13. Pista A, de Oliveira CF, Cunha MJ, Paixao MT, Real O. Prevalence of human papillomavirus infection in women in Portugal: the CLEOPATRE Portugal study. *Int J Gynecol Cancer* 2011; 21(6): 1150-8.
 14. Zhao FH, Zhu FC, Chen W, Li J, Hu YM, Hong Y, et al. Baseline prevalence and type distribution of human papillomavirus in healthy Chinese women aged 18-25 years enrolled in a clinical trial. *Int J Cancer* 2014; 135: 2604-11.
 15. Kantathavorn N, Mahidol C, Sritana N, Sricharunrat T, Phoolcharoen N, Auewarakul C, et al. Genotypic distribution of human papillomavirus (HPV) and cervical cytology findings in 5906 Thai women undergoing cervical cancer screening programs. *Infect Agent Cancer* 2015; 10: 7.
 16. Chopjitt P, Ekalaksananan T, Pientong C, Kongyingyoes B, Kleebkao P, Charoensri N. Prevalence of human papillomavirus type 16 and its variants in abnormal squamous cervical cells in Northeast Thailand. *Int J Infect Dis* 2009; 13(2): 212-9.
 17. Swangvaree SS, Kongkaew P, Rugsuj P, Saruk O. Prevalence of high-risk human papillomavirus infection and cytologic result in Thailand. *Asian Pac J Cancer Prev* 2010; 11(6): 1465-8.
 18. Chansaenroj J, Lurchachaiwong W, Termrungruanglert W, Tresukosol D, Niruthisard S, Trivijitsilp P, et al. Prevalence and genotypes of human papillomavirus among Thai women. *Asian Pac J Cancer Prev* 2010; 11(1): 117-22.
 19. Marks MA, Gupta S, Liaw KL, Tadesse A, Kim E, Phongnarisorn C, et al. Prevalence and correlates of HPV among women attending family-planning clinics in Thailand. *BMC Infect Dis* 2015; 15: 159. (11 p.).
 20. Anderson L, O'Rorke M, Jamison J, Wilson R, Gavin A. Prevalence of human papillomavirus in women attending cervical screening in the UK and Ireland: new data from northern Ireland and a systematic review and meta-analysis. *J Med Virol* 2013; 85(2): 295-308.

21. Agarossi A, Ferrazzi E, Parazzini F, Perno CF, Ghisoni L. Prevalence and type distribution of high-risk human papillomavirus infection in women undergoing voluntary cervical cancer screening in Italy. *J Med Virol* 2009; 81(3): 529-35.
22. Lurchachaiwong W, Junyangdikul P, Payungporn S, Sampatanukul P, Chansaenroj J, Tresuko-sol D, et al. Human papillomavirus genotypes among infected Thai women with different cytological findings by analysis of E1 genes. *New Microbiol* 2011; 34(2):147-56.
23. Casalegno JS, Benchaib M, Le Bail Carval K, Piaton E, Mathevet P, Mekki Y. Human papillomavirus genotype distribution among French women with and without cervical abnormalities. *Int J Gynecol Obstet* 2011; 114(2): 116-9.
24. Ralston HE, Li Z, McGlennen RC, Hellerstedt WL, Downs LS. Type-specific prevalence and persistence of human papillomavirus in women in the United States who are referred for typing as a component of cervical cancer screening. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 200(3): 245.e1-7.

Prevalence of Human papillomavirus (HPV) Infection and Genotypes in Thai Women with Normal Cervical Cytology

Thumwadee Tangsiriwatthana¹ Sukjai Pholampaisathit² Anchalee Chainual³
Krongthip Boonsom⁴ Sangkom Vittayanant⁵ Somkhid Thichak⁶ Prissana Wongveerakhant⁷
Yavamal Sutivigit⁸ Jaruan Thongnark¹ Pilailuk Akkpaiboon Okada² Somrat Lertmaharit⁹
and Somchai Sangkitporn²

¹Khon Kaen Hospital, Amphoe Mueang, Khon Kaen 40000 ²Department of Medical Science, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000 ³Nakornping Hospital, Amphoe Mae Rim, Chiang Mai 50180 ⁴Songkhla Hospital, Amphoe Mueang, Songkhla 90000 ⁵Regional Medical Sciences Center 3, Nakhonsawan 60000 ⁶Regional Medical Sciences Center 1 Chiang Mai, Amphoe Mae Rim, Chiang Mai 50180 ⁷Regional Medical Sciences Center 7 Khon Kaen, Amphoe Mueang, Khon Kaen 40000 ⁸Regional Medical Sciences Center 12 Songkhla, Amphoe Mueang Songkhla 90000 ⁹Chulalongkorn University, Phyathai Road, Pathumwan, Bangkok 10330 Thailand.

