



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

วารสาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 63 ฉบับที่ 1 มกราคม - มีนาคม 2564 • Vol. 63 No. 1 January - March 2021



ISSN 0125-684X

E-ISSN 2697-4525

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จัดทำโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เพื่อเผยแพร่ผลงานวิชาการด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ทุกสาขา

เจ้าของ ปรึกษาด้านบริหาร	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข นพ.ศุภกิจ ศิริลักษณ์ นพ.พิเชฐ บัญญัติ นพ.บัลลังก์ อุปพงษ์ นพ.ปิยะ ศิริลักษณ์	
ที่ปรึกษาด้านวิชาการ	นางพิมพ์ใจ นัยโกวิท ดร.ปนัดดา ชิลวา ดร.บุษราวรรณ ศรีวรรณะ	ดร.สุมล ปวีตรานนท์ ดร.เดือนถนนอม พรหมขัติแก้ว
บรรณาธิการ รองบรรณาธิการ	ดร.อภิวัฏ ธวัชสิน ดร.ประไพ วงศ์สินคงม่น นางสิริภากร แสงกิจพร	ดร.เบญจวรรณ เพชรสุขศิริ
คณะบรรณาธิการ	ศ.เกียรติคุณ ดร.ไพฑูริย์ พุฒินะ ศ.ดร.นพ.ประเสริฐ เอื้อวรากุล ดร.दनัย ทิวาเวช ภญ.สุวรรณา จารุณช ดร.สลักจิต ชุตินพวิเวท ศ.ดร.นพ.เผด็จ สิริยะเสถียร ศ.ดร.พรพิมล กองทิพย์ รศ.ดร.ศรีสุรางค์ ตันติมาวานิช ดร.สุณี ศิริวิชัยกุล รศ.ดร.นวลฉวี เวชประสิทธิ์ รศ.ดร.พญ.ชนิตรา ธวัจจิตต์ รศ.ดร.พญ.พินทิพย์ พงษ์เพชร ดร.อุษาวดี ถาวร นายสุธน วงษ์ชัย นางวิษชุดา จริยะพันธุ์ ดร.สุภาณี ดวงธีรปรีชา ดร.ปิยะดา หวังรุ่งทรัพย์ ดร.วันทนา ปวีณกิตติพร	มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยนเรศวร มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยมหิดล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยรามคำแหง มหาวิทยาลัยมหิดล นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
ฝ่ายจัดการ	นางสาวน้ำฝน น้อยประเสริฐ นางสาวประสาน จุลวงษ์ นางสาวอภิมิน จิรพงศ์ธร นายนาวิ ศรีวรมย์	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 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	บริษัท ธนอรุณการพิมพ์ จำกัด 457/6-7 ถนนพระสุเมรุ แขวงบวรนิเวศ เขตพระนคร กรุงเทพฯ 10200 โทร. 0-2282-6033-4	

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 63 ฉบับที่ 1 มกราคม - มีนาคม 2564

Vol. 63 No. 1 January - March 2021

สารบัญ

หน้า

นิพนธ์ต้นฉบับ

- การทดสอบความเป็นพิษเรื้อรังทางปากของน้ำดีจระเข้สายพันธุ์ไทย
(*Crocodylus siamensis*) ในหนูแรท สายพันธุ์ Sprague Dawley 1
ภัสสรภรณ์ ศรีมังกรแก้ว กฤติกาญจน์ สุวรรณสโรช จินดาวรรณ สิริันทวีเนติ
วิน เขยชมศรี และสุดาวรรณ เขยชมศรี
- การปรับปรุงคุณภาพการให้บริการทดสอบทางห้องปฏิบัติการ 13
ของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ ด้วยระบบรายงานผลวิเคราะห์ออนไลน์
โลมไสล วงศ์จันทา วสุ บำรุงชัยชนะ กิตติชัย จันทร ปาริชาติ กัญญาบุญ และวิษญาดา วุฒิอดิเรก
- การเปรียบเทียบวิธีการเฝ้าระวังยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) 28
ในการควบคุมโรคไข้เลือดออก
จิราภรณ์ เสวะนา บุษราคัม สีนาคม และบุญเสริม อ่วมอ่อง
- วิธีลดปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผักและผลไม้ 38
รติยากร ศรีโคตร และวิชาดา จงมีวาสนา
- การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ค่าความแรงยา Pegfilgrastim 51
โดยวิธี Cell Proliferation
สมปอง ทรัพย์สุทธิภาสน์ จิรเดช ปัจฉิม สายวรุฬ จตุรกิตตินันท์ และสุภาพร ภูมิอมร
- การเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากเลือดสายสะดือด้วยอาหารเพาะเลี้ยง 63
ที่ใช้ซีรัมจากเลือดสายสะดือ
ศุภรัตน์ วิจิตรเวียงรัตน์ ศศิประภา ทองบพิตร สุภักดี จุลวิจิตรพงษ์ เพ็ญใจ วิชัยดิษฐ์
ภัสรา หากุหลาบ และทัศนีย์ เพิ่มไทย
- พื้นที่เสี่ยงโรคไข้เลือดออก: วิเคราะห์ผลจากการสำรวจกับดักยุงลายและข้อมูลผู้ป่วย 78
โรคไข้เลือดออกของประเทศไทยด้วยระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์
จิตติ จันทรแสง จริยา ครุฑบุตร ธัญญภักษ์ณ์ มากกรีน วรณิศา สืบสอาด เอกรัฐ เด่นชลชัย
สุวรรณภา นิลพนมชัย และอรุณญากร จันทรแสง

กลุ่มของยีนที่มีการเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ผิวและผิวหนังที่ไม่มีรอยโรคของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินเปรียบเทียบกับผิวหนังคนปกติ โดยวิธีเมทิลเลชันไมโครอะเรย์ เกรียงศักดิ์ อุชุศาสตร์ ลัดดาวัลย์ เทียมสิงห์ พรรณทิพา พรตเจริญ และจงกลนี วงศ์ปิยะบวร	92
การป้องกันควบคุมยุงพาหะโรคไข้เลือดออกแบบบูรณาการในพื้นที่เสี่ยงสูงของจังหวัดตรัง สุวรรณี ทรัพย์เจริญ โชติกา แก่นอินทร์ วารุณี เทพมณีรัตน์ ชวัญกมล ไกรสุทธิ จริยาภรณ์ ใบกอเต็ม และเกรียงศักดิ์ อุชุศาสตร์	107
การพัฒนากระบวนการรับรองคุณภาพของห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ในประเทศไทยสู่มาตรฐานสากล ISO 15189 สุรศักดิ์ หมื่นพล ภัทรวีร์ สร้อยสังวาลย์ ศิริพรรณ วงศ์วานิช และนัฐกาญจน์ ละเอียตดี	119
การวิเคราะห์โครงสร้างโปรตีนระดับสูงของยาโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยวิธี Circular Dichroism Spectroscopy พันธวิทย์ นทกุล และอนุรักษ เมืองสงวน	135
การพัฒนาโปรแกรม Image Measurement Viewer (IMV) เพื่อวัดค่าความเหลื่อมล้ำ ของลำรังสีเอกซ์กับลำแสงไฟของเครื่องเอกซเรย์ สุรัชย์ ตั้ยด่าง	146
รายงานจากห้องปฏิบัติการ	
การประเมินการได้รับสัมผัสไนไตรต์และไนเตรต จากการบริโภคผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ กิตติมา โสนะมิตร และเอกสิทธิ์ เดชานุวัตติ	160
การสำรวจวัดค่าความเข้มข้นแม่เหล็กไฟฟ้าจากสถานีฐานระบบโทรศัพท์เคลื่อนที่ ในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล อริณญา พงศธรพิศุทธิ์ และอภิชนันท์ คงธนะ	173
การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและ Related Proteins ในยาฟิลแกรสติม โดยโครมาโตกราฟีเหลวความดันสูงแบบผันกลับ สุรินทร์า หลานวงศ์ สายวรุฬ จตุรกิตตินันท์ และสุภาพร ภูมิอมร	184
การศึกษาความถูกต้องวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดีต่อ Filamentous Haemagglutinin ในซีรัมหนูถีบจักรที่ฉีดวัคซีนไกรณชนิดไรเซลล์โดย ELISA อภิชัย ศุภสารสาทร รัชชานนท์ รักชีพ อัจจรรย อาเมน วิริยามาตย์ เจริญคุณธรรม และสุภาพร ภูมิอมร	195

กรณีศึกษา

- กรณีศึกษา: การสอบสวนผู้ป่วยและผู้เสียชีวิตโรคเมลิออยโดสิส 209
จังหวัดสงขลา มกราคม 2563

หทัยทิพย์ จุทอง อารีย์ ตาหมาด และนัจมี หลีสหัต

บทความปริทัศน์

- ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยาของกัญชา 219

ศรายุทธ ระดาพงษ์ พราว ศุภจรรย์วัตร และเมธิน ผดุงกิจ

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 63 ฉบับที่ 1 มกราคม - มีนาคม 2564

Vol. 63 No. 1 January - March 2021

CONTENTS

Page

Original Articles

- The Chronic Oral Toxicity Testing of Siamese Crocodile
(*Crocodylus siamensis*) Bile in Sprague Dawley Rats** 1
*Passaraporn Srimangkornkaew Kittigan Suwannasaroj Jindawan Siruntawineti
Win Chaeychomsri and Sudawan Chaeychomsri*
- Improvement of Laboratory Service of Regional Medical
Science Center 3 Nakhonsawan with Online Laboratory Reporting System** 13
*Lomsalai Wongchanta Wasu Bumrungrachaichana Kittichand Juntorn
Parichat Kanyaboon and Wichayada Woothiadirek*
- Comparison of Surveillance Methods for *Aedes aegypti* for
Dengue Haemorrhagic Fever Control** 28
Jiraporn Sevana Bussarakum Sinakom and Boonserm Aumaung
- Minimizing Pesticide Residues in Fruits and Vegetables** 38
Rattiyakorn Srikote and Wischada Jongmeewasna
- Development of Pegfilgrastim Potency Testing by Cell Proliferation** 51
*Sompong Sapsutthipas Jiradej Patchim Saiwarul Jadoonkittinan
and Supaporn Phumiamorn*
- Expansion of Cord Blood Mesenchymal Stem Cell Using Culture
Medium Supplemented with Umbilical Cord Serum** 63
*Suparat Wichitwiengrat Sasiprapa Thongbopit Suphakde Julavijitphong
Piengchia Vichaidith Pussara Hakularb and Tatsanee Phermthai*
- Dengue Risk Areas for Thailand from *Aedes* Ovitrap Survey
and Dengue Cases Analysis with Geographic Information System** 78
*Chitti Chansang Jariya Krutbut Thanyapak Makruen Wannisa Suebsaard
Ekarat Denchonchai Suwannapa Ninphanomchai and Uruyakorn Chansang*

	Page
Global DNA Methylated Gene of Involved Skin and Uninvolved Skin of Psoriasis Compared with Normal Skin by Methylation Microarray <i>Kriangsak Ruchusatsawat Laddawan Thiemsing Phantipa Protjaroen and Jongkonnee Wongpiyabovorn</i>	92
Integrated Prevention and Control of Dengue Haemorrhagic Fever Vectors in High Risk Areas in Trang <i>Suwandee Sapcharoen Chotika Kanin Warunee Thepmaneerat Kwankamon Kraiut Jariyaporn Baikodem and Kriangsak Ruchusatsawat</i>	107
Development of Accreditation Program for Thai Medical Laboratories in Compliance with ISO 15189 <i>Surasak Muenphon Patravee Soisangwan Siripan Wongwanich and Nattakarn Laieddee</i>	119
Higher Order Analysis of Protein Structure of Therapeutic Monoclonal Antibody by Circular Dichroism Spectroscopy <i>Puntawit Natakul and Anurak Muangsaguan</i>	135
Development of Image Measurement Viewer (IMV) Program to Measure Difference between X-ray Beam and Light Beam of X-ray Machine <i>Surachai Tuiduang</i>	146
Laboratory Findings	
Exposure Assessment of Nitrite and Nitrate from the Meat Products Consumption <i>Kittima Sonamit and Ekkasit Dechanuwat</i>	160
Surveying to the Measurement of Electromagnetic Field Intensity from Mobile Phone Base Stations in Bangkok and Perimeter <i>Arinya Pongsathornpisuth and Apichanan Kongthana</i>	173
Analytical Method Validation for Determination of Protein and Related Protein Content in Filgrastim by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography <i>Surintra Lahnwong Saiwarul Jadoonkittinan and Supaporn Phumiamorn</i>	184

Analytical Method Validation of ELISA for Quantification of Mouse Antibody Titer Against Filamentous Haemagglutinin of Acellular Pertussis Vaccine	195
<i>Apichai Supasansatorn Ratchanon Rakcheep Assjan Amen Wereyamarst Jaroenkunathum and Supaporn Phumiamorn</i>	

Case Study

An Investigation of Confirmed Melioidosis Case and Death in Songkhka Province January 2020	209
<i>Hataitip juthong Aree tamad and Nutjamee Leesahud</i>	

Review Articles

Pharmacological and Toxicological Effects of Cannabis	219
<i>Sarayut Radapong Praw Suppajariyawat and Methin Phadungkit</i>	



บรรณาธิการแถลง



วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ฉบับนี้ เป็นฉบับประจำปีที่ 63 ฉบับที่ 1 เดือนมกราคม - มีนาคม 2564 ได้รับความสนใจอย่างมากจากนักวิชาการในการส่งบทความตีพิมพ์เผยแพร่ โดยมีเนื้อหาของบทความวิชาการจำนวนมาก และหลากหลายประเภท ประกอบด้วยนิพนธ์ต้นฉบับ จำนวน 12 เรื่อง ที่เกี่ยวข้องกับงานทางด้านมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ยีนและเซลล์ต้นกำเนิด กัญญาวิทยาทางการแพทย์ พืชวิทยาและรังสีวิทยา รายงานจากห้องปฏิบัติการ จำนวน 4 เรื่อง ซึ่งเกี่ยวข้องกับงานทางด้าน การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ การประเมินการได้รับสัมผัส สารเคมีจากอาหาร และการสำรวจความเข้มข้นแม่เหล็กไฟฟ้าจากสถานีฐานระบบโทรศัพท์เคลื่อนที่ นอกจากนี้ยังมีกรณีศึกษาเกี่ยวกับการสอบสวนโรคเมลิออยโดสิส และบทความปริทัศน์เกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยาของกัญชา

กองบรรณาธิการวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ขอขอบคุณผู้สนับสนุนทุกท่านที่ส่งบทความมาให้พิจารณา ตีพิมพ์เผยแพร่องค์ความรู้และงานวิจัย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการปฏิบัติงานด้านการพัฒนาสาธารณสุขของประเทศ ขอขอบพระคุณผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่าน ที่ได้พิจารณาบทความ (Peer reviews) และให้ข้อเสนอแนะในการปรับปรุง แก้ไขบทความวิจัยต่างๆ ให้มีความถูกต้องทางวิชาการและอ่านได้เข้าใจง่ายขึ้น และขอขอบพระคุณบุคลากร สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่มีส่วนในการจัดทำวารสารฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี หวังเป็นอย่างยิ่ง ว่าวารสารฉบับนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับผู้อ่านในการเสริมสร้างองค์ความรู้ทางด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ และสาธารณสุข และโปรดติดตามความรู้และงานวิจัยจากวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ฉบับที่ 2 เดือน เมษายน - มิถุนายน 2564 ต่อไป

ดร.อภิวัฏ วัชรสิน

บรรณาธิการวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

คำแนะนำสำหรับผู้นิพนธ์

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์รับตีพิมพ์เผยแพร่บทความ เพื่อสนับสนุนและส่งเสริมการสร้างสรรค์ความรู้ใหม่ด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่เกี่ยวกับชีววัตถุ เครื่องมือแพทย์ เครื่องสำอาง ยาที่เป็นเภสัชเคมีภัณฑ์ อาหารและเครื่องดื่ม สมุนไพร ยาเสพติด วัตถุอันตราย รังสี โรคติดต่อ โรคไม่ติดต่อ พาหะนำโรค การประเมินความเสี่ยง การวิจัยทางคลินิก ระบบบริหารจัดการคุณภาพ และอื่น ๆ โดยกำหนดตีพิมพ์วารสารปีละ 4 ฉบับ เป็นรายไตรมาส ได้แก่ 1) ฉบับเดือนมกราคม-มีนาคม 2) ฉบับเดือนเมษายน-มิถุนายน 3) ฉบับเดือนกรกฎาคม-กันยายน และ 4) ฉบับเดือนตุลาคม-ธันวาคม

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เริ่มเผยแพร่ทางระบบออนไลน์เท่านั้น ตั้งแต่ฉบับเดือนตุลาคม-ธันวาคม 2562 เป็นต้นไป

ประเภทของบทความ

บทความสามารถเขียนได้ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ โดยแบ่งบทความออกเป็นประเภทต่าง ๆ ดังนี้