Abstract Cervical cancer, caused by Human Papillomaviruses (HPV) infection, is the second most common cancer in Thai women. HPV vaccination is an effective prevention measure, however, information on HPV infection prevalence and circulating HPV types is limited. We, therefore, aimed to survey HPV prevalence in Thai women with normal cytology at Nakornping Hospital, Khon Kaen Hospital, Lopburi cancer Hospital and Songkla Hospital located in 4 regions of the country. A total of 487 women attending a cervical screening program at each hospital were recruited into the survey during 2014–2016. All were screened for cervical cancer by Liquid-based Pap test and for HPV DNA by Real-time Polymerase Chain Reaction (Real-time PCR) technic. It was found that 14 of 487 (2.9%) women showed abnormal cytology while 473 (97.1%) had normal cytology results. Real-time PCR results demonstrated HPV infections in 98 of 473 cases (20.7%). HPV types with high and low risks of infection were found at the percentages of 12.1 and 5.5, respectively. Additionally, mixed infections were also found at the percentage of 3.4. The common high risk types were HPV 16 (17.5%) followed by HPV 66 (11.3%), HPV 52 (10.0%) and HPV 53 (10.0%), while the common low risk types were HPV 42 (20.8%), HPV 6 (15%), HPV 40 (15%) and HPV 54 (13%). In our survey, most HPV-infected women were less than 30 years of age. The infection was statistically significant lower in higher age groups. Moreover, we found that more than one sexual partner as well as low income were major risk factors leading to HPV infections. Our data could be useful for further development of new HPV vaccines suitable for Thai women.

Keywords: human papillomavirus, prevalence, HPV type

การประเมินคุณภาพของชุดน้ำยาตรวจแอนติเจน ของไวรัสตับอักเสบบีแบบรวดเร็วในประเทศไทย

เกรียงศักดิ์ ฤชุศาสตร์¹ จงกลนี วงศ์ปิยะบวร² ลัดดาวัลย์ เทียมสิงห์¹ ชลธิชา กาวิดำ¹ สุทธิวัฒน์ ลำไย¹
เพทาย อุ่นผล¹ สุนิดา วานเดอลาร์² ปิยะ วงศ์จำปา² วิไล เฉลิมจันทร์¹ และสมชาย แสงกิจพร¹

¹กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

²จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

บทคัดย่อ การตรวจ Hepatitis B surface antigen (HBsAg) ในเลือด ใช้ค้นหาเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (Hepatitis B virus, HBV) เพื่อช่วยสนับสนุนการวินิจฉัยโรค การตรวจสถานะภาพก่อนได้รับวัคซีน และการคัดกรองหาเชื้อ HBV ในเลือดผู้บริจาค การศึกษานี้เป็นการประเมินคุณสมบัติของชุดตรวจ HBsAg แบบรวดเร็วที่มีจำหน่ายในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2559 จำนวน 11 ผลิตภัณฑ์ ที่มีรูปแบบเป็นตลับ (cassette) หรือแถบ (strip) การวิเคราะห์ความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของชุดตรวจแต่ละชนิดโดยใช้ชุดตัวอย่างซึ่งผ่านการทดสอบ HBsAg ด้วยเครื่องอัตโนมัติ 2 วิธี จำนวน ทั้งหมด 350 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ตัวอย่างผลบวกและผลลบ 150 และ 200 ตัวอย่างตามลำดับ สำหรับการศึกษาค่าความไวเชิงวิเคราะห์ของชุดตรวจ ใช้สารมาตรฐานจาก 2nd WHO International Standard เพื่อวิเคราะห์ปริมาณต่ำสุดของ HBsAg ที่สามารถตรวจได้ (Limit of Detection: LOD) ผลการศึกษา พบว่าที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (95% CI) ชุดน้ำยาตรวจหา HBsAg แบบรวดเร็วมีค่าความไวอยู่ในช่วงร้อยละ 98.0-98.67 (95% CI: ร้อยละ 94.29-99.63) ค่าความจำเพาะร้อยละ 100 (95% CI: ร้อยละ 98.12-100) และค่าความถูกต้องร้อยละ 99.14-99.43 โดยมีค่า LOD อยู่ในช่วง 0.52-8 IU/ml ตามเกณฑ์ ขององค์การอนามัยโลก และ International Consortium for Blood Safety ชุดตรวจทั้งหมดผ่านเกณฑ์การประเมินสำหรับการวินิจฉัยโรค แต่ไม่ผ่านเกณฑ์การตรวจคัดกรองในเลือดบริจาค แสดงว่าชุดตรวจหา HBsAg แบบรวดเร็วสามารถนำมาใช้ในการวินิจฉัยเบื้องต้น แต่ไม่สามารถนำมาใช้ตรวจคัดกรองเลือดบริจาคได้

Corresponding author E-mail: kriangsak.r@dmsc.mail.go.th

Received: 29 November 2018

Revised: 29 May 2019

Accepted: 24 June 2019

บทนำ

โรคตับอักเสบบีจากไวรัสตับอักเสบบี (Hepatitis B virus, HBV) ก่อให้เกิดปัญหาทางสาธารณสุขทั่วโลก ในปี พ.ศ. 2544 (ค.ศ. 2001) องค์การอนามัยโลกประมาณสถานการณ์ว่ามีผู้ติดเชื้อกว่า 2,000 ล้านคน ในจำนวนนี้ ประมาณ 350 ล้านคน เป็นพาหะเรื้อรัง และคาดการณ์ว่าผู้ติดเชื้ออย่างน้อย 1 ล้านคน อาจมีการดำเนินของโรค เป็นโรคตับแข็งและมะเร็งตับในที่สุด⁽¹⁾ อย่างไรก็ตามปี พ.ศ. 2558 (ค.ศ. 2015) Schweitzer A. และคณะรายงาน จำนวนผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังลดลงกล่าวคือ มีประมาณ 248 ล้านคน และรายงานการศึกษาในประเทศไทย พบว่า มีผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังลดลงเช่นกัน คือมีประมาณ 4.2 ล้านคน หรือร้อยละ 6.4⁽²⁻⁴⁾

ผู้รับเชื้อไวรัสตับอักเสบบีส่วนใหญ่มักไม่ค่อยมีอาการทางคลินิกเมื่อได้รับเชื้อในวัยเด็ก โดยเฉพาะอย่างยิ่งได้ รับเชื้อจากการดามารุก ในขณะที่หนึ่งในสามของผู้ติดเชื้อในวัยผู้ใหญ่จะเกิดอาการเฉียบพลัน⁽⁵⁾ สำหรับผู้ที่เป็นพาหะ ไวรัสตับอักเสบบีบางรายพบอยู่ในระยะที่มีไวรัสเพิ่มจำนวนมาก (high replicative phase หรือ productive phase) คือ มี Hepatitis B surface antigen (HBsAg), HBV-DNA และ Hepatitis B e antigen (HBeAg) ในเลือด แต่บางรายอยู่ในระยะที่ไวรัสเพิ่มจำนวนน้อย (low replicative หรือ restricted phase) คือมี HBsAg และ HBV-DNA ในเลือดในระดับต่ำ ไม่พบ HBeAg แต่พบ anti-HBe เพราะมีแอนติบอดีต่อ HBeAg ในเลือด (seroconversion) ผู้ป่วยบางรายกลายเป็นผู้ติดเชื้อซ่อนเร้น (Occult infection) คือ การเพิ่มจำนวนไวรัสลดลง จนตรวจไม่พบ HBsAg ในเลือด ยังคงพบ HBV DNA และบางรายอาจมีอาการตับอักเสบบีโดยไม่สามารถขจัด HBeAg และไม่พบ anti-HBe (abortive seroconversion) ซึ่งหากเกิดบ่อยทำให้เซลล์ตับถูกทำลายมากขึ้น⁽⁶⁾

การตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบบีโดยการตรวจ HBsAg สามารถตรวจพบได้ภายใน 2 ถึง 8 สัปดาห์ ภายหลังจากการติดเชื้อ ก่อนที่ระดับเอนไซม์ Alanine amino transaminase (SGPT), และ Aspartate amino transaminase (SGOT) ในเลือดสูงขึ้นกว่าปกติ 5-100 เท่า (มากกว่า 500 เท่า ในรายที่ติดเชื้อเฉียบพลัน) และ อาจพบ Bilirubin สูงขึ้น การตรวจด้วยชุดทดสอบ HBsAg ที่มีในปัจจุบันใช้หลักการจับกันของแอนติเจน-แอนติบอดี (antigen-antibody binding) และมีหลายรูปแบบ ได้แก่ (1) เทคนิค Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA), หรือ Enzyme-Linked Fluorescent Assays (ELFA) (2) เทคนิค Immuno Chromatography (IC) โดยเฉพาะในชุดทดสอบแบบให้ผลรวดเร็ว (Rapid test) เช่น Dip-sticks หรือ Test strip เป็นต้น⁽⁷⁾

ข้อมูลการประเมินชุดน้ำยาโดย International Consortium for Blood Safety (ICBS)⁽⁸⁾ ในชุดน้ำยา 70 ชนิด ที่มีจำหน่ายทั่วโลก พบว่ามีความไวร้อยละ 94.52-100 และความจำเพาะร้อยละ 96.37-100 สำหรับประเทศไทย สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทยในพระอุปถัมภ์ฯ ร่วมกับสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวง สาธารณสุข ได้ประเมินชุดตรวจ 21 ผลิตภัณฑ์ ที่มีจำหน่ายในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2546 ประกอบด้วย ชุดตรวจ ที่อ่านด้วยเครื่องมือ (machine-based) จำนวน 10 ผลิตภัณฑ์ และชุดทดสอบแบบให้ผลรวดเร็ว (rapid assay) จำนวน 11 ผลิตภัณฑ์ พบว่าชุดตรวจที่อ่านด้วยเครื่องมือมีความไวและความจำเพาะมากกว่าร้อยละ 99 ในขณะที่ ชุดทดสอบแบบให้ผลรวดเร็วมีความไวร้อยละ 97-99 และความจำเพาะร้อยละ 96-100⁽⁹⁾

จากการที่องค์การอนามัยโลกแนะนำให้ใช้ชุดน้ำยาอ้างอิงจาก 2nd WHO International Standard (IS) and Reference Panel for HBsAg เพื่อหาความไวเชิงวิเคราะห์ (Analytical sensitivity) และกำหนดให้ค่า HBsAg เป็น International units (IU) แทนหน่วยนาโนกรัม (Nanogram, ng)⁽¹⁰⁾ นั้น ชุดตรวจ HBsAg แบบให้ผลรวดเร็ว ในรูปแบบต่าง ๆ ที่มีการนำเข้าเพื่อจำหน่ายในประเทศไทยยังไม่มีค่าปริมาณต่ำสุดที่ตรวจ HBsAg ได้ จึงได้ทำการประเมิน เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นของประสิทธิภาพชุดตรวจ HBsAg ที่ให้ผลเร็ว และอ่านผลด้วยตาเปล่า (HBsAg RDTs)