1. นิพนธ์ต้นฉบับ

เป็นรายงานผลการศึกษาวิจัย พัฒนาเทคโนโลยี หรือพัฒนาระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการที่มีการวางรูปแบบ และดำเนินการศึกษาวิจัยพัฒนาตลอดจนวิเคราะห์ข้อมูลอย่างถูกต้องตามหลักวิชาการ ประกอบด้วย ชื่อเรื่อง ชื่อเรื่องโดยย่อ ชื่อผู้นิพนธ์พร้อมสังกัด บทคัดย่อ คำสำคัญ บทนำ วัสดุและวิธีการ ผล วิเคราะห์ สรุป กิตติกรรมประกาศ และเอกสารอ้างอิง ความยาวทั้งหมดไม่เกิน 25 หน้าขนาดกระดาษ A4

2. รายงานจากห้องปฏิบัติการ

เป็นรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการที่มีผู้นำตัวอย่างมาส่งตรวจ หรือรายงานผลการดำเนินงานที่เป็นงานประจำ ประกอบด้วย ชื่อเรื่อง ชื่อเรื่องโดยย่อ ชื่อผู้นิพนธ์พร้อมสังกัด บทคัดย่อ คำสำคัญ บทนำ วัสดุและวิธีการ ผล วิเคราะห์ สรุป กิตติกรรมประกาศ และเอกสารอ้างอิง ความยาวทั้งหมดไม่เกิน 25 หน้าขนาดกระดาษ A4

3. บทความปริทัศน์

เป็นบทความที่ได้จากการทบทวนหรือรวบรวมความรู้วิชาการเรื่องใดเรื่องหนึ่งจากตำรา วารสาร วิชาการ หรือหนังสือต่าง ๆ ทั้งในและต่างประเทศ นำมาวิเคราะห์วิจารณ์ หรือเปรียบเทียบ เพื่อให้ได้บทความใหม่ที่มีความเห็นของผู้นิพนธ์และทำให้เกิดความชัดเจนในเรื่องนั้น ประกอบด้วย ชื่อเรื่อง ชื่อเรื่องโดยย่อ

ชื่อผู้พิมพ์พร้อมสังกัด บทคัดย่อ คำสำคัญ บทนำ วิธีการสืบค้นข้อมูล เนื้อหา วิเคราะห์ สรุป กิตติกรรมประกาศ และเอกสารอ้างอิง ความยาวทั้งหมดไม่เกิน 20 หน้าขนาดกระดาษ A4

4. บทความทั่วไป

เป็นบทความทางวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวกับการพัฒนาระบบงานด้านการแพทย์และสาธารณสุข เช่น รายงานการพัฒนาระบบสนับสนุนการปฏิบัติงาน การพัฒนาระบบเทคโนโลยีสารสนเทศ หรือการพัฒนา ระบบบริหารจัดการคุณภาพตามมาตรฐานสากล เป็นต้น ประกอบด้วย ชื่อเรื่อง ชื่อเรื่องโดยย่อ ชื่อผู้พิมพ์ พร้อมสังกัด บทคัดย่อ คำสำคัญ บทนำ วัสดุและวิธีการ ผล วิเคราะห์ สรุป กิตติกรรมประกาศ และเอกสาร อ้างอิง ความยาวทั้งหมดไม่เกิน 15 หน้าขนาดกระดาษ A4

5. บทความพิเศษ

เป็นบทความที่เป็นความรู้หรือข้อคิดเห็นทั่วไป เกี่ยวกับสถานการณ์ปัจจุบันที่น่าสนใจทางการแพทย์ และสาธารณสุขในระดับประเทศหรือระดับนานาชาติ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องประกอบด้วย ชื่อเรื่อง ชื่อเรื่องโดยย่อ ชื่อผู้พิมพ์พร้อมสังกัด บทคัดย่อ คำสำคัญ บทนำ เนื้อหา วิเคราะห์ สรุป กิตติกรรมประกาศ และเอกสารอ้างอิง ความยาวทั้งหมดไม่เกิน 15 หน้าขนาดกระดาษ A4

6. กรณีศึกษา

เป็นรายงานเกี่ยวกับการสอบสวนโรคในกลุ่มตัวอย่างขนาดเล็ก หรือการวินิจฉัยผู้ป่วยรายที่น่าสนใจ ที่มีการตรวจทางห้องปฏิบัติการร่วมด้วย ที่อาจอยู่ภายใต้ตัวแปรที่ควบคุมได้ หรือสภาพแวดล้อมที่ไม่สามารถ ควบคุมได้ ประกอบด้วย ชื่อเรื่อง ชื่อเรื่องโดยย่อ ชื่อผู้พิมพ์พร้อมสังกัด บทคัดย่อ คำสำคัญ บทนำ วัสดุ และวิธีการ ผล วิเคราะห์ สรุป กิตติกรรมประกาศ และเอกสารอ้างอิง ความยาวทั้งหมดไม่เกิน 10 หน้า ขนาดกระดาษ A4

7. จดหมายถึงบรรณาธิการ

เป็นบทความที่ผู้อ่านวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์เขียนถึงบรรณาธิการหรือเจ้าของบทความ ที่ตีพิมพ์ในวารสารฯ แล้ว ทั้งนี้เพื่อเสนอแนะหรือแสดงข้อคิดเห็นเกี่ยวกับวารสารฯ หรือบทความนั้น ๆ

8. บทความวิจัยอย่างสั้น

เป็นรายงานวิจัยที่ดำเนินการแล้วเสร็จซึ่งมีประเด็นการศึกษาไม่มาก แต่มีรายละเอียดครบถ้วน ตามหลักเกณฑ์ของงานวิจัย หรือเป็นรายงานการศึกษาวิจัยอย่างย่อโดยอาจเป็นข้อมูลที่ศึกษาเพิ่มเติมจาก รายงานการศึกษาวิจัยที่ได้เคยตีพิมพ์แล้ว หรืออาจเป็นการรายงานผลการศึกษางานบางส่วนที่อยู่ในความสนใจ

ของสาธารณะหรือตอบปัญหาที่เกิดขึ้นในขณะนั้น ประกอบด้วย ชื่อเรื่อง ชื่อเรื่องโดยย่อ ชื่อผู้นิพนธ์ พร้อมสังกัด บทคัดย่อ (ไม่เกิน 100 คำ) คำสำคัญ บทนำ (อย่างย่อ) วัสดุและวิธีการ (โดยย่อ) ผล วิจารณ์ สรุป กิตติกรรมประกาศ และเอกสารอ้างอิง ความยาวทั้งหมดไม่เกิน 10 หน้าขนาดกระดาษ A4 ทั้งนี้ตาราง และ/หรือภาพรวมกันมีจำนวนทั้งหมดไม่เกิน 2 ตาราง/ภาพ

การพิจารณาบทความ

บทความทุกเรื่องจากผู้นิพนธ์เสนอขอรับตีพิมพ์ต้องไม่เคยตีพิมพ์ หรือกำลังตีพิมพ์ในวารสารอื่น คณะบรรณาธิการที่ได้รับมอบหมายจะตรวจสอบความสมบูรณ์ของบทความในเบื้องต้น ก่อนส่งพิจารณาตรวจ แก่แบบไม่เปิดเผยตัวตน (double-blinded peer review) จากผู้เชี่ยวชาญในสาขาที่เกี่ยวข้อง อย่างน้อย 2 คน โดยบรรณาธิการเป็นผู้พิจารณาคัดเลือกผู้เชี่ยวชาญ และหากจำเป็นอาจคัดเลือกผู้เชี่ยวชาญคนที่ 3 พิจารณาบทความบทความเพิ่มเติม บรรณาธิการหรือรองบรรณาธิการเป็นผู้พิจารณาคำแนะนำของผู้เชี่ยวชาญ ทั้งหมด และแจ้งผลการพิจารณาแก่ผู้นิพนธ์ หลังจากผู้นิพนธ์แก้ไขอาจส่งให้ผู้เชี่ยวชาญพิจารณาตรวจสอบ อีกครั้ง โดยบรรณาธิการเป็นผู้ตรวจสอบบทความขั้นสุดท้ายก่อนส่งตีพิมพ์ ซึ่งกองบรรณาธิการ ขอสงวนสิทธิ์ ในการตรวจแก้ไขต้นฉบับและพิจารณาตีพิมพ์ตามลำดับก่อนหลัง

ความรับผิดชอบ

บทความที่ตีพิมพ์ในวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถือเป็นผลงานทางวิชาการ และเป็น ความเห็นส่วนตัวของผู้นิพนธ์ ไม่ใช่ความเห็นของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ หรือกองบรรณาธิการ ผู้นิพนธ์ ต้องรับผิดชอบต่อบทความของตน

จริยธรรมการวิจัย

กรณีบทความเป็นผลการศึกษาวิจัยในมนุษย์หรือใช้ตัวอย่างใด ๆ จากมนุษย์ การวิจัยนั้น ๆ ต้อง ผ่านการพิจารณาอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ของหน่วยงาน และกรณีที่เป็นผล การศึกษาวิจัยที่ใช้สัตว์ทดลอง การวิจัยนั้น ๆ ต้องผ่านการพิจารณาอนุมัติจากคณะกรรมการการเลี้ยงและ ใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของหน่วยงานเช่นกัน ถ้าหากไม่มี ต้องชี้แจงด้วย

การเตรียมต้นฉบับ

ภาษาที่ใช้คือ ภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ต้นฉบับภาษาไทย ควรใช้ภาษาไทยให้มากที่สุด คำศัพท์ เฉพาะหรือคำศัพท์ภาษาอังกฤษที่บัญญัติเป็นภาษาไทยแล้ว แต่ยังไม่เป็นที่ทราบกันอย่างแพร่หลาย หรือแปลแล้วเข้าใจยาก ให้ใส่ภาษาอังกฤษกำกับไว้ในวงเล็บ หรืออนุโลมให้ใช้ภาษาอังกฤษได้

ต้นฉบับพิมพ์ด้วยโปรแกรม Microsoft Word for Windows เท่านั้น และต้องไม่มี File protection ตั้งค่ากระดาษขนาด A4 ใช้ตัวอักษร TH Sarabun PSK ขนาด 16 ใส่เลขกำกับทุกหน้าและทุกบรรทัด โดยหน้าที 1 ประกอบด้วย ชื่อเรื่อง ชื่อและนามสกุลของผู้นิพนธ์ทั้งหมด หน่วยงานสังกัดของคณะผู้นิพนธ์ ชื่อเรื่องโดยย่อ (Running title) และชื่อพร้อมอีเมลผู้ประสานงาน (Corresponding author) กับคณะบรรณาธิการ หน้าที 2 และ 3 เป็นบทคัดย่อภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ตามลำดับ ความยาวไม่เกิน 300 คำ และระบุคำสำคัญท้ายบทคัดย่อ

1. ชื่อเรื่องและชื่อเรื่องโดยย่อ มีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษที่ชัดเจนและตรงกับประเด็นการศึกษา ไม่ใช่คำย่อ
2. ชื่อผู้นิพนธ์และผู้ร่วมนิพนธ์ ระบุชื่อและนามสกุลเต็มทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ไม่ต้องระบุตำแหน่งและคำนำหน้าชื่อ
3. ชื่อสังกัด/สถานที่ปฏิบัติงาน มีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษของหน่วยงานที่ผู้นิพนธ์สังกัด/ปฏิบัติงาน หากมีผู้นิพนธ์หลายรายและอยู่คนละสังกัด ให้กำกับด้วยตัวเลขเป็นตัวยก
4. บทคัดย่อ ต้องเขียนทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ความยาวไม่เกิน 300 คำ เนื้อหาครอบคลุมที่มาของการศึกษา วัตถุประสงค์ ขอบเขตการศึกษา วิธีทำหรือวิธีการรวบรวมข้อมูลที่สำคัญโดยย่อ แสดงผลการศึกษาเฉพาะข้อมูลหลักที่สำคัญและสถิติที่ใช้ (ถ้าจำเป็น) รวมถึงหลักการหรือองค์ความรู้สำคัญที่พบใหม่
5. คำสำคัญ ระบุคำสำคัญทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษไม่เกิน 3-5 คำ
6. บทนำ ควรกล่าวถึงหลักการเหตุผล ปัญหาหรือสมมุติฐาน ที่นำไปสู่ความจำเป็นที่ต้องศึกษา รวมทั้งวัตถุประสงค์ของการศึกษา การอ้างอิงควรเลือกใช้เฉพาะเอกสารอ้างอิงที่สำคัญและเป็นปัจจุบัน
7. วัสดุและวิธีการ แสดงรายละเอียดทางวิชาการเป็นเชิงพรรณนาที่มากพอเพื่อผู้อ่านที่สนใจสามารถทำงานนี้ซ้ำได้ เช่น กลุ่มตัวอย่างหรือข้อมูลที่ศึกษาวิธีสุ่มเก็บตัวอย่างหรือข้อมูล วิธีวิเคราะห์ตัวอย่างหรือข้อมูล วิธีการคำนวณหรือวิเคราะห์ข้อมูล และสถิติที่ใช้ เป็นต้น ให้ระบุบริษัทและประเทศผู้ผลิตของน้ำยา สารเคมี เครื่องมือรวมถึงรุ่นของเครื่องมือ หรือสายพันธุ์ของจุลชีพในส่วนที่เกี่ยวข้องโดยละเอียด

ทั้งนี้ บทบทความการศึกษาในมนุษย์หรือใช้ตัวอย่างจากมนุษย์ หรือการศึกษาที่ใช้สัตว์ทดลองให้ระบุชื่อคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ หรือคณะกรรมการการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ที่อนุมัติให้ทำการการศึกษา และหมายเลขอ้างอิงที่ได้รับอนุมัติ

8. ผล นำเสนอผลงานตามลำดับ หลีกเลี่ยงการใช้กราฟหรือภาพที่ไม่จำเป็น ถ้ามีตารางข้อมูล กราฟ หรือภาพให้เสนอพร้อมกับคำอธิบายที่มีเนื้อหาชัดเจนครบถ้วน และให้แยกออกจากเนื้อเรื่อง หน้าละ 1 รายการ โดยไม่ต้องใส่กรอบตารางหรือภาพที่ต้องการแสดง ภาพถ่าย (สีหรือขาวดำ) ที่มีความชัดเจนให้บันทึกภาพโดยใช้นามสกุล .jpg หากเป็นภาพวาดควรวาดบนกระดาษขาวอย่างดีด้วยหมึกดำลายเส้นคมและชัดเจน ระบุตำแหน่งที่ต้องการแสดงตารางหรือภาพไว้ในส่วนของเนื้อเรื่อง

9. **วิจารณ์** วิจารณ์สิ่งที่ค้นพบและควรเปรียบเทียบกับงานที่ผู้อื่นทำและเผยแพร่ไว้ก่อนหน้านี้แล้ว หรือวิเคราะห์และสรุปเปรียบเทียบกับสมมติฐานที่วางไว้ ว่าตรงหรือแตกต่างไปหรือไม่ อย่างไร เพราะเหตุใด ทั้งนี้ควรระวังไม่นำส่วนของผลมากล่าวซ้ำในส่วนนี้ หากจำเป็นต้องกล่าวถึงควรเขียนผลในภาพรวมที่สำคัญ และอาจเขียนถึงผลกระทบตามหลักวิชาการที่อาจเกิดขึ้นหรือการนำไปใช้ประโยชน์จากผลการศึกษาวิจัยนี้
10. **สรุป** เน้นสิ่งที่พบใหม่ที่สำคัญจากการศึกษานี้ และเชื่อมโยงการสรุปกับวัตถุประสงค์ ควรอภิปรายข้อจำกัด/ข้อบกพร่อง ข้อดีเด่น ซึ่งนำไปสู่ข้อเสนอแนะในเชิงนโยบาย ในทางปฏิบัติ และในการวิจัยต่อไป
11. **กิตติกรรมประกาศ** ระบุผู้สนับสนุน และ/หรือแหล่งทุนสนับสนุนการวิจัย
12. **เอกสารอ้างอิง** การอ้างอิงเอกสารในเนื้อเรื่องให้ใช้รูปแบบการอ้างอิงในแวนคูเวอร์ (Vancouver Citation Style) โดยใส่ตัวเลขตัวยก ในวงเล็บ วางไว้หลังข้อความหรือหลังชื่อบุคคล การเรียงลำดับเอกสารอ้างอิงเริ่มจาก “(1)” และเรียงเลขอื่น ๆ ต่อไปตามลำดับการอ้างอิงของเนื้อหา ส่วนเอกสารอ้างอิงท้ายเรื่องให้อ้างเฉพาะบทความที่ตีพิมพ์แล้วในสิ่งตีพิมพ์ปฐมภูมิเท่านั้น ผู้นิพนธ์ต้องรับผิดชอบในความถูกต้องของเอกสารอ้างอิง

การเขียนเอกสารอ้างอิง

การเขียนเอกสารอ้างอิงให้ใช้รูปแบบดังตัวอย่าง ผู้นิพนธ์ตั้งแต่ 1 ถึง 6 คน ให้ใส่ชื่อทุกคน ถ้ามีมากกว่า 6 คนให้ใส่ชื่อ 6 คนแรกตามด้วย และคณะ หรือ et al กรณีบทความไม่มีชื่อผู้นิพนธ์ให้ใช้ชื่อเอกสารแทนชื่อผู้นิพนธ์

1. การอ้างบทความวารสาร (Article in Journal)

วารสารภาษาไทย

ตัวอย่าง

สุภาวรรณ จงธรรมวัฒน์, บำรุง คงดี, วิชัย ประสาททอง, มณี เขม้นเขตรการ, จิราภรณ์ อ่ำพันธุ์, กมล ฝอยศิริชัย และคณะ. การสำรวจคุณภาพถุงยางอนามัยทั่วประเทศ. ว กรรมวิทย์ พ 2540; 39(2): 67-74.