วัสดุและวิธีการ

ชุดผลิตภัณฑ์

ชุดตรวจ HBsAg แบบรวดเร็วในการประเมินครั้งนี้ เป็นวิธี Lateral flow chromatographic immunoassay ที่ใช้หลักการทดสอบเป็นวิธี Sandwich ทั้งหมด 11 ผลิตภัณฑ์ แบ่งตามรูปแบบ เป็น 2 ชนิด คือ (1) รูปแบบตลับ (cassette) มี 6 ผลิตภัณฑ์ และ (2) รูปแบบแถบ (strip) มี 5 ผลิตภัณฑ์ ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยชุดทดสอบได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทตัวแทนจำหน่ายในประเทศไทย 7 บริษัท

ตารางที่ 1 รายละเอียดชุดทดสอบ HBsAg แบบรวดเร็วที่ใช้ศึกษา

Product name	Manufacturer	Test format	Test structure	Cat. No.	Lot No.
ABON One Step HBsAg Rapid Test (Strip)	ABON Biopharm (Hangzhou) Co. Ltd., P.R.China	Rapid	Sandwich	IHBsg-301	BSG6020001
ABON One Step HBsAg Rapid Test Device (Cassette)				IHsg-302C	BSG6020003
ALERE Determine HBsAg (Strip)	Alere Medical Co. Ltd., Japan	Rapid	Sandwich	7D2543	69934K100A
ASAN Easy Test HBs (Cassette)	ASAN Pharmaceutical Co. Ltd., Korea	Rapid	Sandwich	AM5225-K	P7006
Blue CROSS One Step HBsAg Test (Strip)	Blue Cross Bio-Medical (Beijing) Co. Ltd., P.R.China	Rapid	Sandwich	-	20151201
Blue CROSS One Step HBsAg Test (Cassette)					20150201
BOSON HBsAg Rapid Test (Cassette)	Xiamen Boson Biotech Co. Ltd., P.R.China	Rapid	double antibody-sandwich	1H01C2	14070103
CTK: OnSite HBsAg Rapid Test (Cassette)	CTK Biotech, Inc., USA	Rapid	Sandwich	R0040C	F1205L8G00
HEALGEN HBSAg Rapid Test (Strip)	Healgen, USA	Rapid	Sandwich	GCHBsg-301a	1511024
SD Bioline HBsAg Fast One Step HBsAg (strip)	Standard Diagnostics., Korea	Rapid	Sandwich	01FK12	RST16001
SD Bioline HBsAg (Cassette)				01FK10	RDT16001

ตัวอย่างศึกษา

ตัวอย่างทดสอบ : ซีรัมหรือพลาสมาของผู้ป่วยที่สงสัยว่าเป็นโรคตับอักเสบบีจากไวรัส ซึ่งเข้ามารับการรักษา ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จำนวน 4,000 ตัวอย่าง ระหว่างพฤศจิกายน พ.ศ. 2558 ถึงมีนาคม พ.ศ. 2559 นำมาตรวจหา HBsAg ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติจาก Architect (Abbott GmbH & Co. KG Wiesbaden, Germany) และสุ่มตรวจ HBsAg ซ้ำด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติจาก Elecsys E411 HBsAg (Roche diagnostic, Germany) แล้วคัดเลือกเพื่อใช้ในการประเมินชุดทดสอบได้จำนวน 350 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นตัวอย่างที่ให้ผล HBsAg เป็นบวกจำนวน 150 ตัวอย่าง และให้ผล HBsAg เป็นลบจำนวน 200 ตัวอย่าง และสำหรับตัวอย่างที่ให้ผลบวก HBsAg ทั้ง 2 เครื่องตรวจอัตโนมัติ นำมาตรวจยืนยันซ้ำอีกครั้ง ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ mini VIDAS (VIDAS HBsAg Ultra Confirmation, bio Merieux SA, France) จากนั้นแบ่งบรรจุในหลอดทดลองละ 500 ไมโครลิตร และเก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปศึกษาต่อไป

การศึกษาครั้งนี้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รหัส 592/58

สารมาตรฐาน : 2nd WHO International Standard, NIBSC code: 03/262 (Medicines and Healthcare products Regulatory Agency, UK) ใช้ในการศึกษาความไวเชิงวิเคราะห์ โดยวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจนที่ต่ำสุด (Limit of detection: LOD) ของแต่ละผลิตภัณฑ์ เจือจางสารมาตรฐานด้วยซีรัมที่ตรวจไม่พบ HBsAg, Anti-HBs, HBV-DNA, HCV-RNA และ HIV-RNA จนได้ความเข้มข้นเท่ากับ 8.25, 2.06, 0.52, 0.13 IU/ml แล้วแบ่งบรรจุในหลอดทดลองละ 500 ไมโครลิตร และเก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปศึกษาต่อไป

สารควบคุม : ซีรัมหรือพลาสมาของตัวอย่างทดสอบที่ให้ผลบวกอ่อน (weakly positive) และผลลบจากการตรวจด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ นำมาแบ่งบรรจุหลอดทดลองละ 500 ไมโครลิตร และเก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปศึกษาต่อไป

วิธีการทดสอบ

การประเมินชุดผลิตภัณฑ์ : นำชุดตัวอย่างทดสอบมาละลายที่อุณหภูมิห้อง ผสมให้เข้ากันและปั่นด้วยความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วนำส่วนใสมาทดสอบภายใน 2 ชั่วโมง โดยทดสอบแต่ละผลิตภัณฑ์ตามเอกสารกำกับที่มาของชุดตรวจ ทำการทดสอบด้วยชุดตัวอย่างทดสอบไม่เกินครั้งละ 10 ราย และอ่านผลด้วยตาเปล่าด้วยผู้ปฏิบัติงาน 2 ราย หากการอ่านผลไม่ตรงกันหรือไม่ชัดเจน ทำการทดสอบใหม่ซ้ำโดยผู้ปฏิบัติงานรายที่ 3 และอ่านผลอย่างน้อย 2 ราย ผลที่ได้ถือเป็นผลสุดท้าย แต่ละรอบการประเมินมีการใช้สารควบคุมคุณภาพผลบวกและผลลบร่วมด้วย