วารสารภาษาอังกฤษ

ตัวอย่าง

Belshe RB, Coelingh K, Ambrose CS, Woo JC, Wu X. Efficacy of live attenuated influenza vaccine in children against influenza B viruses by lineage and antigenic similarity. Vaccine 2010; 28(9): 2149-56.

2. การอ้างอิงหนังสือหรือตำรา (Text/Guideline)

ตัวอย่าง

ธีระพร วุฒยวนิช, บรรณาธิการ. เทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์. เชียงใหม่: คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2546.

Greenberg AE, Clescri LS, Eaton AD, editors. Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th ed. Washington DC: American Public Health Association; 1992. p. 9-94.

3. การอ้างอิงเฉพาะบทในตำรา (Chapter in the text)

ตัวอย่าง

ทวีศักดิ์ แทนวันดี. การวินิจฉัยโรคตับจากไวรัสทางคลินิก. ใน: สิริฤกษ์ ทรงศิวิไล, บรรณาธิการ. ตับอักเสบจากไวรัส เล่ม 1. กรุงเทพฯ: บางกอกบล็อก; 2543. หน้า 281-309.

Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. p. 465-78.

4. การอ้างอิงกฎหมาย (Legal material)

ตัวอย่าง

พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 61 (พ.ศ. 2524) ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 98 ตอนที่ 157 (วันที่ 7 กันยายน 2524).

Preventive Health Amendments of 1993, Pub L No. 103-183, 107 Stat. 2226 (1993 Dec 14)

5. การอ้างอิงพิมพ์ขององค์กรหรือหน่วยงาน (Organization as author and publisher)

ตัวอย่าง

กรมสนับสนุนบริการสุขภาพ กระทรวงสาธารณสุข. แผนยุทธศาสตร์การดำเนินงานสุขภาพภาคประชาชน. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย; 2546.

Department of Medical Sciences. Guideline of method validation used in pharmaceutical analysis. Nonthaburi: Department of Medical Sciences; 1995.

Lamasil [package insert]. East Hanover (NJ): Sandoz Pharmaceuticals Corp; 1993.

6. การอ้างรายงานการสัมมนา/ประชุมวิชาการ (Conference paper/Conference Proceeding)

ตัวอย่าง

วิยะดา เจริญศิริวัฒน์. เอกสารการประชุมสัมมนาเฉลิมพระเกียรติเรื่อง การคัดกรองภาวะพร่อง ไทรอยด์ฮอร์โมนในทารกแรกเกิดเพื่อป้องกันปัญญาอ่อน. วันที่ 25 พฤศจิกายน 2542. นนทบุรี: กรม วิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2542.

Bengtsson S, Solheim BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun KC, Degoulet P, Piemme TE, Rienhoff O, editors. MEDIN-FO 92. Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics; 1992 Sep 6-10; Geneva, Switzerland. Amsterdam: North-Holland; 1992. p. 1561-5.

7. การอ้างวิทยานิพนธ์ (Dissertation)

ตัวอย่าง

มณี เขม้นเขตรการ. ผลของ N-acetylcysteine ต่อการป้องกันพิษของพาราควอตในหนูขาว [วิทยานิพนธ์]. ภาควิชาพิษวิทยา, คณะวิทยาศาสตร์. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2547.

Kaplan SJ. Post-hospital home health care: the elderly's access and utilization [dissertation]. St. Louis, (MO): Washington University; 1995.

8. การอ้างสื่ออิเล็กทรอนิกส์ (Electronic material)

วารสารออนไลน์ (Journal on Internet)

ตัวอย่าง

ชวนพิศ ยิ้มสมบัติ. การประเมินคุณภาพการตรวจหาเชื้อมาลาเรียบนฟิล์มโลหิตบางด้วย กล้องจุลทรรศน์. ว กรมวิทย์ พ [วารสารออนไลน์]. 2548; [สืบค้น 29 ก.ย. 2548]; 47(2): [8 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: <http://www.dmsc.moph.go.th/net/jms/>.

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. Emerg Infect Dis [serial online] 1995. Jan-Mar [cited 1996 Jun 5]; 1(1): [24 screens]. Available from: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>.

เว็บไซต์ (Website)

ตัวอย่าง

กรมควบคุมโรค. การป้องกันควบคุมโรคไข้หวัดนก Avian Influenza (Bird Flu). [ออนไลน์]. 2548; [สืบค้น 28 ก.ย. 2548]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: http://www.ddc.moph.go.th/Bird_Flu_main.html.

Hoffman DL. St John's Wort. [online]. [cited 1998 Jul 16]; [4 screens]. Available from: URL: <http://www.healthy.net/library/books/hoffman/materiamedica/stjohns.htm>.

การส่งต้นฉบับและการตอบรับบทความทางออนไลน์

ส่งต้นฉบับไฟล์บทความ ตาราง ภาพ และหนังสือแนบส่ง ผ่านทางระบบออนไลน์ได้ทาง <http://webapp1.dmsc.moph.go.th/journals> ทั้งนี้ผู้พิมพ์จะต้องสมัครเข้าเป็นสมาชิกในระบบก่อนดำเนินการส่งต้นฉบับ และจะได้รับการตอบรับอัตโนมัติเมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการ

คณะกรรมการจะแจ้งผู้ประสานงาน (Corresponding author) ทราบทางอีเมลถึงการตอบรับ หรือปฏิเสธการตีพิมพ์บทความ

การตรวจทานต้นฉบับก่อนเผยแพร่

ผู้พิมพ์ต้องตรวจพิสูจน์อักษรในลำดับสุดท้าย เพื่อให้ความเห็นชอบในความถูกต้องครบถ้วนของเนื้อหา

ปรับปรุง วันที่ 1 มกราคม 2564

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

The Bulletin of the Department of Medical Sciences welcomes the medical sciences articles in the areas of biological products, medical devices, cosmetics, pharmaceutical products, food and beverage, medicinal plants, narcotic drugs, hazardous substances, radiation, communicable diseases, non-communicable diseases, vectors of diseases, risk assessment, clinical researches, quality management systems, etc. The Bulletin is quarterly published: 1) January–March, 2) April–June, 3) July–September, and 4) October–December. The manuscripts can be submitted in either Thai or English.

The Bulletin of the Department of Medical Sciences will be published online-only from the issue of October–December 2019 onwards.

Types of journal manuscripts

1. Original article

Original article is the report of a study, technology development, or laboratory quality system development describing research question, details of methods as well as interpretation of results with discussion of possible implications. The manuscript should contain a title, a running title, the authors' names with affiliations, an abstract, keywords, introduction, materials and methods, results, discussion, conclusion, acknowledgements and references. The total length should not exceed 25 pages of A4 paper.

2. Laboratory findings

Laboratory findings are the report of the results of laboratory examinations. The manuscript should contain a title, a running title, the authors' names with affiliations, an abstract, keywords, introduction, materials and methods, results, discussion, conclusion, acknowledgements and references. The total length should not exceed 25 pages of A4 paper.

3. Review article

Review article is an article that summarizes the previously published studies as well as the current state of understanding on certain topics aiming to analyze or compare the concepts and introduce some clear perspectives on that matter. The manuscript should contain a title, a running title, the authors' names with affiliations, an abstract, keywords, introduction, how to review, content, discussion, conclusion, acknowledgements and references. The total length should not exceed 20 pages of A4 paper.

4. General article

General article is a scientific report related to medical and public health system development such as operation support, information technology, quality management, etc. The manuscript should contain a title, a running title, the authors' names with affiliations, an abstract, keywords, introduction, materials and methods, results, discussion, conclusion, acknowledgements and references. The total length should not exceed 15 pages of A4 paper.

5. Special article

Special article is a small article which cannot be categorized to types of articles mentioned above. It can be the author's opinions on any current or up-to-date issues. The manuscript should contain a title, a running title, the authors' names with affiliations, an abstract, keywords, introduction, content, discussion, conclusion, acknowledgements and references. The total length should not exceed 15 pages of A4 paper.

6. Case study

Case study is a report of study involving particular group or situation over a period of time in order to illustrate a principle. The manuscript should contain a title, a running title, the authors' names with affiliations, an abstract, keywords, introduction, materials and methods, results, discussion, conclusion, acknowledgements and references. The total length should not exceed 10 pages of A4 paper.

7. Letter to the editor

Letter to the editor is correspondences from readers to the editor or the authors providing different opinions or suggestions of recently published articles.

8. Short communications

Short communications are short papers that present original and significant material for rapid dissemination. The manuscript should contain a title, a running title, the authors' names with affiliations, an abstract (limited to 100 words), keywords, introduction, materials and methods, results, discussion, conclusion, acknowledgements and references. The total length should not exceed 10 pages of A4 paper with no more than 2 figures or tables, combined.

Publication process

Each article will be initially reviewed by the Editor and sent to at least 2 selected experts. The identities of both reviewers and authors throughout the review are concealed (double-blinded peer review). Comments from the experts will be considered by the Editor and sent to the author for revision. In some cases, more comments from the third expert is necessary. The editorial board reserves the right to edit any manuscripts for proper publication. The Editor will review the final draft of each article.

Responsibility

Articles published in this Bulletin represent the research activities or opinions of the authors, not the opinion of the editorial board or Department of Medical Sciences. The authors are responsible for its contents.

Research ethics

The clinical research and research involve human specimens must be approved by the Institutional Ethics Committee. The research that involves animals must be approved by the Institutional Animal Care and Use Committee.

Preparation of manuscripts

Both Thai and English manuscripts are acceptable. For Thai manuscript, the author should translate the English vocabulary to Thai as much as possible. In case of no official Thai words, having an English word in the parentheses is preferred. Manuscripts shall be prepared with Microsoft Word for Windows without file protection using 16-pt TH Sarabun PSK. Line numbers should be added on every page. The first page shall carry the title of the article, full names of authors with affiliations, a running title and corresponding author's email address. The second and third page shall carry an abstract both in Thai and English of no more than 300 words. Key words should be added after the abstract. The structure of original articles and laboratory findings should be in the order as following:

1. **Title (and running title):** The title should be short and represent the focus of the study and should not use abbreviations.
2. **Authors:** The full name of each author and email address of corresponding author should be submitted.
3. **Organization:** The organizational affiliation of each author should be in numerical order.

4. **Abstract:** The abstract should be written in both Thai and English, not exceed 300 words, and it should consist of rationales, objectives, methodology, and body of knowledge.
5. **Keywords:** 3-5 keywords in both Thai (effective from the volume of October-December 2019 onwards) and English should be provided.
6. **Introduction:** The introduction should provide the hypothesis or the rationale for the study as well as the objective(s) of the study. Give only pertinent references.
7. **Materials and Methods:** Give the full technical information so that the experiments can be repeated such as group of sample/study, sampling methodology, analysis methodology, statistical analysis, if used, etc. The sources of all materials and apparatus or strains of microorganisms must be provided if they have the potential impact to the study results.

For the clinical research, or research involves human specimens or animals, name of the ethics committee(s) or institutional review board(s) as well as the number/ID of the approval(s) must be stated.

8. **Results:** Present the results as concisely as possible in logical sequence. Avoid unnecessary graphs and figures. The tabular data, graphs, or figures, if needed, should be provided with clear description. Each table or figure should be prepared and described on a separate file. An electronic image should be prepared as .jpg file.
9. **Discussion:** Discuss study findings and provide interpretation of the results. The results may be interpreted in relation to other relevant studies. It should not contain extensive repetition of the results sections. The impact or benefit from the study may be elaborated.
10. **Conclusion:** Emphasize the new and important aspects of the study. Link the conclusions with the goals of the study.
11. **Acknowledgement:** A single-paragraphed acknowledging contributors, helps and financial support received in completing the work.
12. **References:** Use Vancouver styled references. Provide superscript numeric figure in parentheses after referred phrase or referred name (use 1 for the first reference and 2, 3 respectively). Use the same number for the same reference. Never use abbreviation in references except the author's first name initial and the journal title.

Writing references:

1. Journal Article

Example:

Belshe RB, Coelingh K, Ambrose CS, Woo JC, Wu X. Efficacy of live attenuated influenza vaccine in children against influenza B viruses by lineage and antigenic similarity. *Vaccine* 2010; 28(9): 2149–56.

2. Text/Guideline

Example:

Greenberg AE, Clescri LS, Eaton AD, editors. Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th ed. Washington DC: American Public Health Association; 1992. p. 9–94.

3. Chapter in the Text

Example:

Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. p. 465–78.

4. Legal material

Example:

Preventive Health Amendments of 1993, Pub L No. 103-183, 107 Stat. 2226 (1993 Dec 14)

5. Organization as Author and Publisher (Including pamphlet & Package Insert)

Example:

Pharmaceutical Society of Australia. Medicines and driving [pamphlet]. Pharmaceutical Society of Australia; 1998. DR-7.

Lamasil [package insert]. East Hanover (NJ): Sandoz Pharmaceuticals Corp; 1993.

6. Citing Conference Papers/Conference Proceedings

Example:

Bengtsson S, Solheim BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun KC, Degoulet P, Piemme TE, Rienhoff O, editors. MEDINFO 92. Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics; 1992 Sep 6–10; Geneva, Switzerland. Amsterdam: North-Holland; 1992. p. 1561–5.

7. Dissertation

Example:

Kaplan SJ. Post-hospital home health care: the elderly's access and utilization[dissertation]. St. Louis (MO): Washington University; 1995.

8. Electronic material

Journal on Internet

Example:

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. Emerg Infect Dis [serial online] 1995. Jan-Mar [cited 1996 Jun 5]; 1(1): [24 screens]. Available from: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>.

Website

Example:

Hoffman DL. St John's Wort. [online]. [cited 1998 Jul 16]; [4 screens]. Available from: URL: <http://www.healthy.net/library/books/hoffman/materiamedica/stjohns.htm>

Manuscripts submission

Register to submit article online at <http://webapp1.dmsc.moph.go.th/journals/>. All documents must be scanned and uploaded as attachments in the online submission system. All submissions will be acknowledged by the Editorial Board. Those unaccepted will also be notified. The Editorial Board reserves the right to edit any manuscripts for proper publication.

Final proof

The author should approve the final edited article in the process to confirm that he or she has read and concurred with of the whole content of the manuscript.

Revised date: January 1, 2021

The Chronic Oral Toxicity Testing of Siamese Crocodile (*Crocodylus siamensis*) Bile in Sprague Dawley Rats

Passaraporn Srimangkornkaew¹ Kittigan Suwannasaroj¹ Jindawan Siruntawineti²
Win Chaeychomsri² and Sudawan Chaeychomsri³

¹National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Nakhon Pathom 73170

²Department of Zoology, Faculty of Sciences, Kasetsart University, Bangkok 10900

³Central Laboratory and Greenhouse Complex, Kasetsart University, Kamphaen Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

ABSTRACT In Thailand, Siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*) is an economic animal and dried form of Siamese crocodile bile was used as traditional medicine and exported for a long time but safety information including toxicity testing is limited. For previous study, an oral acute and sub chronic toxicity study was conducted and the results showed that the Siamese Crocodile (*Crocodylus siamensis*) bile was classified in GHS category 4, the LD₅₀ cut off at 500 mg/kg body weight and the no observed adverse effect level (NOAEL) of Siamese crocodile bile was considered to be 250 mg/kg body, respectively. Nevertheless, the study to provide information the possible major toxic effects, indicate target organs and the possibility of accumulation and estimation of a no-observed-adverse-effect level (NOAEL) for a long enough period to realize for chronic effects have not been carried out. Therefore, this study was done to support information as above for Siamese crocodile bile in Sprague Dawley rats in compliance with OECD Guidelines for the testing of chemicals 452, Chronic Toxicity Studies. The Siamese crocodile bile was not shown treatment related mortality and clinical signs of toxicity in Sprague Dawley rats including the treatment-relates changes were not observed in necropsy findings and histopathological finding in both sexes based on a result. The significantly different results of hematological tests and clinical biochemistry tests were not considered as a treatment-related toxicity effect but these results were recovered in recovery period (28 days). Thus, the NOAEL of Siamese crocodile bile in chronic oral toxicity studies were considered to be 250 mg/kg body weight per day for Sprague Dawley rats.