การประเมินความไวเชิงวิเคราะห์ของชุดผลิตภัณฑ์: ทดสอบด้วยสารมาตรฐานที่เตรียมไว้ 4 ระดับ แต่ละระดับทดสอบ 3 ซ้ำ โดยทำการทดสอบและอ่านผลเช่นเดียวกับการทดสอบด้วยชุดตัวอย่างทดสอบ กำหนดค่า LOD คือระดับที่ได้ผลบวกสอดคล้องกันทั้ง 3 ซ้ำ

การวิเคราะห์ผล

วิเคราะห์ผลโดยคำนวณความไว (Sensitivity), ความจำเพาะ (Specificity), ค่าความถูกต้อง (Accuracy), ค่าทำนายผลบวก (Positive Predictive Value, PPV) และค่าทำนายผลลบ (Negative Predictive Value, NPV)⁽¹¹⁾ ตามตารางที่ 2 โดยกำหนดความชุก (Prevalence) ตามกลุ่ม คือ 0.1% (กลุ่มผู้บริจาคโลหิต), 5.0% (กลุ่มผู้ป่วยทั่วไป) และ 10% (กลุ่มผู้ติดยาชนิดฉีดเข้าเส้น)⁽¹²⁾

ตารางที่ 2 พารามิเตอร์สำหรับใช้คำนวณหาความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity)

ผลการทดสอบ	โรค		รวม
	เป็น	ไม่เป็น	
ผลบวก (Positive)	ผลบวกจริง (TP) a	ผลบวกปลอม (FP) b	a+b
ผลลบ (Negative)	ผลลบปลอม (FN) c	ผลลบจริง (TN) d	c+d
รวม	a+c	b+d	a+b+c+d

โดยคำนวณตามสูตร ดังนี้

ความไว (Sensitivity) (%) = $a/(a+c) \times 100$

ความจำเพาะ (Specificity) (%) = $d/(b+d) \times 100$

ค่าความถูกต้อง (Accuracy) (%) = $a+d/N \times 100$

ค่าทำนายผลบวก (Positive predictive value)

$$PPV = \frac{(\text{prevalence})(\text{sensitivity})}{(\text{prevalence})(\text{sensitivity}) + (1 - \text{prevalence})(1 - \text{specificity})}$$

ค่าทำนายผลลบ (Negative predictive value)

$$NPV = \frac{(1 - \text{prevalence})(\text{specificity})}{(1 - \text{prevalence})(\text{specificity}) + (\text{prevalence})(1 - \text{sensitivity})}$$

ผล

จากการประเมินชุดผลิตภัณฑ์ทดสอบ HBsAg แบบรวดเร็วจำนวน 11 ผลิตภัณฑ์ พบว่ามีความไวร้อยละ 98.00–98.67 ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% CI อยู่ในช่วงร้อยละ 94.29–99.63 และมีความจำเพาะร้อยละ 100 ที่ 95% CI อยู่ในช่วงร้อยละ 98.12–100

ค่าความถูกต้องอยู่ในช่วงร้อยละ 99.14–99.43 ค่าทำนายผลบวกสำหรับกลุ่มบริจาคโลหิต (ความชุก 0.1%) กลุ่มผู้ป่วยทั่วไป (ความชุก 5%) และกลุ่มผู้ติดยาเสพติดชนิดฉีดเข้าเส้น (ความชุก 10%) มีค่าเป็น 1 ส่วนค่าทำนายผลลบสำหรับกลุ่มบริจาคโลหิต มีค่าอยู่ในช่วง 0.99998–0.99999 กลุ่มผู้ป่วยทั่วไป มีค่าอยู่ในช่วง 0.99895–0.99930 และกลุ่มผู้ติดยาเสพติดชนิดฉีดเข้าเส้น มีค่าอยู่ในช่วง 0.99778–0.99852 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการประเมินชุดผลิตภัณฑ์ HBsAg แบบรวดเร็ว

ปัจจัยของการประเมิน	ผลการประเมิน										
	Cassette					Strip					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
ตรวจไม่พบ (n=200)	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
ตรวจพบ (n=150)	148	148	148	148	147	147	148	148	148	148	148
ผลลบปลอม	2	2	2	2	3	3	2	2	2	2	2
ผลบวกปลอม	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ค่าทำนายผลบวก											
- กลุ่มผู้บริจาคโลหิต	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
- กลุ่มผู้ป่วยทั่วไป	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
- กลุ่มผู้ติดยาชนิดฉีดเข้าเส้น	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ค่าทำนายผลลบ											
- กลุ่มผู้บริจาคโลหิต	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999	0.9998	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999
- กลุ่มผู้ป่วยทั่วไป	0.9993	0.9930	0.9930	0.9930	0.9989	0.9995	0.9930	0.9930	0.9930	0.9930	0.9930
- กลุ่มผู้ติดยาชนิดฉีดเข้าเส้น	0.9985	0.9985	0.9985	0.9985	0.9978	0.9978	0.9985	0.9985	0.9985	0.9985	0.9985
ค่าความถูกต้อง (%)	99.43	99.43	99.43	99.43	99.14	99.14	99.43	99.43	99.43	99.43	99.43
ความจำเพาะ (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% CI											
ระดับบน (upper)	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
ระดับล่าง (lower)	98.12	98.12	98.12	98.12	98.12	98.12	98.12	98.12	98.12	98.12	98.12
ความไว (%)	98.67	98.67	98.67	98.67	98.00	98.00	98.67	98.67	98.67	98.67	98.67
ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% CI											
ระดับบน (upper)	99.63	99.63	99.63	99.63	99.32	99.32	99.63	99.63	99.63	99.63	99.63
ระดับล่าง (lower)	95.27	95.27	95.27	95.27	94.29	94.29	95.27	95.27	95.27	95.27	95.27
ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบ (IU/ml)	2	0.52	2	4	8	8	2	0.52	2	4	2