Keywords: Crocodile bile, Chronic oral toxicity, OECD Guidelines 452, *Crocodylus siamensis*

Corresponding author E-mail: fscijws@ku.ac.th

Received: 14 August 2020

Revised: 14 January 2021

Accepted: 5 February 2021

Introduction

The crocodile product such as internal organ, blood, skin and hides can be sold at higher price than other animals that are allowed for commercial aquaculture farm.⁽¹⁾ Crocodile bile is by-product of the crocodile industry. In many countries such as China, Hong Kong and Taiwan *etc.*, people used crocodile bile for an ingredient of traditional medicine. Siamese crocodile bile was exported for a long time.⁽²⁾ Crocodile bile can be used for drugs solvent and treatment of sepsis, hemorrhage and trauma.⁽³⁾ The compositions of crocodile bile are 0.8% of Cholestanol, 68% of Coprocholic acid, 9% of Coprochenodeoxycholic acid and derivative includes; 10% of 3-oxo-7 α , 12 α -dihydroxy-5 β -cholestanoic acid, 8% of 3 α , 7 α , 12 α -trihydroxy-5 β cholestanoic acid, 7-oxo-3 α , 12 α -dihydroxy-5 β -cholestanoic acid, 3-oxo-7 α , 12 α -dihydroxy-5 α -cholestanoic acid, chenodeoxycholic acid, 5 α -cholestan-3 α , 7 α , 12 α , 26-tertrol, 5 β -cholestan-3 α , 7 α , 12 α , 25-tertrol, Ursodeoxycholic acid and 5 α -cholic acid.⁽⁴⁾ Ursodeoxycholic acid (UDCA) was used to be useful for treating chronic hepatic and gallstones disease.⁽⁵⁾ Moreover, bile acids are physiological detergents for intestinal nutrient absorption and biliary secretion of lipids, toxic metabolites, and xenobiotics.⁽⁶⁾ And it has been implicated in the regulation of all the key enzymes involved in cholesterol homeostasis.⁽⁷⁾ Toxic bile acids may cause inflammation, apoptosis, and cell death. Aqueous extracts from *Crocodylus siamensis* bile (AE-CB) had effect on cell growth, cell cycle and apoptosis of SMMC-7721 cells.⁽⁸⁾ Bile extract from crocodile gallbladder had inhibited cells growth significantly, and the cell cycle was arrested in G1 phase. Bile extract induced QBC939 cell apoptosis. These results provide significant insight into the anticarcinogenic action of bile extract on cholangiocarcinoma cell.⁽⁹⁾ For information of oral toxicity according to OECD Guidelines for the testing of chemicals 423⁽¹⁰⁾, Siamese crocodile bile was classified in GHS category 4 or estimated the LD50 cut off at 500 mg/kg body weight in Sprague Dawley rats.^(2, 11) However, long term study of oral toxicological of crocodile bile has been carried out of Siamese crocodile bile in Sprague Dawley rats in compliance with OECD Guidelines for the testing of chemicals 408, Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents only.^(12, 13) Therefore, the purpose of the present study is to provide information on the possible major toxic effects, indicate target organs and the possibility of accumulation and estimate of a no-observed-adverse-effect level (NOAEL) of Siamese crocodile bile in Sprague Dawley rats in compliance with OECD Guidelines for the testing of chemicals 452, Chronic Toxicity Studies.⁽¹⁴⁾

Materials and Methods

Collection of *Crocodylus siamensis* gall bladder

Gall bladders of Siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*) were collected from Ayutthaya crocodile farm, Tha Rua district, Phra Nakhon Si Ayutthaya, Thailand.

Preparation of dried *Crocodylus siamensis* bile

Process for dried Siamese crocodile bile production of Thai patent application No. 0901001231, Kasetsart University was performed as following. The gall bladders without fat tissue outside were surface sterile with 70% ethyl alcohol and the Siamese crocodile bile were collected in tray and freeze-drying using freeze dryer (Lyomaster, USA) for 36 hours. The freeze-dried bile was powdered by graining and stored in a sterilized and dry jar. The Siamese crocodile bile powder was kept at 4°C until further use.^(15, 16)

Dose preparation

The 3 dose levels of Dried Siamese crocodile bile were 2.5, 25 and 250 mg/kg body weight and freshly mixed with distilled water prior to administration.

Preparation of animals

Healthy 6-8 weeks, 100 male and 100 female, Sprague Dawley rats of body weight range 200 g $\pm$ 20% were obtained from Office of Laboratory Animal Production, National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Thailand. The animals were kept under standard conditions 12 hours light, 12 hours dark at 22 $\pm$ 3 °C and 30-70% relative humidity. The animals were housed in stainless steel cages with feed and 5-7 ppm chlorinated water ad libitum. All the animals were acclimatized for at least 5 days prior to the study. Guidelines of "Guide for the care and use of laboratory animals" were strictly followed throughout the study.⁽¹⁷⁾ The study was approved by National Laboratory Animal Center Animal Care and Use Committee (NLAC-ACUC), Mahidol University, Thailand, for all experimental protocols (RA2013-02).

Experimental design

The chronic oral toxicity studies were complied with OECD Guidelines for the testing of chemicals 452, Chronic Toxicity Studies.⁽¹⁴⁾

100 male and 100 female Sprague Dawley rats were used and randomized into 5 groups (20 animal per sexes per group). The 5 groups were consisted of group 1 - control group (vehicle control; distilled water), group 2 - low dose, group 3 - middle dose and group 4 - high dose (2.5, 25 and 250 mg/kg body weight of Siamese crocodile bile, respectively) and group 5 - satellite group (once daily at 250 mg/kg body weight of Siamese crocodile bile for 365 days and no administrated by gavage for the following 28 days). The Siamese crocodile bile was prepared with distilled water prior to administration. The dosage of administration by gavage for 365 days to each animal was calculated based on the body weight of animal prior to administrate at a constant volume not exceed 1 ml per 100 g body weight.

The animal health observations and mortality were observed outside the home cage at least once a day, at the same times. Animal body weights, feed and water consumption including signs of toxicity (general behavior, respiratory pattern, cardiovascular signs, motor activities, reflexes, and change in skin and fur) were performed weekly.

Necropsy examination

On the last day, all animals were kept for overnight (15–18 hours) fasting (feed but not water) prior to blood sample collection. The animals were euthanized using CO₂ inhalation.⁽¹⁸⁾ Blood samples were collected via cardiac puncture for hematological and clinical biochemistry analysis.

After blood samples collection, all animals were sacrificed. The positions, shapes, sizes and colours of internal organs were evaluated.⁽²⁾ Liver, kidneys, lung, heart and spleen were removed and trimmed to visually detect gross lesions and weighed to determine relative organ's weights per 100 g body weight. Histopathological examinations were performed on liver, kidneys, lung, heart and spleen and compared between control and high dose group.

Statistical analysis

Quantitative results were expressed as mean $\pm$ standard deviation. The obtained data were statistically analyzed by Kolmogorov–Smirnov and Levene's test⁽¹⁹⁾ for normality and homogeneity of variances. For parametric statistics, all data were compared between the vehicle control group and each treatment group by 2-sided Dunnett or Dunnett's T3 test, using ANOVA analysis. For non-parametric statistics, the data were compared between the vehicle control group and each treatment group by Mann Whitney U test. A significant differences were considered at 0.05 levels with SPSS[®] Statistic software version 18.0.0.

Results

The Siamese crocodile bile were not shown treatment related mortality and clinical signs of toxicity in Sprague Dawley rats. The feed and water consumptions including body weights of all animals that were measured throughout the study, were showed normal. The data of body weight was presented in Fig 1 and Fig 2 for male and female animal, respectively. Besides that, the clinical signs in their skin and fur, eyes and mucous membranes, respiratory and behavior pattern were not found in control and treatment groups of animals. The other observations as tremors, convulsions, salivation, diarrhea, lethargy, sleep and coma were not showed too. The result of hematological tests that shown in Table 1, at high dose group (250 mg/kg body weight of Siamese crocodile bile) have the means of platelet higher than the control group for both sexes within normal range for Sprague Dawley rats of National Laboratory Animal Center (NLAC) (1,069.0 $\pm$ 224.1). For clinical biochemistry test that presented in Table 2, at high dose group were higher than the control group for both sexes where male animals have high the mean of ALT (alanine amino transferase), AST (aspartate amino transferase) and ALP (alkaline phosphatase) but female animals have only high the mean of ALT (alanine amino transferase) and AST (aspartate amino transferase). Nevertheless, these effects of hematological and clinical biochemistry tests were able to recovery in 14 days.

The organ's weight was calculated in the relative weights per 100 g animal body weight that showed the relative weight was not related with dose level what used in this study, represented in Table 3.

For pathology in this study can divide two sections: gross/microscopic finding and macroscopic finding. In first section, the observation of male animal was found as watery diarrhea without any lesions of intestine, colon gas distension, thymus petechial hemorrhage, lung consolidation, hydronephrosis, simple cortical cyst contained with clearly fluid and proteinaceous plug. The observation of female animal was found gas distension in small intestine, subcutaneous mass at axillary area, petechial hemorrhage, calcification deposit a focal in renal medullar and hydrometra. In second section, the lesions of kidney, heart, liver, spleen and lung were observed in control and high dose group.

Kidney: glomerulosclerosis, focal inflammation, hyaline cast, tubular regenerative, tubular dilation, single to few glomerulonephritis, single to few glomerulo necrosis, focal tubular necrosis, predominate focal calcification and chronic progressive nephropathy (CPN).

Heart: various stage of cardiomyopathy and degenerative to necrosis.

Liver: various distribution of macrovesicle, micro vesicle fatty change, hepatocyte atrophy, giant cell infiltration, hepatocyte hypertrophy and focus eosinophilia.

Spleen: mesothelial hyperplasia and mild amyloidosis.

Lung: eosinophil accumulation frequency occur in perivascular and peribronchiole, histiocytosis, arterial calcification, foreign bodies, perivascular necrosis and osseous metaplasia. These lesions were noted incidental finding, congenital defect, spontaneous, ageing lesion and the effect of carbon dioxide euthanization.⁽²⁰⁾

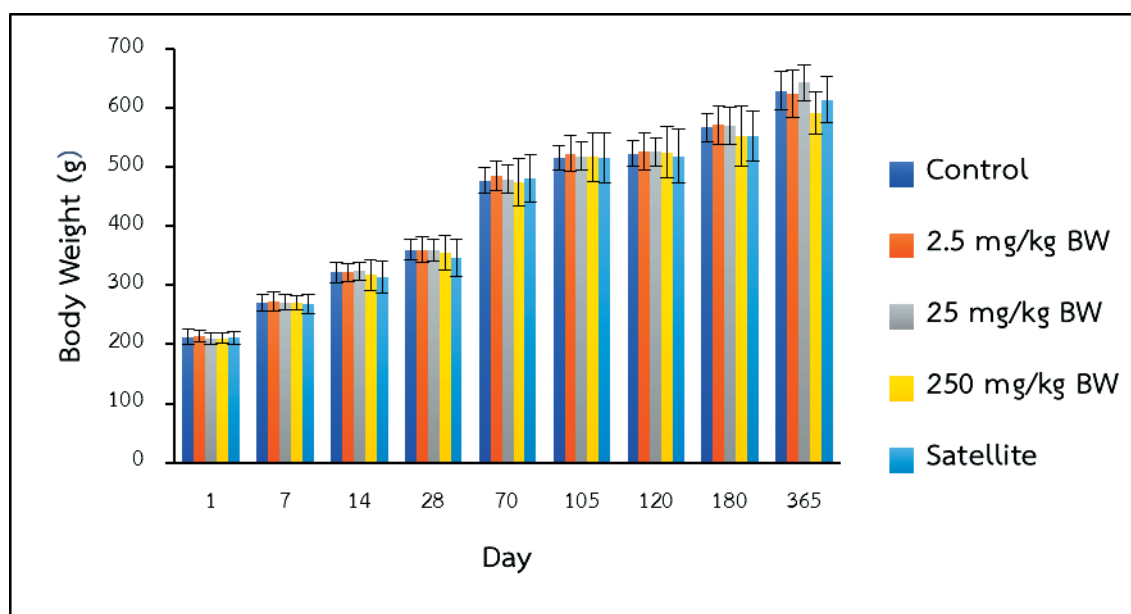


Figure 1 The body weight of male Sprague Dawley rats

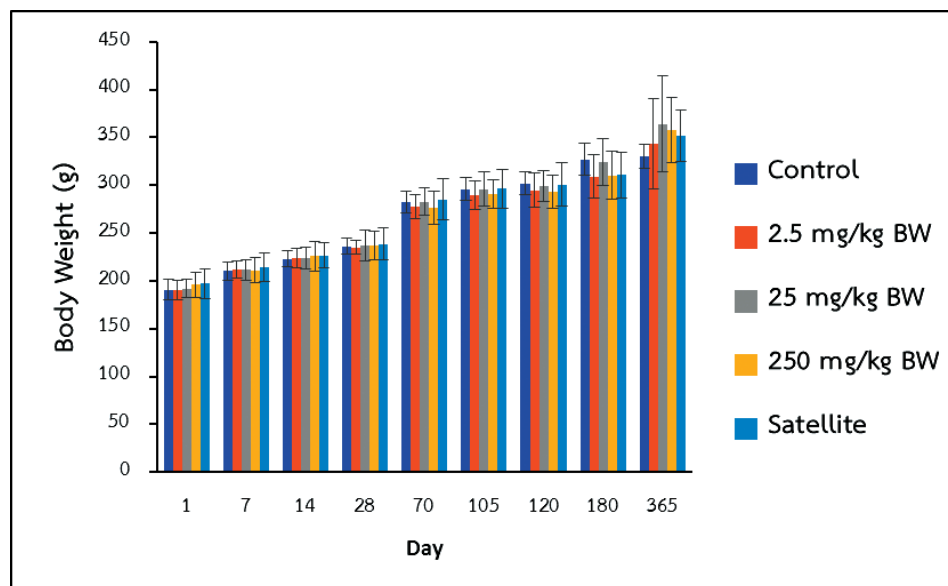


Figure 2 The body weight of female Sprague Dawley rats

Table 1 Hematological analysis of Sprague Dawley rats

Sex	Parameters	Mean of parameters $\pm$ standard deviation				
		Control	2.5 mg/kg BW	25 mg/kg BW	250 mg/kg BW	Satellite
Male	RBC ($10^6/\mu\text{l}$)	8.41 $\pm$ 0.45	8.27 $\pm$ 0.26	8.32 $\pm$ 0.28	8.30 $\pm$ 0.31	8.32 $\pm$ 0.55
	HBG (g/dl)	15.9 $\pm$ 0.79	15.6 $\pm$ 0.55	15.7 $\pm$ 0.43	15.4 $\pm$ 0.55	15.6 $\pm$ 1.23
	HCT (%)	49.6 $\pm$ 2.44	49.1 $\pm$ 1.44	49.2 $\pm$ 1.59	48.9 $\pm$ 1.55	48.5 $\pm$ 2.63
	MCV (fl)	59.0 $\pm$ 1.07	59.4 $\pm$ 1.07	59.2 $\pm$ 1.70	58.9 $\pm$ 1.56	58.3 $\pm$ 2.18
	MCH (pg)	19.0 $\pm$ 1.35	18.9 $\pm$ 0.54	18.9 $\pm$ 0.34	18.6 $\pm$ 0.62	18.8 $\pm$ 0.80
	MCHC (g/dl)	32.2 $\pm$ 2.00	31.8 $\pm$ 0.81	31.9 $\pm$ 1.03	31.6 $\pm$ 0.37	32.2 $\pm$ 1.24
	PLT ($10^3/\mu\text{l}$)	890 $\pm$ 109.20	918 $\pm$ 95.96	967 $\pm$ 104.99	1067 $\pm$ 126.04*	1012 $\pm$ 78.59*
	WBC ($10^6/\mu\text{l}$)	6.43 $\pm$ 1.32	7.12 $\pm$ 1.90	5.34 $\pm$ 1.31	6.18 $\pm$ 1.63	7.01 $\pm$ 1.42
Female	RBC ($10^6/\mu\text{l}$)	8.10 $\pm$ 0.35	7.93 $\pm$ 0.48	8.04 $\pm$ 0.32	8.06 $\pm$ 0.29	7.96 $\pm$ 0.35
	HBG (g/dl)	16.0 $\pm$ 0.56	15.6 $\pm$ 0.76	15.8 $\pm$ 0.59	15.9 $\pm$ 0.53	15.8 $\pm$ 1.01
	HCT (%)	50.2 $\pm$ 1.73	49.3 $\pm$ 2.32	49.2 $\pm$ 1.70	48.7 $\pm$ 1.52	48.2 $\pm$ 2.11
	MCV (fl)	62.0 $\pm$ 0.91	61.8 $\pm$ 1.22	61.3 $\pm$ 1.96	60.5 $\pm$ 2.38	60.6 $\pm$ 2.02
	MCH (pg)	19.7 $\pm$ 0.72	19.6 $\pm$ 0.50	19.7 $\pm$ 0.65	19.7 $\pm$ 0.41	19.8 $\pm$ 1.01
	MCHC (g/dl)	31.9 $\pm$ 0.77	31.7 $\pm$ 0.52	32.2 $\pm$ 0.97	32.6 $\pm$ 1.21	32.8 $\pm$ 2.11
	PLT ($10^3/\mu\text{l}$)	772 $\pm$ 71.38	811 $\pm$ 106.12	819 $\pm$ 63.27	840 $\pm$ 61.01*	799 $\pm$ 91.49
	WBC ($10^6/\mu\text{l}$)	5.07 $\pm$ 1.39	6.04 $\pm$ 1.93	4.49 $\pm$ 1.31	4.93 $\pm$ 0.96	5.01 $\pm$ 1.09

Note: * The mean difference is significant at the 0.05 levels of control group

Table 2 Clinical biochemistry analysis of Sprague Dawley rats

Sex	Parameters	Mean of parameters $\pm$ standard deviation				Satellite
		Control	2.5 mg/kg BW	25 mg/kg BW	250 mg/kg BW	
Male	TP (g/dl)	7.6 $\pm$ 0.85	7.7 $\pm$ 1.34	7.9 $\pm$ 0.63	7.6 $\pm$ 1.02	7.4 $\pm$ 0.60
	CHOL (mg/dl)	174 $\pm$ 56.04	145 $\pm$ 44.94	150 $\pm$ 32.74	146 $\pm$ 36.89	169 $\pm$ 29.63
	TRIGL (mg/dl)	111 $\pm$ 43.92	102 $\pm$ 32.19	99 $\pm$ 20.72	96 $\pm$ 24.09	112 $\pm$ 30.65
	ALT (U/l)	60 $\pm$ 16.54	59 $\pm$ 11.38	73 $\pm$ 20.06	119 $\pm$ 72.84*	85 $\pm$ 40.76
	AST (U/l)	74 $\pm$ 13.84	83 $\pm$ 19.60	81 $\pm$ 21.96	98 $\pm$ 29.66*	86 $\pm$ 33.58
	ALP (U/l)	66 $\pm$ 14.90	61 $\pm$ 19.06	83 $\pm$ 16.99	116 $\pm$ 24.78*	92 $\pm$ 35.23
	ALB (g/dl)	4.9 $\pm$ 0.45	5.0 $\pm$ 0.84	4.7 $\pm$ 0.59	4.5 $\pm$ 0.44	4.4 $\pm$ 0.50
	GLO (g/dl)	2.8 $\pm$ 0.59	2.7 $\pm$ 0.68	3.1 $\pm$ 0.33	3.1 $\pm$ 0.92	3.0 $\pm$ 0.72
	CREA (mg/dl)	0.3 $\pm$ 0.05	0.3 $\pm$ 0.06	0.4 $\pm$ 0.05	0.3 $\pm$ 0.08	0.4 $\pm$ 0.06
	BUN (mg/dl)	18.7 $\pm$ 3.31	18.0 $\pm$ 3.36	18.9 $\pm$ 1.82	18.6 $\pm$ 1.96	18.6 $\pm$ 4.19
	UA (mg/dl)	2.8 $\pm$ 1.13	2.8 $\pm$ 0.89	2.7 $\pm$ 1.04	2.8 $\pm$ 0.65	2.7 $\pm$ 0.73
	GLU (mg/dl)	185 $\pm$ 50.74	188 $\pm$ 45.29	179 $\pm$ 36.93	178 $\pm$ 31.04	178 $\pm$ 40.80
Female	TP (g/dl)	8.0 $\pm$ 0.68	7.5 $\pm$ 0.77	7.9 $\pm$ 0.80	8.0 $\pm$ 0.91	7.5 $\pm$ 0.69
	CHOL (mg/dl)	138 $\pm$ 39.24	124 $\pm$ 13.36	117 $\pm$ 22.39	117 $\pm$ 16.49	132 $\pm$ 25.47
	TRIGL (mg/dl)	92 $\pm$ 41.38	72 $\pm$ 21.97	71 $\pm$ 19.54	74 $\pm$ 21.39	92 $\pm$ 46.53
	ALT (U/l)	54 $\pm$ 5.47	58 $\pm$ 7.04	59 $\pm$ 6.10	60 $\pm$ 4.10*	54 $\pm$ 7.68
	AST (U/l)	81 $\pm$ 9.02	89 $\pm$ 7.64	91 $\pm$ 4.15	94 $\pm$ 3.72*	80 $\pm$ 8.72
	ALP (U/l)	53 $\pm$ 7.17	57 $\pm$ 4.97	57 $\pm$ 3.97	60 $\pm$ 6.39	54 $\pm$ 3.99
	ALB (g/dl)	5.7 $\pm$ 0.86	5.6 $\pm$ 0.47	5.6 $\pm$ 0.49	5.7 $\pm$ 0.62	5.6 $\pm$ 0.36
	GLO (g/dl)	2.3 $\pm$ 0.33	2.3 $\pm$ 0.31	2.2 $\pm$ 0.40	2.3 $\pm$ 0.40	2.2 $\pm$ 0.91
	CREA (mg/dl)	0.4 $\pm$ 0.08	0.3 $\pm$ 0.05	0.4 $\pm$ 0.06	0.3 $\pm$ 0.05	0.3 $\pm$ 0.05
	BUN (mg/dl)	16.9 $\pm$ 1.72	16.5 $\pm$ 2.17	16.1 $\pm$ 2.22	16.2 $\pm$ 2.17	16.3 $\pm$ 1.90
	UA (mg/dl)	2.8 $\pm$ 0.89	2.3 $\pm$ 0.35	2.3 $\pm$ 0.69	2.3 $\pm$ 0.59	2.8 $\pm$ 1.07
	GLU (mg/dl)	184 $\pm$ 35.01	165 $\pm$ 16.54	164 $\pm$ 33.51	163 $\pm$ 29.10	185 $\pm$ 60.32

Note: *The mean difference is significant at the 0.05 levels of control group

Table 3 Organ's weight of Sprague Dawley rats

Sex	Parameters	Mean of parameters $\pm$ standard deviation				Satellite
		Control	2.5 mg/kg BW	25 mg/kg BW	250 mg/kg BW	
Male	Liver	2.74 $\pm$ 0.19	2.85 $\pm$ 0.22	2.77 $\pm$ 0.27	3.03 $\pm$ 0.27*	3.01 $\pm$ 0.26*
	Kidney Rt.	0.34 $\pm$ 0.02	0.34 $\pm$ 0.02	0.34 $\pm$ 0.03	0.37 $\pm$ 0.02*	0.38 $\pm$ 0.03*
	Kidney Lt.	0.34 $\pm$ 0.02	0.34 $\pm$ 0.02	0.34 $\pm$ 0.03	0.38 $\pm$ 0.03*	0.38 $\pm$ 0.03*
	Heart	0.31 $\pm$ 0.02	0.30 $\pm$ 0.02	0.30 $\pm$ 0.02	0.31 $\pm$ 0.01	0.32 $\pm$ 0.03
	Lung	0.31 $\pm$ 0.03	0.32 $\pm$ 0.05	0.31 $\pm$ 0.03	0.32 $\pm$ 0.02	0.35 $\pm$ 0.09
	Spleen	0.18 $\pm$ 0.02	0.18 $\pm$ 0.02	0.19 $\pm$ 0.02	0.21 $\pm$ 0.02*	0.20 $\pm$ 0.02
Female	Liver	2.28 $\pm$ 0.15	2.43 $\pm$ 0.25	2.22 $\pm$ 0.16	2.49 $\pm$ 0.21*	2.51 $\pm$ 0.21*
	Kidney Rt.	0.32 $\pm$ 0.02	0.34 $\pm$ 0.03	0.32 $\pm$ 0.03	0.34 $\pm$ 0.02	0.34 $\pm$ 0.03
	Kidney Lt.	0.31 $\pm$ 0.02	0.33 $\pm$ 0.02	0.31 $\pm$ 0.02	0.33 $\pm$ 0.02	0.34 $\pm$ 0.03
	Heart	0.34 $\pm$ 0.02	0.37 $\pm$ 0.03	0.34 $\pm$ 0.03	0.36 $\pm$ 0.03	0.34 $\pm$ 0.03
	Lung	0.45 $\pm$ 0.05	0.46 $\pm$ 0.07	0.44 $\pm$ 0.06	0.45 $\pm$ 0.05	0.42 $\pm$ 0.07
	Spleen	0.21 $\pm$ 0.02	0.23 $\pm$ 0.03	0.21 $\pm$ 0.02	0.24 $\pm$ 0.02*	0.22 $\pm$ 0.03

Discussion

The present study carried out the toxicity level assessment of Siamese crocodile bile in the dose levels 2.5, 25, and 250 mg/kg body weight were no mortality and clinical signs cause of toxicity in animals. The general clinical observation results of all animals including body weights, Feed and water consumption were normal.

The pathological evaluation concluded that, there were no treatment-related change in both sexes. Simple kidney cysts are fluid-filled sacs that form in the renal cortex which do not enlarge the kidneys, replace their normal structure, or cause reduced kidney function like other cyst type that the causes for simple kidney cysts are more common as age⁽²¹⁾ or obstruction of tubules, or deficiency of blood supply to the kidneys may play a role, diverticula sacs that form on the tubules may detach and become simple kidney cysts. The role of genetic factors in the development of simple kidney cysts has not been studied.⁽²²⁾ Proteinaceous plugs are commonly noted as postmortem change resulting from agonal secretion of accessory sex gland fluids during euthanasia⁽²³⁾ The treatment-relates changes were not observed in necropsy findings and histopathological finding in both sexes based on a result. The significantly different results of hematological tests and clinical biochemistry tests were not considered as a treatment-related toxicity effect because that can recovered in recovery period (28 days).

From the issue of Herbal and Dietary Supplements related hepatotoxicity is a growing concern particularly with the evidence in both the United States and Europe that the use of these products appears to be increasing.⁽²⁴⁾ Herbal and Dietary Supplements have been responsible for causing liver injury and the major implicated agents include anabolic steroids, green tea extract, and multi-ingredient nutritional supplements (MINS).^(25, 26) Based on the results as declared above, there were no pathology-related effects from any dose of the Siamese crocodile bile in Sprague Dawley rats as the Siamese crocodile bile was administered once a day by oral gavage for 365 days with 28 days for recovery period.

Conclusion

In summary, the Siamese crocodile bile doses not produce any toxic signs or obvious symptoms of chronic toxicity. Thus, the no observed adverse effect level (NOAEL) of Siamese crocodile bile was considered to be 250 mg/kg body weight per day for Sprague Dawley rats.

Acknowledgement

The study was supported from National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Nakhon Pathom, Thailand for equipment and facility all over this research. The authors would like to acknowledge Faculty of Science, Kasetsart University for providing knowledge and experience during the course of this research.

References

1. Praduptong A, Siruntawineti J, Chaeychomsri S, Srimangkornkaew P, Chaeychomsri W. Acute oral toxicity testing of siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*) oil in wistar rats. Biosci Discov 2018; 9(3): 409-15.
2. Srimangkornkaew P, Praduptong A, Siruntawineti J, Chaeychomsri S, Chaeychomsri W. The evaluation of acute oral toxicity testing of siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*) bile in Sprague Dawley rats in compliance with OECD guideline 423. Biosci Discov 2018; 9(4): 469-73.
3. Picheinsutthorn C, Jeerawong, V. Animal medicinal materials. In: Hand out of Thai medicinal pharmacy. 3rd ed. Bangkok, Thailand: Amarin Press; 2003. p. 150-167.
4. Pharmacopoeia Commission of PRC, editors. Pharmacopoeia of the People's republic of China. Beijing, China: Chemical Industry Press; 1997.
5. Maddison JE, Page SW, Church DB, editors. Small animal clinical pharmacology. In: Alexander JG, Jill EM, Grant G, editors. Gastrointestinal drugs. 2nd ed. London, United Kingdom: Saunders Ltd.; 2008. p. 469-497.
6. Chiang JY. Bile acid metabolism and signaling. Compr Physiol 2013; 3(3): 1191-212.
7. The Metabolomics Innovation Centre (TMIC). Showing metabocard for Coprocholic acid (HMDB0000601). [online]. 2005; [cited 2018 Nov 26]; [12 screens]. Available from: URL: <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0000601>.

8. Song W, Li SS, Qiu PP, Shen DY, Tian L, Zhang QY, et al. Apoptosis induced by aqueous extracts of crocodile bile in human hepatocarcinoma SMMC-7721. *Appl Biochem Biotechnol* 2013; 170(1): 15–24.
9. Kang JH, Zhang WQ, Song W, Shen DY, Li SS, Tian L, et al. Apoptosis mechanism of human cholangiocarcinoma cells induced by bile extract from crocodile. *Appl Biochem Biotechnol* 2012; 166(4): 942–51.
10. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). OECD guidelines for the testing of chemicals, test No. 423: acute oral toxicity – acute toxic class method. [online]. 2001; [cited 2019 Oct 20]; [14 screens]. Available from: URL: https://ntp.niehs.nih.gov/iccvm/suppdocs/feddocs/oecd/oecd_gl423.pdf.
11. Srimangkornkaew P, Praduptong A, Siruntawineti J, Chaeychomsri S, Chaeychomsri W. Acute oral toxicity of *Crocodylus siamensis* bile in sprague dawley rats. *Bull Dept Med Sci* 2020; 62(1): 16–25.
12. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). OECD guidelines for the testing of chemicals, test No. 408: repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents. [online]. 1998; [cited 2019 Oct 20]; [10 screens]. Available from: URL: https://www.oecd.org/env/ehs/testing/E408_1998.PDF.
13. Srimangkornkaew P, Praduptong A, Siruntawineti J, Chaeychomsri S, Chaeychomsri W. Sub-chronic oral toxicity of *Crocodylus siamensis* bile in sprague dawley rats. *Bull Dept Med Sci* 2020; 62(2): 50–8.
14. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). OECD guidelines for the testing of chemicals, test No. 452: chronic toxicity studies. [online]. 2009; [cited 2019 Oct 20]; [16 screens]. Available from: URL: https://www.oecd.org/env/ehs/testing/E452_2009.pdf.
15. Chaeychomsri W, Siruntawineti J, Osotsila I. Process suitable for the preservation of crocodile gall bladder for adding value to product. In: *Proceeding of the 35th congress on science and technology of Thailand*; 2009 Oct 15–17; Chonburi, Thailand. Bangkok, Thailand: The Science Society of Thailand Under the Patronage of His Majesty the King; 2009. p. 569–576.
16. Chaeychomsri W, Siruntawineti J. Process for preparation of crocodile blood powder and its product, Thai Petty Patent No. 5074. Bangkok, Thailand: Kasetsart University; 2006.
17. National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. Washington, DC: The National Academies Press; 2011.
18. Institutional Animal Care and Use Committee. Guidelines for euthanasia of rodent fetuses and neonates. [online]. 2013; [cited 2019 Jun 18]; [3 screens]. Available from: URL: https://oacu.oir.nih.gov/sites/default/files/uploads/arac-guidelines/b4_rodent_euthanasia_pup.pdf.
19. Mooi E, Sarstedt M. Hypothesis testing & ANOVA. In: *A concise guide to market research*. 3th Edition. Berlin, Heidelberg: Springer; 2011. p. 113–160.
20. Tanaka H, Suzuki S, Ninomiya F, Matsubara K, Hakoi K. Spontaneous thymoma in a 10-week-old sprague-dawley rat. *J Toxicol Pathol* 2012; 25(1): 37–40.

21. Torres V, Grantham J, editors. Cystic diseases of the kidney. In: Brenner B, editor. The Kidney. 6th ed. Philadelphia, United States: Saunders Elsevier 2008; p. 1451-1453.
22. National Kidney and Urologic Diseases Information Clearinghouse (NKUDIC). Simple kidney cysts. [online] 2012; [Cited 2019 (Jun 18)]; [4 screens]. Available from: URL: https://www.niddk.nih.gov/-/media/Files/Kidney-Disease/Simple_Kidney_Cysts_508.pdf.
23. National Toxicity Program. Urinary bladder-proteinaceous plug. [online]. 2016; [cited 2019 Oct 18]; [2 screens] Available from: URL: https://ntp.niehs.nih.gov/nnl/urinary/urinary_bladder/protplug/.
24. Navarro VJ, Lucena MI. Hepatotoxicity induced by herbal and dietary supplements. Semin Liver Dis 2014; 34(2): 172-93.
25. Bailey RL, Gahche JJ, Lentino CV, Dwyer JT, Engel JS, Thomas PR. Dietary supplement use in the United States, 2003-2006. J Nutr 2011; 141(2): 261-6.
26. Navarro VJ, Khan I, Björnsson E, Seeff LB, Serrano J, Hoofnagle JH. Liver injury from herbal and dietary supplements. Hepatology 2017; 65(1): 363-73.