จากการทดสอบด้วยสารมาตรฐานจาก 2nd WHO International Standard ที่เจือจาง 4 ระดับ พบว่า LOD ของชุดผลิตภัณฑ์ทดสอบอยู่ในช่วง 0.52–8 IU/ml ชุดทดสอบที่มี LOD ต่ำสุดคือ ชุดทดสอบที่ 2 และ 8 (0.52 IU/ml) ขณะที่ชุดทดสอบ 5 และ 6 มีค่า LOD สูงกว่าชุดทดสอบอื่น (8 IU/ml) (ตารางที่ 3)

วิจารณ์

จากแนวทางปฏิบัติที่แนะนำการใช้ชุดทดสอบแบบรวดเร็ว 2 วิธีช่วยสนับสนุนผลการตรวจพบ HBsAg ได้⁽¹³⁾ ทั้งนี้ขึ้นกับความชุกของการติดเชื้อในประชากร นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับจีโนไทป์ (Genotype) ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ที่มีการกระจายตัวในแต่ละพื้นที่ของประเทศไทย⁽¹⁴⁾ ดังนั้นคุณภาพของชุดทดสอบจึงมีความสำคัญเพื่อการเลือกใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ปัจจุบันชุดน้ำยาตรวจ HBsAg แบบรวดเร็วที่มีจำหน่ายในประเทศไทย นำเข้าจากต่างประเทศโดยตัวแทนจำหน่ายแตกต่างกันไป ซึ่งขณะนี้ประเทศไทยยังไม่มีเครื่องมือแพทย์ชุดตรวจที่เกี่ยวข้องกับตับอักเสบบี การประเมินครั้งนี้นอกจากทราบความไว ความจำเพาะแล้ว ยังเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่มีค่าความไวเชิงวิเคราะห์หรือ LOD ที่ทราบคุณสมบัติในการตรวจจับปริมาณ HBsAg ต่ำสุดของชุดทดสอบที่มีจำหน่ายในปัจจุบัน

ผลการประเมินชุดทดสอบในการศึกษานี้ พบว่ามีความไวร้อยละ 98.0–98.7 สอดคล้องกับการศึกษาของสมาคมเทคนิคการแพทย์ในประเทศไทย ที่พบว่าชุดตรวจแบบรวดเร็วที่มีจำหน่ายใน พ.ศ. 2546 มีความไวร้อยละ 97–100⁽⁹⁾ จากการที่องค์การอนามัยโลกได้กำหนดเกณฑ์การประเมิน HBsAg โดยเฉพาะด้วย RDTs โดยให้มีความจำเพาะมากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 98.0⁽¹⁵⁾ ซึ่งทุกชุดทดสอบในการประเมินนี้มีความจำเพาะสูง (ร้อยละ 100) แสดงว่าชุดทดสอบแบบรวดเร็วทั้ง 11 ผลิตภัณฑ์ มีโอกาสเกิดผลบวกปลอมต่ำ

สำหรับการประเมินครั้งนี้พบผลลบปลอม ซึ่งอาจเกิดจากชุดตรวจด้วยเครื่องแบบอัตโนมัติที่นำมาใช้คัดกรองตัวอย่างศึกษามีค่า LOD เท่ากับ 0.072 IU/ml ขณะที่ค่า LOD ของชุดทดสอบแบบรวดเร็วมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 0.52 IU/ml จึงทำให้ไม่สามารถตรวจจับได้

การตรวจคัดกรองเบื้องต้นของกลุ่มบริจาคโลหิตนั้น องค์การอนามัยโลก และ ICBS กำหนดค่า LOD เท่ากับ ≤ 0.13 และ 0.02 IU/ml ตามลำดับ ดังนั้นชุดทดสอบ HBsAg แบบรวดเร็วที่ได้ประเมินนี้ไม่ผ่านเกณฑ์สำหรับใช้คัดกรองเลือดบริจาค ซึ่งในประเทศไทยแนวทางปฏิบัติระดับชาติไม่อนุญาตให้ใช้ชุดตรวจ HBsAg แบบรวดเร็วมาใช้คัดกรองเลือดบริจาค แต่ใช้เพื่อวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการโดยเฉพาะในกรณีที่ต้องการผลด่วน เพื่อพิจารณาการปฏิบัติการเบื้องต้นได้ทันทั่วทั้งที่ นอกจากนี้อาจเป็นทางเลือกในการสนับสนุนการตรวจ HBsAg ตามแนวทางปฏิบัติขององค์การอนามัยโลกในปี 2560 ที่แนะนำให้ใช้ชุดตรวจคัดกรองสองชุดที่มีหลักการแตกต่างกัน ในกรณีที่มีค่า HBsAg seroprevalence น้อยกว่าร้อยละ 0.4 ($< 0.4\%$) เพื่อลดความผิดพลาดที่จะเกิดขึ้น⁽¹³⁾ อย่างไรก็ตามควรปฏิบัติตามคู่มือการใช้อย่างเคร่งครัด นอกจากนี้ควรมีการควบคุมคุณภาพที่ดีและอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้ได้ผลตรวจสอบที่มีคุณภาพถูกต้องแม่นยำ ทั้งนี้ในการเลือกใช้ชุดทดสอบนอกจากคำนึงถึงความไว ความจำเพาะ และความแม่นยำแล้ว ยังต้องคำนึงถึงปัจจัยหลายอย่าง เช่น ความสะดวก ความง่าย ความรวดเร็ว รูปแบบต่าง ๆ ของชุดตรวจ ศักยภาพของผู้ปฏิบัติงาน ปริมาณงาน และบริการหลังการขาย เป็นต้น

สรุป

ชุดตรวจหา HBsAg แบบรวดเร็วทั้งหมด 11 ผลิตภัณฑ์ที่ได้ทำการประเมิน พบว่ามีความเหมาะสมสำหรับการคัดกรองเพื่อการวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการ แต่ยังไม่เหมาะสมสำหรับการคัดกรองในการให้เลือด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณญาติผู้ร่วมใจ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ตัวอย่างเลือดสำหรับการประเมิน ดร.บุษราวรรณ ศรีวรรณ ที่ให้คำปรึกษาบริษัทที่เป็นตัวแทนจำหน่ายในประเทศไทยทั้ง 11 ผลิตภัณฑ์ที่สนับสนุนชุดทดสอบ และกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้ทุนสนับสนุนการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization (WHO). Introduction of hepatitis B vaccine into childhood immunization services. Geneva, Switzerland: Department of Vaccines and Biologicals; 2001
2. Schweitzer A, Horn J, Mikolajczyk RT, Krause G, Ott JJ . Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013. Lancet 2015; 386: 1546-55.
3. Leroi C, Adam P, Khamduang W, Kawilapat S, Ngo-Giang-Huong N, Ongwandee S, et al. Prevalence of chronic hepatitis B virus infection in Thailand: a systematic review and meta-analysis. Int J Infect Dis 2016; 51: 36-43.
4. Poovorawan Y, Theamboonlers A, Vimolket T, Sinlaparatsamee S, Chaiear K, Siraprasasiri T, et al. Impact of hepatitis B immunisation as part of the EPI. Vaccine 2000; 19: 943-9.
5. Couroucé-Pauty AM, Plançon A, Soulier JP. Distribution of HBsAg subtypes in the world. Vox Sang 1983; 44(4): 197-211.
6. McMahon BJ. The natural history of chronic hepatitis B virus infection. Hepatology 2009; 49 (Suppl 5): S45-55.
7. El Khouri M, dos Santos VA. Hepatitis B: epidemiological, immunological, and serological considerations emphasizing mutation. Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo 2004; 59: 216-24.
8. International Consortium for Blood Safety (ICBS). HBV test kit evaluation results. [Online]. [cited 2017 Feb 10]; [3 screens]. Available from: URL: <http://www.icbs-web.org/page31.html>.
9. สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย, สำนักคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข. สํารวจและประเมินคุณภาพชุดน้ำยาตรวจแอนติเจนของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HBsAg) และการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (anti-HCV). วารสารเทคนิคการแพทย์ 2546; 31; 1-34.
10. Principles in the evaluation of HBsAg test kits: appropriate use of 2nd WHO International Standard (IS) and reference panel for HBsAg. [Online]. [cited 2017 Mar 14]; [4 screens]. Available from: URL: https://www.who.int/bloodproducts/publications/en/HBsAg_application_ECBS_2004.pdf

11. Blood Safety and Clinical Technology, World Health Organization. Hepatitis B surface antigen assays: operational characteristics. [Online]. [cited 2017 May 20]; [45 screens]. Available from: URL: https://www.who.int/diagnostics_laboratory/publications/hbsag_report1.pdf?ua=1 page 23.
12. Bretthorst GL. Lecture notes in statistics: bayesian spectrum analysis and parameter estimation. New York: Springer-Verlag; 1988. p.2, 5-13.
13. World Health Organization (WHO). Guidelines on hepatitis B and C testing. [Online]. Feb 2017 [cited 2018 Oct 10]; [204 screens]. Available from: URL: <https://www.who.int/hepatitis/publications/guidelines-hepatitis-c-b-testing/en/>
14. Louisirirochanakul S, Olinger CM, Arunkaewchaemsri P, Poovorawan Y, Kanoksinsombat C, Thongme C, et al. The distribution of hepatitis B virus genotypes in Thailand. *J Med Virol* 2012; 84(10): 1541-7.
15. World Health Organization (WHO). WHO performance evaluation acceptance criteria for HBsAg in vitro diagnostics in the context of WHO prequalification. [Online]. [cited 2018 Oct 10]; [4 screens]. Available from: URL: https://www.who.int/diagnostics_laboratory/evaluations/hepb/161125_who_performance_criteria_hbsag_ivd.pdf?ua=1.%20Accessed%2029%20January%202019;