การทดสอบความเป็นพิษเรื้อรังทางปากของน้ำดีจระเข้ สายพันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) ในหนูแรท สายพันธุ์ Sprague Dawley

ภัสสรารณ ศรีมังกรแก้ว¹ กฤติกาญจน์ สุวรรณสโรช¹ จินดาวรรณ สิริทวิเนติ² วิน เชยชมศรี²
และสุดาวรรณ เชยชมศรี³

¹ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จังหวัดนครปฐม 73170

²ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

³ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

บทคัดย่อ จระเข้สายพันธุ์ไทยเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ น้ำดีจระเข้สายพันธุ์ไทยถูกนำมาใช้เป็นยาแผนโบราณ และส่งขายต่างประเทศมาเป็นเวลานาน แต่การศึกษาด้านความปลอดภัยรวมถึงการทดสอบความเป็นพิษนั้นมีจำกัด สำหรับการศึกษาก่อนหน้านี้ได้มีการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันและเป็นพิษกึ่งเรื้อรังทางปาก และจากผลการทดสอบพบว่า น้ำดีจระเข้สายพันธุ์ไทย จัดอยู่ในระบบการจัดกลุ่มสารเคมี การติดฉลาก และการแสดงรายละเอียดบนเอกสารข้อมูลความปลอดภัยสากลหมวดที่ 4 มี LD₅₀ ที่ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวสัตว์ทดลอง และระดับความปลอดภัยที่ไม่เกิดผลกระทบในการใช้น้ำดีจระเข้สายพันธุ์ไทยในหนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley คือ 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวสัตว์ทดลอง ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม การศึกษาเพื่อให้ข้อมูลเกี่ยวกับความเป็นพิษ อวัยวะเป้าหมาย การสะสมและประเมินระดับความปลอดภัยในระยะเวลาที่นานพอที่จะทำให้เกิดผลกระทบแบบเรื้อรังนั้นไม่เคยมีการศึกษามาก่อน ดังนั้น การศึกษานี้จึงจัดทำขึ้นเพื่อสนับสนุนข้อมูลข้างต้นสำหรับน้ำดีจระเข้สายพันธุ์ไทยในหนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley ตามวิธีการมาตรฐาน OECD Guideline หมายเลข 452 โดยผลการทดสอบพบว่า น้ำดีจระเข้สายพันธุ์ไทยไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง รวมทั้งไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาที่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบที่ระดับ 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัวในสัตว์ทดลองทั้ง 2 เพศ สำหรับผลการวิเคราะห์เลือดทางโลหิตวิทยา และเคมีคลินิก พบว่าตัวแปรที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่สามารถกลับสู่ภาวะปกติได้ภายในระยะเวลา 28 วันหลังหยุดให้สารทดสอบ จากผลการศึกษาทั้งหมดจึงสามารถสรุปได้ว่า น้ำดีจระเข้สายพันธุ์ไทยไม่มีความเป็นพิษต่อสัตว์ทดลองที่ระดับ 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว เมื่อได้รับต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 365 วัน

คำสำคัญ: น้ำดีจระเข้, การทดสอบความเป็นพิษเรื้อรัง, OECD Guidelines หมายเลข 452, *Crocodylus siamensis*

การปรับปรุงคุณภาพการให้บริการทดสอบทาง ห้องปฏิบัติการของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ ด้วยระบบรายงานผลวิเคราะห์ออนไลน์

โลมสไล วงศ์จันตา¹ วสุ บำรุงชัยชนะ¹ กิตติชัย จันท² ปาริชาติ กัญญาบุญ¹ และวิษณุดา วุฒิอดิเรก¹

¹ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อำเภอเมือง นครสวรรค์ 60000

²บริษัท ทีโอที จำกัด (มหาชน) ถนนแจ้งวัฒนะ หลักสี่ กรุงเทพฯ 10210

บทคัดย่อ จากรายงานผลการสำรวจความพึงพอใจ ในปี พ.ศ. 2560 ของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ พบว่า ผู้รับบริการต้องการได้รับรายงานผลการตรวจวิเคราะห์เร็วขึ้น แต่เนื่องจากไม่สามารถลดเวลาทดสอบทางห้องปฏิบัติการได้ จึงพิจารณาปรับปรุงขั้นตอนการส่งมอบรายงานผลวิเคราะห์ด้วยการพัฒนาระบบรายงานผลวิเคราะห์ออนไลน์โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อนำส่งรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ที่รวดเร็วและลดปัญหาเอกสารสูญหายระหว่างการนำส่ง ได้ศึกษาจุดเด่นระบบรายงานของหน่วยงานเครือข่าย แล้วพัฒนาระบบใหม่ด้วยกระบวนการวอเตอร์ฟอลโมเดล เชื่อมโยงกับระบบฐานข้อมูลจัดการตัวอย่าง SMIS ที่มีอยู่ โดยให้ความสำคัญกับการรักษาความลับและปกป้องสิทธิ์ของผู้รับบริการ การพัฒนามีความสำเร็จและถูกนำมาใช้เมื่อ 15 มีนาคม พ.ศ. 2562 ผลการประเมินหลังใช้งาน 6 เดือน พบมีผู้รับบริการสมัครใช้ 100 ราย แยกเป็นภาคเอกชน (39), ตำรวจ (44), สำนักงานสาธารณสุขจังหวัด (3) และโรงพยาบาล (14) ส่งมอบรายงานที่ได้รับอนุมัติช่วง 15 มีนาคม ถึง 30 กันยายน พ.ศ. 2563 จำนวน 1,852 ฉบับ สามารถดำเนินการได้ภายใน 1 วัน หลังได้รับอนุมัติ ทำให้ผู้รับบริการได้รับรายงานผลเร็วกว่าการส่งทางไปรษณีย์ 2-5 วัน ระยะเวลาตั้งแต่อัปโหลดรายงานถึงผู้รับบริการดาวน์โหลดอยู่ในช่วงไม่เกิน 1 วัน ถึง 95.4 วัน ค่าฐานนิยม ไม่เกิน 1 วัน สามารถแก้ไขปัญหาการสูญหายของเอกสารและลดค่าใช้จ่ายบริการไปรษณีย์ประมาณ 33,000 บาท ผลการสำรวจความพึงพอใจต่อระบบรายงานผลวิเคราะห์ออนไลน์จากผู้รับบริการ 21 ราย พบได้คะแนนความพึงพอใจภาพรวมระดับมากที่สุด (คะแนน 4.71 จาก 5) สิ่งที่พึงพอใจมากที่สุด คือ ระบบความปลอดภัย การรักษาความลับ และความสะดวกในการจัดเก็บข้อมูล

คำสำคัญ : รายงานผลการตรวจวิเคราะห์, บริการออนไลน์, การปรับปรุงอย่างต่อเนื่อง, การให้ความสำคัญกับผู้รับบริการ, ISO/IEC 17025

Corresponding author E-mail: lomsalai.w@dmsc.mail.go.th

Received: 28 May 2020

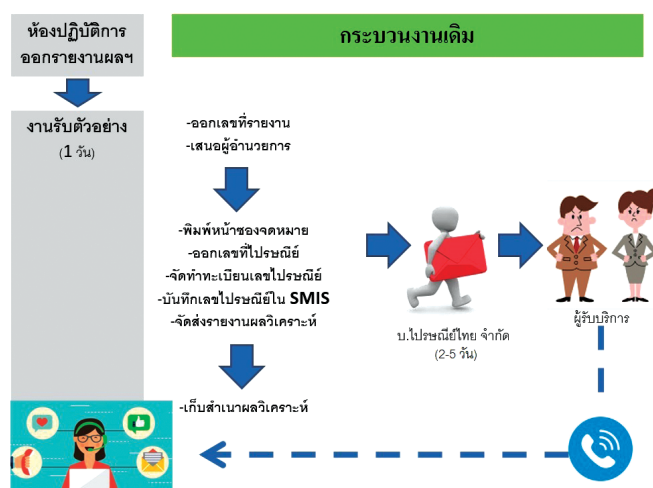
Revised: 3 November 2020

Accepted: 9 February 2021

บทนำ

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ มีภารกิจหลักคือ ให้บริการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ด้านคุ้มครองผู้บริโภคประกอบด้วยห้องปฏิบัติการอาหาร ยา รังสีและเครื่องมือแพทย์ ด้านชั้นสูตรประกอบด้วยห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาคลินิกและพิษวิทยา โดยในแต่ละปีจะส่งมอบรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการมากกว่า 10,000 ฉบับ และมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นทุกปี ทั้งนี้ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ ได้ส่งมอบรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการที่มีความสำคัญให้ผู้รับบริการ 3 ช่องทาง คือ จัดส่งทางไปรษณีย์ ผู้รับบริการเดินทางมารับด้วยตนเอง และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ คิดเป็นร้อยละ 97.2, 2.6 และ 0.2 ของจำนวนรายงานที่จัดส่งทั้งหมด ตามลำดับ ซึ่งมีระยะเวลาส่งมอบพัสดุลงทะเบียน 2-5 วัน⁽¹⁾ และมีความเสี่ยงพัสดุสูญหายระหว่างการส่งมอบ ในแต่ละปีจะได้รับเรื่องจากผู้รับบริการว่าไม่ได้รับรายงานผลวิเคราะห์สาเหตุจากพัสดุที่ส่งทางไปรษณีย์สูญหาย 1-3 ราย ซึ่งความเสียหายจะมากขึ้นหากมีการนำรายงานผลวิเคราะห์ที่เป็นความลับของผู้รับบริการที่สูญหายไปเปิดเผยโดยไม่ได้รับอนุญาต จากรายงานผลการสำรวจความพึงพอใจประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 ผู้รับบริการให้ข้อเสนอแนะต้องการได้รับรายงานผลการตรวจวิเคราะห์เร็วขึ้น ซึ่งการปรับปรุงกระบวนการเป็นข้อกำหนดหนึ่งของมาตรฐาน ISO/IEC 17025: 2005 ซึ่งกำหนดให้ห้องปฏิบัติการต้องดำเนินการปรับปรุงประสิทธิภาพระบบการบริหารอย่างต่อเนื่อง (Continuous quality improvement) ทั้งนี้ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ ได้ให้ความสำคัญและพิจารณาผลระยะเวลารอคอยหรือระยะเวลาให้บริการในแต่ละขั้นตอน แต่เนื่องจากขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการเป็นขั้นตอนทางเทคนิควิชาการที่ไม่สามารถลดระยะเวลาดำเนินการลงได้ เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลรอบด้านแล้วพบว่าการปรับปรุงกระบวนการส่งมอบรายงานผลวิเคราะห์น่าจะเป็นไปได้มากที่สุด ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้พิจารณาเปลี่ยนแปลงรูปแบบและขั้นตอนการส่งมอบรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ให้มีความสะดวกและรวดเร็วมากยิ่งขึ้น

การส่งมอบรายงานผลวิเคราะห์ของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ เป็นความรับผิดชอบของงานรับตัวอย่าง โดยหลังจากรับรายงานผลวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการแล้ว งานรับตัวอย่างจะต้องทำการเสนอผู้อำนวยการลงนามในหนังสือนำส่งรายงาน ออกเลขที่รายงาน พิมพ์หน้าของจดหมาย แยกเอกสารฉบับจริงและสำเนา จัดชุดเอกสารและบรรจุซอง ออกเลขที่ไปรษณีย์ จัดทำทะเบียนเลขไปรษณีย์ บันทึกเลขไปรษณีย์ลงในระบบฐานข้อมูลจัดการตัวอย่าง จัดส่งรายงานทางไปรษณีย์ และเก็บสำเนาเอกสารรายงานผลวิเคราะห์ ดังแสดงในภาพที่ 1 นอกจากนี้ในแต่ละวันงานรับตัวอย่างจะต้องตอบคำถามผู้รับบริการที่โทรศัพท์มาสอบถามรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ จะส่งเอกสารทางไปรษณีย์ได้เมื่อไร รวมทั้งขอเลขไปรษณีย์เพื่อติดตามการส่งมอบพัสดุ หรือขอคำแนะนำการส่งตัวอย่าง เป็นต้น



ภาพที่ 1 ขั้นตอนการส่งมอบรายงานผลวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการทางไปรษณีย์ ที่เป็นกระบวนการเดิม

ดังนั้นในปีงบประมาณ พ.ศ. 2561-2562 กลุ่มพัฒนาคุณภาพและวิชาการ จึงได้เสนอและได้รับอนุมัติให้ดำเนินการโครงการพัฒนาระบบรายงานผลการตรวจวิเคราะห์หอนไลน์ (Online Laboratory Reporting System) ด้วยการพัฒนาระบบฐานข้อมูลรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ที่ผู้รับบริการสามารถเข้าถึงได้ทุกที่ทุกเวลา มีลักษณะเป็นเว็บแอปพลิเคชัน และยังคงสอดคล้องกับข้อกำหนด ISO/IEC 17025: 2005 เรื่องการรักษาความลับของผู้รับบริการและข้อกำหนดอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องเชื่อมโยงกับระบบฐานข้อมูลจัดการตัวอย่าง SMIS (Sample Management Information System) ที่มีอยู่ โดยได้ศึกษาจุดเด่นระบบการรายงานผลวิเคราะห์ของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 2 พิษณุโลก นำมาต่อยอดและเพิ่มเติมในส่วนที่เป็นโอกาสในการพัฒนา ทั้งนี้เพื่อปรับปรุงขั้นตอนการส่งมอบรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ให้มีความรวดเร็วยิ่งขึ้น ผลการจากพัฒนาคาดว่าจะสามารถลดระยะเวลาส่งมอบรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ และลดปัญหาการรายงานผลวิเคราะห์สูญหายระหว่างการนำส่งทางไปรษณีย์ ซึ่งคาดว่าจะทำให้ผู้รับบริการมีความพึงพอใจมากยิ่งขึ้น

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือ

1. คอมพิวเตอร์ที่ติดตั้งโปรแกรม My SQL, Navicat, Brostache, และ Microsoft Access
2. คอมพิวเตอร์เซิร์ฟเวอร์ประสิทธิภาพสูง สำหรับให้บริการและสำรองข้อมูล
3. เครื่องสแกนเนอร์ติดตั้งร่วมกับคอมพิวเตอร์ที่มีโปรแกรม Adobe Acrobat
4. เครื่องสำรองไฟสำหรับคอมพิวเตอร์เซิร์ฟเวอร์

โปรแกรม

1. ระบบปฏิบัติการวินโดวส์เอกซ์พี (Windows XP)
2. โปรแกรม Microsoft Access
3. โปรแกรม Navicat
4. โปรแกรม My SQL
5. โปรแกรม Brostache
6. โปรแกรม Adobe Acrobat
7. ระบบฐานข้อมูลจัดการตัวอย่าง SMIS (Sample Management Information System)

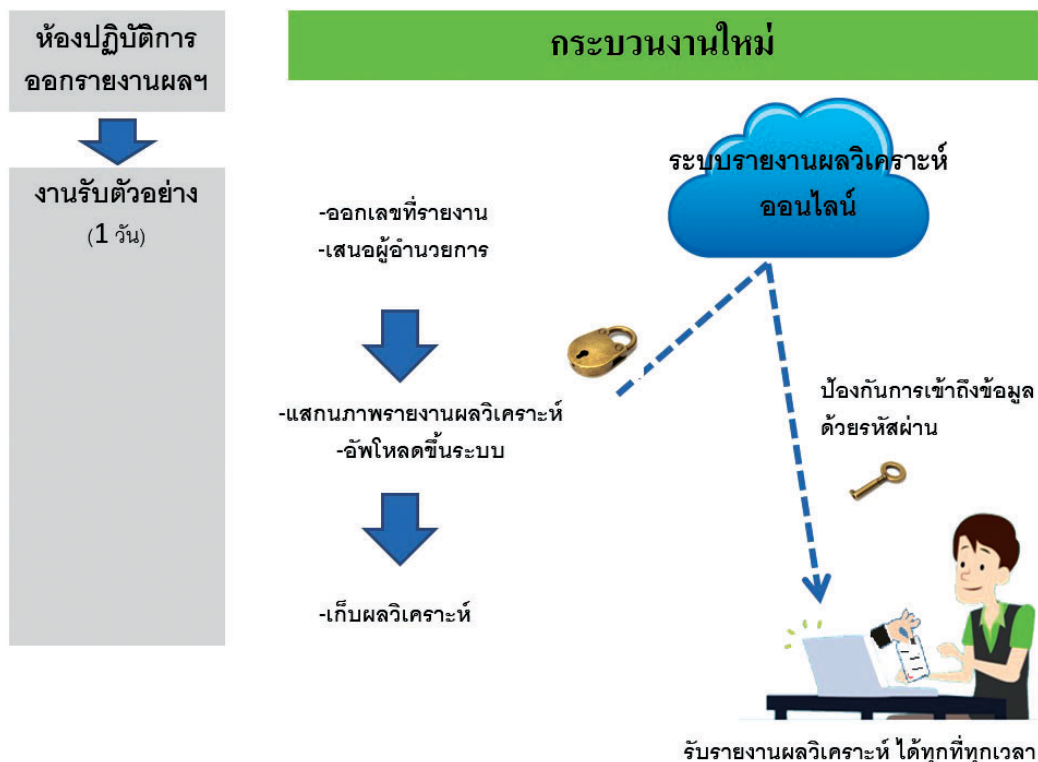
วิธีการ

พัฒนาโปรแกรมโดยใช้กระบวนการวอเตอร์ฟอลโมเดล (Waterfall Model) ซึ่งเป็นกระบวนการพัฒนาระบบฐานข้อมูล (Database Development Process) ที่เป็นที่ยอมรับใช้ด้านวิศวกรรมซอฟต์แวร์^(2, 3) ประกอบด้วยกิจกรรมที่สำคัญ ได้แก่

1. ศึกษาคุณลักษณะของระบบที่จะพัฒนาด้วยการวิเคราะห์ความต้องการของผู้ใช้ (Requirement Analysis) โดยผู้พัฒนาได้ศึกษาจุดเด่นของระบบที่มีอยู่คือ ระบบอี-รีพอร์ต (e-report) ของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 2 พิษณุโลก ข้อกำหนดมาตรฐานห้องปฏิบัติการทดสอบ ISO/IEC 17025: 2005 มาตรฐานการปฏิบัติงานของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ SOP 11 02 019 “การรายงานผลวิเคราะห์” และความต้องการของบุคลากรที่เกี่ยวข้อง
2. ออกแบบระบบที่จะพัฒนา (Design) โดยขยายจุดเด่นระบบอี-รีพอร์ต (e-report) ของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 2 พิษณุโลก โดยให้บริการกับผู้รับบริการทุกคน เชื่อมโยงกับระบบฐานข้อมูลจัดการตัวอย่าง