Evaluation of HBsAg Rapid Test Kits in Thailand

Kriangsak Ruchusatsawat¹ Jongkonnee Wongpiyabovorn² Laddawan Thiemsing¹
Chonthicha Kawidam¹ Suttiwat Lumyai¹ Petai Unpol¹ Sunida Vandelaer²
Piya Wongchampa² Wilai Chalermchan¹ and Somchai Sangkitporn¹

¹Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000,

²Chulalongkorn University, Pathum Wan, Bangkok 10330, Thailand

Abstract Detection of Hepatitis B surface antigen (HBsAg) in blood, is useful for diagnosis of Hepatitis B virus (HBV) infection, determining needs for individual HBV immunization and screening for HBV in blood donors. In this study, we evaluated performance of HBsAg rapid test kits that were used in Thailand in 2016. A total of 11 products, manufactured in forms of either a cassette or a strip, were included to the study. Performance evaluation on sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) was examined using 150 and 200 known HBsAg positive and known HBsAg negative samples, respectively, as determined by 2 automatic machine-based HBsAg test kits. In addition, Limit of Detection (LOD), a parameter to determine analytical sensitivity, was evaluated using the 2nd WHO International Standard. Our results showed that, at 95% confidence level (95% CI), sensitivity was in a range of 98.0–98.67 (95% CI: 94.29–99.63%). Specificity was 100 percent (95% CI: 98.12–100 %). Accuracy was ranged from 99.14% to 99.43%. All test kits had LOD values between 0.52 to 8 IU/ml. According to WHO and International Consortium for Blood Safety criteria, performance of HBsAg rapid test kits passed the criteria for diagnosis only. Our findings suggested that HBsAg rapid test kits can be used for initial diagnosis but cannot be used for screening blood donors.

Keywords: HBsAg rapid test kits, sensitivity, specificity, limit of detection



ใบสมัครเป็นสมาชิก วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ชื่อ.....

ที่อยู่.....

อาชีพ.....

โทรศัพท์.....

ต้องการรับ วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เวลา 1 ปี (4 ฉบับ) เป็นเงิน 200.- บาท

ตั้งแต่ปี.....

พร้อมนี้ได้ส่ง

☐ ธนาณัติ

☐ ตัวแลกเงินไปรษณีย์

☐ เงินสด

ส่งจ่าย

นางสาวน้ำฝน น้อยประเสริฐ

ห้องสมุดกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ซอยโรงพยาบาลบำรุงราศนราดูล ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

โทร. 0-2589-9850-8 ต่อ 99339

E-mail.....

ส่งจ่าย ปณณ. กระทรวงสาธารณสุข รหัสไปรษณีย์ 11000

THE BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

The bulletin of the Department of Medical Sciences is an official publication of the Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. It is devoted to the dissemination of knowledge concerning medical sciences and the facilitation of co-operation among scientists.

Owner	Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health	
Administrative Advisor	Opart Karnkawinpong Somlerk Jeungsamarn	Phichet Banyati Somchai Sangkitporn
Technical Advisor	Prasert Thongcharoen Mayura Kusum Jongdee Wongpinairat Panadda Silva Teeranart Jivapaisarnpong	Amara Vongbuddhapitak Pimjai Naigowit Sumol Pavitranon Pranee ChavalitThumrong
Editor	Busarawan Sriwanthana	Department of Medical Sciences
Assistant Editor	Duanthanorm Promkhatkaew Suthon Vongsheree Apiwat Tawatsin	Kanokporn Atisook Wichuda Jariyapan Malinee Chittaganpitch
Editorial Board	Pilaipan Puthavathana Prasert Auewarakul Punnee Pitisuttithum Pathom Sawanpanyalert Pintip Pongpech Suchada Chaisawadi Danai Tiwawech Suwanna Charunut Salakchit Chutipongvivate Padet Siriyasatien Pornpimol Kongtip Srisurang Tantimavanich Nuanchawee Wetprasit Sunee Sirivichayakul Supanee Duangteraprecha Piyada Wangroongsarb Wantana Paveenkittiporn Duangpen Pattamadilok Triporn Wattananat	Siriraj Hospital, Mahidol University Siriraj Hospital, Mahidol University Mahidol University Office of the Permanent Secretary, Ministry of Science and Technology Chulalongkorn University King Mongkut's Institute of Technology Thonburi Naresuan University Huachiew Chalermprakiet University The Association of Medical Technologists of Thailand Chulalongkorn University Mahidol University Mahidol University Ramkhamhaeng University Chulalongkorn University Department of Medical Sciences Department of Medical Sciences Department of Medical Sciences Department of Medical Sciences Department of Medical Sciences
Administration	Namfon Noiprasert Prasan Julwong	Department of Medical Sciences Department of Medical Sciences
Subscription Rate	The Bulletin of the Department of Medical Sciences is published quarterly. Annual subscription rate is ฿ 200.00 for domestic and US.\$ 50.00 for all other countries.	
Office	Department of Medical Sciences 88/7 Soi Tiwanond 14, Tiwanond Rd., Nonthaburi 11000, Thailand. Tel. 0-2951-0000 Fax: 0-2951-1297	
Printed by	Aroonkarnpim Ltd., Part. 457/6-7 Phra Sumen Road, Bangkok 10200 Tel. 0-2282-6033-4	



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

เปิดใจ ใฝ่รู้ คู่คุณธรรม นำหลักวิชาการ มาตรฐานสากล
www.dmsc.moph.go.th