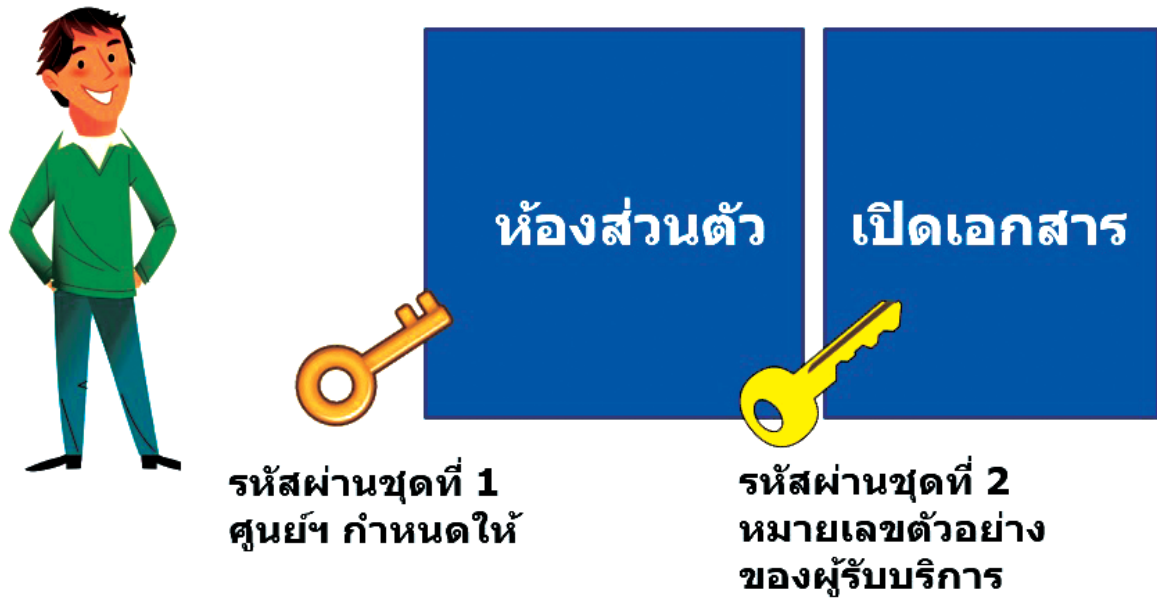
(Sample Management Information System, SMIS) ของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ เพื่อลดขั้นตอนการบันทึกข้อมูลซ้ำ และออกแบบให้เป็นเว็บแอปพลิเคชัน โดยสอดคล้องกับข้อกำหนด ISO/IEC 17025: 2005 เรื่องการรักษาความลับ (Confidentiality) เป็นการป้องกันข้อมูลของผู้รับบริการให้ไม่ถูกเปิดเผยหรือเข้าถึงโดยผู้ไม่มีสิทธิ์ ดังนี้

2.1 ป้องกันการเข้าถึงข้อมูลโดยผู้ไม่มีสิทธิ์โดยใช้รหัสผ่าน (Password Authentication) ดังแสดงในภาพที่ 2 ผู้รับบริการจะสามารถเข้าถึงข้อมูลเฉพาะที่เป็นของตนเองเท่านั้น



ภาพที่ 2 กระบวนการใหม่ เมื่อนำระบบรายงานผลวิเคราะห์ออนไลน์มาใช้ ผู้รับบริการจะได้รับรหัสผ่านระบบ ซึ่งสามารถเข้าถึงข้อมูลที่เป็นของตนเองเท่านั้น

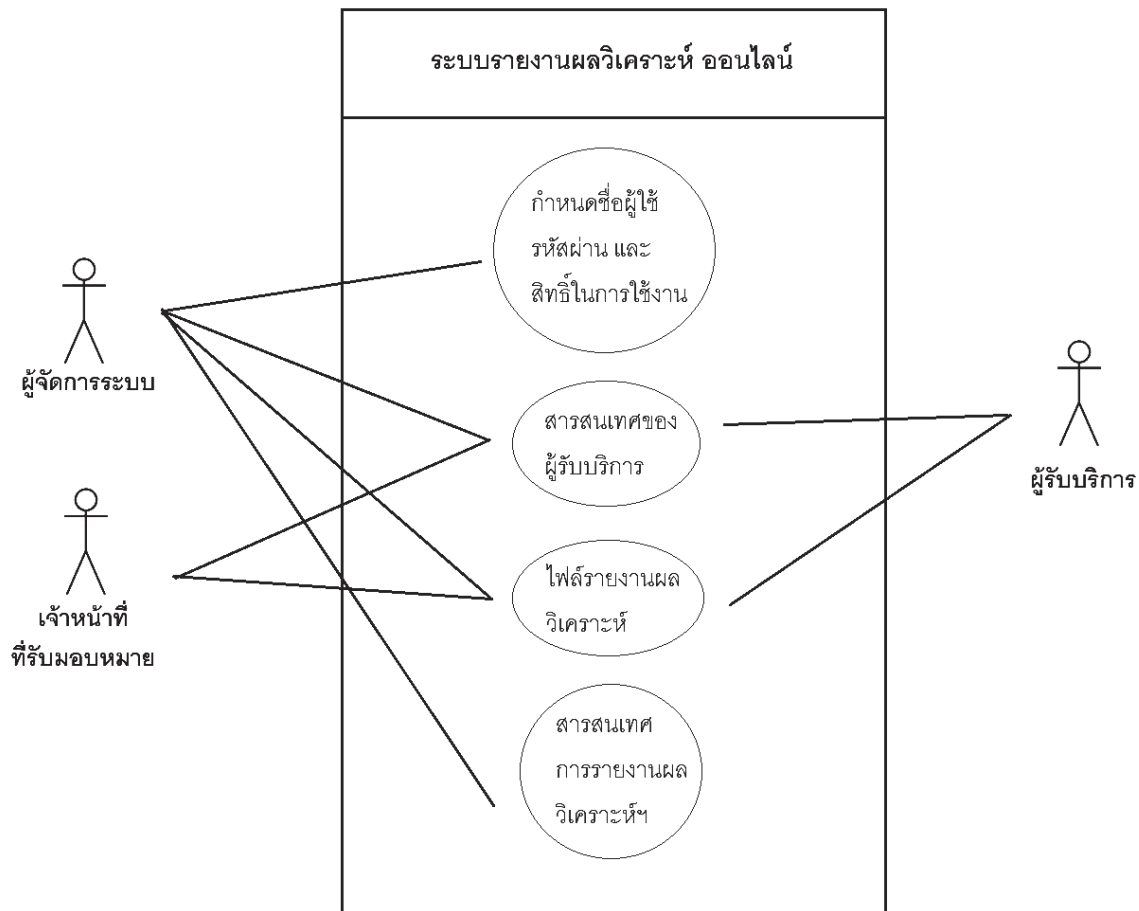
2.2 ป้องกันความผิดพลาดจากการสลับไฟล์ของผู้รับบริการตอนนำเข้าระบบ โดยกำหนดขั้นตอนที่เป็นอิสระต่อกัน 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนที่ 1 เจ้าหน้าที่รับตัวอย่างสแกนรายงานผลวิเคราะห์ต้นฉบับ เป็นอิเล็กทรอนิกส์ไฟล์พร้อมกำหนดชื่อไฟล์และรหัสผ่านเมื่อเปิดอ่าน เป็นหมายเลขตัวอย่าง ขั้นตอนที่ 2 เมื่ออัปโหลดไฟล์เข้าสู่ระบบ ระบบจะทำการตั้งชื่อไฟล์ใหม่อัตโนมัติ เป็นหมายเลขตัวอย่างที่ถูกเลือกโดยไม่เกี่ยวข้องกับชื่อไฟล์ที่เจ้าหน้าที่รับตัวอย่างอัปโหลดขึ้น และขั้นตอนที่ 3 ผู้รับบริการได้หมายเลขตัวอย่างของตนเอง ในวันที่นำส่งตัวอย่าง จากทั้ง 3 ขั้นตอนเมื่อผู้รับบริการเข้าถึงห้องเก็บเอกสารของตนเอง จะปรากฏหมายเลขตัวอย่างและไฟล์แนบซึ่งระบบเป็นผู้กำหนดอัตโนมัติ เมื่อเลือกข้อมูลเพื่อจะเปิดไฟล์ ผู้รับบริการจะต้องใส่รหัสผ่าน คือ หมายเลขตัวอย่างของตนเอง หากทุกขั้นตอนสอดคล้องกันหมด ก็จะสามารถเปิดไฟล์ได้ แต่หากมีความผิดพลาดอันเนื่องจากการนำไฟล์ขึ้นระบบผิดพลาด ผู้รับบริการจะไม่สามารถเปิดไฟล์รายงานผลวิเคราะห์ฉบับนั้นได้ เป็นการป้องกันการเข้าถึงความลับของผู้รับบริการจากความผิดพลาดในการทำงานของเจ้าหน้าที่ ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ระบบป้องกันความลับของผู้รับบริการ ผู้รับบริการจะถือรหัสผ่าน 2 ชุด เพื่อเข้าถึงห้องเก็บข้อมูลทั้งหมดของตัวเอง 1 ชุด และเพื่อเปิดไฟล์อ่านอีก 1 ชุด

2.3 ป้องกันการปลอมแปลงเอกสาร เนื่องจากช่วงเวลาที่พัฒนาระบบรายงานผลวิเคราะห์หัตถ์ออนไลน์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ยังไม่มีการออกกฎระเบียบหรือประกาศ เกี่ยวกับลักษณะของรายงานผลวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ทั้งที่เป็นรูปแบบเอกสารและรูปแบบอื่น เพื่อใช้อ้างอิงตามกฎหมาย ดังนั้นจึงพัฒนาขั้นตอนการปฏิบัติงานเพื่อเป็นลักษณะเฉพาะของรายงานผลวิเคราะห์ที่พิมพ์จากระบบรายงานผลวิเคราะห์หัตถ์ออนไลน์ และเพื่อป้องกันการปลอมแปลงเอกสาร โดยกำหนดข้อความ “e-report” เป็นลายน้ำ ทับลงบนข้อความที่ปรากฏในรายงานผลวิเคราะห์

2.4 กำหนดกลุ่มผู้ใช้งานระบบ เป็น 3 กลุ่ม คือ 1) ผู้จัดการระบบ (Administrator) สามารถเข้าถึงการกำหนดชื่อผู้ใช้ รหัสผ่าน กำหนดสิทธิในการใช้งาน และข้อมูลทุกอย่างในระบบ 2) เจ้าหน้าที่รับตัวอย่าง (Sample Custodian) หรือผู้ที่ได้รับมอบหมายสามารถเข้าถึงข้อมูลเบื้องต้นของผู้รับบริการ อัปโหลดไฟล์เข้าสู่ระบบ และลบไฟล์แนบได้ 3) ผู้รับบริการ (Customer) สามารถเข้าถึงข้อมูลการส่งตัวอย่างและไฟล์รายงานผลวิเคราะห์ตัวอย่างของตนเอง โดยสะสมเป็นฐานข้อมูลการนำส่งตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ เฉพาะส่วนตัวตลอดระยะเวลาหนึ่งปี ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ยูสเคสไดอะแกรม (Use case diagram) ของระบบรายงานผลวิเคราะห์ออนไลน์

2.5 หลักฐานการได้รับรายงานผลวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ โดยกำหนดให้ระบบบันทึกข้อมูลอัตโนมัติ 2 เหตุการณ์ คือ ข้อมูลวันที่และเวลาที่อัปโหลดไฟล์รายงานผลวิเคราะห์เข้าสู่ระบบ และข้อมูลวันที่และเวลาที่ผู้รับบริการดาวน์โหลดไฟล์เอกสารรายงานผลวิเคราะห์แต่ละฉบับ จากข้อมูลทั้งสองชุดทำให้ผู้จัดการระบบทราบจำนวนวันระยะเวลาตั้งแต่เจ้าหน้าที่อัปโหลดไฟล์เข้าสู่ระบบจนถึงผู้รับบริการดาวน์โหลดไฟล์ที่วัน และยังคงมีไฟล์รายงานที่ยังไม่ได้ดาวน์โหลดจำนวนเท่าใด

3. พัฒนาระบบตามแผนงานที่วางไว้ (Development) ประกอบด้วย 3 ส่วนงาน ได้แก่ 1) พัฒนาระบบฐานข้อมูลจัดการตัวอย่าง (SMIS) เพิ่มเติมเพื่อสามารถรองรับการกำหนดรหัสผ่านให้ผู้รับบริการ โดยใช้โปรแกรมฐานข้อมูลประยุกต์ Microsoft Access 2) พัฒนาระบบฐานข้อมูลใหม่เชื่อมโยงกับระบบ SMIS โดยใช้โปรแกรม Navicat และส่วนที่ต้องพัฒนาขึ้นมาใหม่ โดยใช้โปรแกรม My SQL 3) พัฒนาส่วนการแสดงผล (Graphic User Interface, GUI) ที่ง่ายต่อผู้รับบริการและผู้ใช้งานระบบ โดยเขียนด้วยภาษา PHP ร่วมกับโปรแกรม Brostache

4. ทดสอบระบบ (Testing) หลังจากที่ได้โปรแกรมเมอร์ได้เขียนโปรแกรมตามที่วางแผนไว้ ได้แก่

4.1 ทดสอบฟังก์ชันและประสิทธิภาพของโปรแกรมตามคุณลักษณะที่ได้ออกแบบ และแก้ไขส่วนที่ไม่สอดคล้อง

4.2 ทดสอบด้วยข้อมูลจำลอง และแก้ไขส่วนที่ไม่สอดคล้อง

4.3 ทดสอบด้วยข้อมูลจริง และแก้ไขส่วนที่ไม่สอดคล้อง

5. ติดตั้งระบบเพื่อใช้งานจริง (Implementation and Maintenance) มีขั้นตอน คือ
 - 5.1 สื่อสารระบบงานใหม่ให้ผู้บริหารและผู้ที่เกี่ยวข้องในระบบรับทราบ
 - 5.2 สอนการใช้งานให้กับผู้ปฏิบัติที่เกี่ยวข้อง
 - 5.3 สื่อสารให้ผู้รับบริการทราบ พร้อมจัดทำสื่อแผนปฏิบัติการใช้งาน
 - 5.4 ผู้รับบริการแจ้งความประสงค์ใช้งานระบบ
 - 5.5 เริ่มให้บริการระบบรายงานผลวิเคราะห์หัตถ์ออนไลน์
6. ประเมินความสำเร็จของโครงการ (Evaluation) โดยการสอบถามความพึงพอใจและข้อเสนอแนะจากผู้รับบริการ

ผล

ผลการออกแบบ

ระบบตรวจวิเคราะห์หัตถ์ออนไลน์ เป็นระบบฐานข้อมูลเชิงสัมพันธ์ (Relational database) รองรับการส่งมอบรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ครบทุกห้องปฏิบัติการ เชื่อมโยงกับระบบฐานข้อมูลจัดการตัวอย่าง (Sample Management Information System, SMIS) ของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ เพื่อนำเข้าข้อมูลการรับตัวอย่างมาใช้ เป็นการลดขั้นตอนการบันทึกข้อมูลซ้ำ

การป้องกันการเข้าถึงข้อมูลด้วยรหัสผ่าน (Password Authentication): ฐานข้อมูลผู้ส่งตัวอย่างในระบบ SMIS มีการกำหนดรหัสผ่าน (Password) ให้กับผู้ใช้บริการทุกคน

การป้องกันความผิดพลาดจากการสลับไฟล์ของผู้รับบริการตอนนำเข้าระบบ: เมื่อเจ้าหน้าที่แนบไฟล์ผู้รับบริการจะไม่สามารถเปิดไฟล์ได้และโปรแกรมจะแสดงว่ารหัสผ่านในการเปิดไฟล์ไม่ถูกต้อง ผู้รับบริการจะต้องแจ้งกลับเพื่อนำเข้าไฟล์รายงานผลวิเคราะห์ให้ถูกต้อง

การป้องกันการปลอมแปลงเอกสาร: ภาพรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ที่ส่งมอบผ่านระบบรายงานผลวิเคราะห์หัตถ์ออนไลน์ จะปรากฏลายน้ำ ข้อความ “e-report” ทับลงบนข้อความที่ปรากฏในรายงานผลวิเคราะห์

การกำหนดกลุ่มผู้ใช้งานระบบ: ผู้จัดการระบบ (Administrator) ทำหน้าที่กำหนดประเภทผู้ลงทะเบียนใช้งานอย่างใดอย่างหนึ่ง คือเป็นผู้จัดการระบบ (Administrator) หรือเจ้าหน้าที่รับตัวอย่าง (Sample Custodian) ผู้ที่ได้รับมอบหมายให้ทำหน้าที่อัปโหลดไฟล์เข้าสู่ระบบ หรือผู้รับบริการ (Customer) ซึ่งแต่ละประเภทสามารถเข้าถึงข้อมูลได้ตามสิทธิ์ที่กำหนดไว้

หลักฐานการได้รับรายงานผลวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ: ระบบรายงานผลวิเคราะห์หัตถ์ออนไลน์ บันทึกข้อมูลอัตโนมัติ 2 เหตุการณ์ คือ วันที่และเวลาที่อัปโหลดไฟล์รายงานผลวิเคราะห์ และวันที่และเวลาที่ดาวน์โหลดไฟล์รายงานผลวิเคราะห์ในครั้งแรก และแสดงสารสนเทศเป็นสถานะการส่งมอบรายงานผลวิเคราะห์ ให้ผู้จัดการระบบทราบว่าตัวอย่างหมายเลขวิเคราะห์ใดที่ผู้รับบริการดาวน์โหลดรายงานผลแล้ว หมายเลขวิเคราะห์ใดยังไม่ได้ดาวน์โหลด

ผลการพัฒนาระบบรายงานผลการตรวจวิเคราะห์หัตถ์ออนไลน์

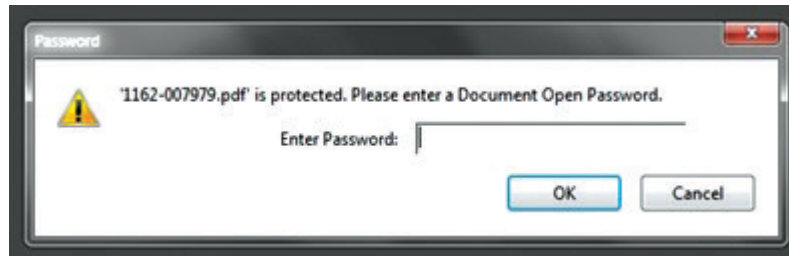
1) การพัฒนาระบบฐานข้อมูลจัดการตัวอย่าง SMIS เพิ่มเติมทำให้สามารถรองรับการกำหนดรหัสผ่านให้ผู้รับบริการ ส่วนที่พัฒนาเพิ่มเติมเชื่อมโยงกับฐานข้อมูลผู้รับบริการ นอกจากใช้ในการบันทึกรหัสผ่านแล้วยังสามารถออกหนังสือส่งรหัสผ่านให้กับผู้รับบริการ รวมทั้งป้องกันการเข้าถึงข้อมูลโดยผู้ไม่ได้รับอนุญาต ดังแสดงในภาพที่ 5

ภาพที่ 5 ตัวอย่างหน้าจอแสดงผลการกำหนดรหัสผ่านระบบรายงานผลวิเคราะห์ออนไลน์

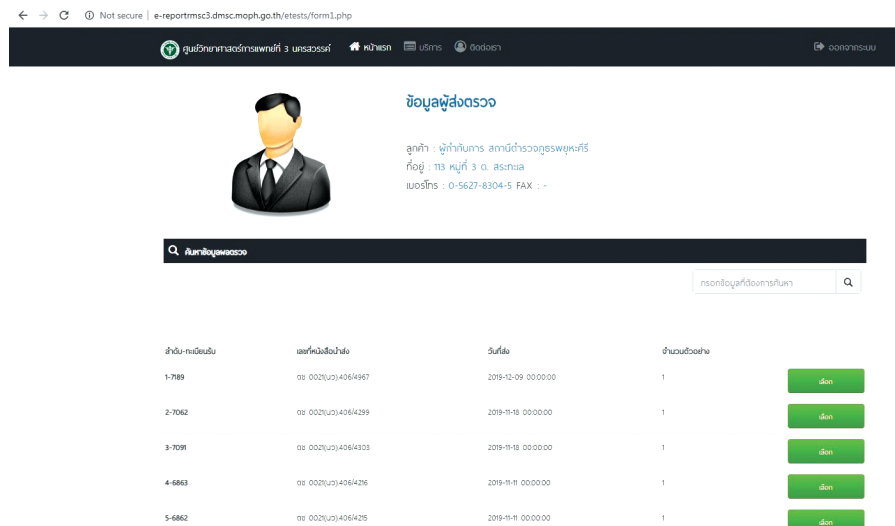
2) การพัฒนาระบบฐานข้อมูลใหม่เชื่อมโยงกับระบบฐานข้อมูล SMIS นำเข้าข้อมูลที่มีอยู่มาใช้ เช่น ข้อมูลผู้รับบริการ ข้อมูลตัวอย่างที่ส่งตรวจ เป็นต้น และพัฒนาฐานข้อมูลใหม่เพื่อจัดเก็บข้อมูลที่เกิดขึ้นใหม่ เช่น ข้อมูลวันที่และเวลาที่อัปโหลดไฟล์เอกสารเข้าสู่ระบบ ข้อมูลวันที่และเวลาที่ดาวน์โหลดเอกสาร เป็นต้น โดยระบบฐานข้อมูลที่พัฒนาขึ้นเป็นระบบฐานข้อมูลเชิงสัมพันธ์ (Relational database)

3) การพัฒนาส่วนการแสดงผล (Graphic User Interface, GUI) มีลักษณะเป็นเว็บแอปพลิเคชัน ผู้รับบริการสามารถเข้าถึงได้ด้วยคอมพิวเตอร์หรือโทรศัพท์มือถือสมาร์ทโฟน มีฟังก์ชันค้นหาในทุกหน้าแสดงผล และเรียงลำดับการแสดงผลข้อมูลตามวันที่ส่งตัวอย่างตรวจวิเคราะห์โดยตัวอย่างที่ส่งล่าสุดจะอยู่บนสุด ทำให้ง่ายและสะดวกต่อผู้รับบริการและผู้ใช้งานระบบส่วนการแสดงผลและภาพรายงานผลวิเคราะห์ที่พิมพ์ออกจากระบบรายงานผลวิเคราะห์ออนไลน์ ดังแสดงในภาพที่ 6 ถึงภาพที่ 9

ภาพที่ 6 จอภาพกำหนดให้ผู้ใช้ใส่ชื่อผู้ใช้และรหัสผ่าน เพื่อป้องกันผู้ไม่มีสิทธิ์เข้าระบบ



ภาพที่ 7 เมื่อจะเปิดไฟล์รายงานผลวิเคราะห์ ผู้ใช้จะต้องใส่รหัสลับ เพื่อการป้องกันผู้อื่นเข้าถึงไฟล์รายงานผลวิเคราะห์



ภาพที่ 8 ผู้รับบริการสามารถเข้าถึงสารสนเทศการนำส่งตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ตลอดทั้งปีของตน ซึ่งจะเรียงลำดับวันที่หลังสุดอยู่ด้านบน และมีฟังก์ชันค้นหา เพื่อให้ผู้รับบริการใช้งานได้สะดวก

ที่ สร 0611/

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์
267 หมู่ 8 นครสวรรค์ ต.เมือง
ร.นครสวรรค์ 60000
26 สิงหาคม 2562

เรื่อง รายงานผลการตรวจวิเคราะห์
ถึงคุณ []
อ้างถึง หนังสือ [] ลงวันที่ 15 สิงหาคม 2562
ถึงที่ส่งมาด้วย รายงานผลการตรวจวิเคราะห์ที่ 1162- 007979 จำนวน 1 แผ่น
ตามที่ส่งมาถึงที่อ้างถึง [] ได้ส่งตัวอย่าง ปัสสาวะ [] จำนวน 1
ตัวอย่าง เมื่อวันที่ 16 สิงหาคม 2562 ให้กับศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ ดำเนินการตรวจวิเคราะห์
บัดนี้ได้ดำเนินการเรียบร้อยแล้วสิ่งที่ส่งมาด้วย
จึงเรียนมาเพื่อทราบ

ขอแสดงความนับถือ
(นางสาวโลล วงศ์จันทา)
นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ รักษาการแทน
ผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์
ปฏิบัติราชการแทนอธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

กลุ่มพันธุศาสตร์ทางพิษฯ งานพิษวิทยา
โทรศัพท์ / โทรสาร 0-5624-5618 ถึง 20

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
267 หมู่ 8 นครสวรรค์ ต.เมือง นครสวรรค์ 60000
โทรศัพท์ 0 5624 5618-20 โทรสาร 0 5624 5617
http://mrocm3.dmsc.moph.go.th e-mail: mrocm3@dmso.moph.go.th

รายงานผลการตรวจวิเคราะห์ เลขที่รายงาน สร 0611/

นามและนามจริง [] วันที่เริ่มส่งมา 16 สิงหาคม 2562
ผู้ส่ง [] วันที่รับทราบ 20 สิงหาคม 2562
รหัสผู้ส่งมา [] วันที่รายงาน 23 สิงหาคม 2562

รายละเอียดตัวอย่าง
ปริมาณสาร [] 20 มิลลิกรัม
ลักษณะบรรจุ [] กระป๋องพลาสติกใส มีฝาปิดแน่นสนิท มีกลิ่นฉุนคล้ายยาเสพติด
ฉลากบรรจุ [] มีข้อความว่า: 13 สิงหาคม 2562
ชื่อ-สกุล [] เพศ: [] อายุ: 38 ปี
หน่วยงานต้นสังกัด []
ลายมือชื่อ: []

ผลการตรวจวิเคราะห์

รายการ	ผลการตรวจ (ในโทรศัพท์ / มือถือ)	วิธีตรวจ
Methamphetamine	พบ 67.8	In-house method SOP 11 02.172 by GC-MS /SPME based on UNODC recommendation method

หมายเหตุ
- รายงานผลการตรวจวิเคราะห์ที่ส่งมาด้วยเป็นรายงานผลการตรวจวิเคราะห์เบื้องต้น ซึ่งอาจมีข้อผิดพลาดได้
- ผลการตรวจวิเคราะห์จะส่งมอบให้ผู้รับทราบภายใน 30 วัน (31) วันทำการ นับจากวันที่ได้รับแจ้งผลการตรวจวิเคราะห์
- หากผู้ส่งมาต้องการข้อมูลเพิ่มเติม กรุณาแจ้งเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องภายใน 30 วัน นับจากวันที่ได้รับแจ้งผลการตรวจวิเคราะห์ มิฉะนั้นจะถือว่าผู้ส่งมาได้รับแจ้งผลการตรวจวิเคราะห์เรียบร้อยแล้ว
- หากผู้ส่งมาต้องการข้อมูลเพิ่มเติม กรุณาแจ้งเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องภายใน 30 วัน นับจากวันที่ได้รับแจ้งผลการตรวจวิเคราะห์ มิฉะนั้นจะถือว่าผู้ส่งมาได้รับแจ้งผลการตรวจวิเคราะห์เรียบร้อยแล้ว

ลงชื่อ [] (นางสาวโลล วงศ์จันทา)
นักวิทยาศาสตร์การแพทย์

ลงชื่อ [] (นางสาวโลล วงศ์จันทา)
นักวิทยาศาสตร์การแพทย์

ลงชื่อ [] (นางสาวโลล วงศ์จันทา)
นักวิทยาศาสตร์การแพทย์

หน้า 1 ของ 1 หน้า
รายงานนี้เป็นของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ หากมีการเปลี่ยนแปลง
จำนวนรายงานนี้ให้ชัดเจน หรือส่งมาบางส่วน โดยไม่ได้รับอนุญาตจากฝ่ายนิติการ
ท่านสามารถดูรายงานฉบับนี้ได้ที่

ภาพที่ 9 ตัวอย่างรายงานผลวิเคราะห์ที่พิมพ์ออกจากระบบรายงานผลวิเคราะห์ออนไลน์ มีลายน้ำป้องกันการปลอมแปลงเอกสาร และเป็นเอกลักษณ์ ของรายงานผลวิเคราะห์ที่พิมพ์ออกจากระบบรายงานผลวิเคราะห์ออนไลน์

ผลการทดสอบระบบรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ออนไลน์

ผลการทดสอบพบทั้งข้อบกพร่องของโปรแกรม (software bug) และความไม่สอดคล้องกับคุณลักษณะที่กำหนดไว้ โดยได้แก้ไขให้ถูกต้อง

ผลการติดตั้งระบบ

การพัฒนาเรียบร้อยแล้วเสร็จ ติดตั้งในคอมพิวเตอร์เซิร์ฟเวอร์ของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ และใช้งานจริง โดยเริ่มให้บริการระบบรายงานผลวิเคราะห์ออนไลน์ เมื่อ 15 มีนาคม พ.ศ. 2562 ผู้รับบริการแจ้งความประสงค์ใช้งานระบบ และสามารถเข้าถึงข้อมูลทางเว็บไซต์ของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ <http://e-reportrm3c.dm3c.moph.go.th/etest/> ดังแสดงในภาพที่ 10



ภาพที่ 10 แบนเนอร์ระบบรายงานผลวิเคราะห์ออนไลน์บนเว็บเพจของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ ที่ผู้รับบริการสามารถเห็นได้อย่างชัดเจน

ผลการประเมินความสำเร็จของโครงการ

ระบบรายงานผลวิเคราะห์ออนไลน์รับประกันว่าได้ส่งมอบรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ทุกตัวอย่างและไฟล์รายงานผลวิเคราะห์ยังคงอยู่ในระบบอย่างน้อย 1 ปี ดังนั้นจึงสามารถแก้ปัญหาเอกสารสูญหายระหว่างการส่งมอบได้ ร้อยละ 100 ผู้รับบริการสามารถดาวน์โหลดมาจัดเก็บไว้ในคอมพิวเตอร์ของตนเอง ลดภาระค่าใช้จ่ายของผู้รับบริการในการขอคัดสำเนาสำเนารายงานผลวิเคราะห์ หลังจากเปิดให้บริการระบบรายงานผลวิเคราะห์ออนไลน์ 6 เดือน (ตั้งแต่ 15 มีนาคม พ.ศ. 2562 ถึง 30 กันยายน พ.ศ. 2562) มีผู้รับบริการสมัครใช้ 100 ราย แยกเป็นภาคเอกชน 39 ราย, ตำรวจ 44 ราย, สำนักงานสาธารณสุขจังหวัด 3 ราย โรงพยาบาล 14 ราย ให้บริการรายงานผลวิเคราะห์ออนไลน์ 1,852 ฉบับ คิดเป็น ร้อยละ 48.2 ของรายงานผลวิเคราะห์ในช่วงเวลาเดียวกัน (3,842 ฉบับ) สามารถลดค่าใช้จ่ายในการส่งทางไปรษณีย์

ลงทะเบียนประมาณ 33,000 บาท เมื่อวิเคราะห์สารสนเทศที่ได้จากระบบรายงานผลวิเคราะห์ออนไลน์ พบว่าระยะเวลาตั้งแต่อัปโหลดไฟล์รายงานจนถึงเวลาผู้รับบริการดาวน์โหลดเอกสาร น้อยที่สุดคือ ไม่เกิน 1 วัน และนานที่สุดคือ 95.4 วัน โดยมีฐานนิยม (Mode) ไม่เกิน 1 วัน ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ระยะเวลาตั้งแต่วันที่อัปโหลดไฟล์รายงานผลวิเคราะห์ถึงเวลาที่ผู้รับบริการดาวน์โหลดเอกสาร

เดือน	จำนวน (ฉบับ)	ระยะเวลาตั้งแต่นำเอกสารขึ้นระบบจนถึงผู้รับบริการดาวน์โหลดเอกสาร (วัน)				
		ค่าสูงสุด (Max)	ค่าเฉลี่ย (Average)	ค่าต่ำสุด (Min)	มัธยฐาน (Median)	ฐานนิยม (Mode)
มี.ค. 2562	0	-	-	-	-	-
เม.ย. 2562	106	95.4	13.5	0.0	6.9	4.0
พ.ค. 2562	371	79.0	11.2	0.0	6.4	1.0
มิ.ย. 2562	160	56.7	11.5	2.1	7.9	0.8
ก.ค. 2562	340	58.2	11.5	0.0	5.8	0.7
ส.ค. 2562	493	38.8	5.1	0.0	3.9	0.0
ก.ย. 2562	383	62.8	7.1	0.0	3.0	0.0
รวม	1,853	130.8	9.2	0.0	4.9	0.0

ผลการสำรวจความพึงพอใจต่อระบบรายงานผลวิเคราะห์ออนไลน์ ช่วงมิถุนายน-กรกฎาคม พ.ศ. 2562 จากผู้รับบริการ 21 ราย ผ่านทางระบบกูเกิลฟอร์ม (Google Form) แยกเป็นหน่วยงานตำรวจ 17 ราย โรงพยาบาล 2 ราย และสำนักงานสาธารณสุข 2 ราย ทุกรายใช้บริการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ณ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ มากกว่า 5 ครั้ง/ปี ผลการวิเคราะห์คะแนนความพึงพอใจกำหนดเป็นแบบมาตราส่วนประมาณค่า (Rating scale) 5 ระดับ พบว่าผู้ตอบแบบสำรวจมีความพึงพอใจต่อระบบรายงานผลวิเคราะห์ออนไลน์ภาพรวม คะแนนเฉลี่ย 4.71 (พึงพอใจร้อยละ 94.3, ระดับมากที่สุด) สิ่งที่ผู้รับบริการพึงพอใจมากที่สุดคือ ระบบความปลอดภัยและการรักษาความลับ คะแนนเฉลี่ย 4.86 (พึงพอใจร้อยละ 97.1, ระดับมากที่สุด) และความสะดวกในการจัดเก็บข้อมูลความลับ คะแนนเฉลี่ย 4.86 (พึงพอใจร้อยละ 97.1, ระดับมากที่สุด) ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การสำรวจความพึงพอใจต่อระบบรายงานผลวิเคราะห์ออนไลน์ ช่วงเดือนมิถุนายน-กรกฎาคม 2562

เรื่อง	คะแนนเฉลี่ย (ร้อยละ)	ระดับความ พึงพอใจ
ระยะเวลาในการรับรายงานผลการตรวจวิเคราะห์	4.67 (93.3)	มากที่สุด
รูปแบบรายงานผลการตรวจวิเคราะห์	4.76 (95.2)	มากที่สุด
ความสะดวกในการจัดเก็บข้อมูล	4.86 (97.1)	มากที่สุด
ระบบความปลอดภัยและการรักษาความลับ	4.86 (97.1)	มากที่สุด
ความสะดวกในการเข้าถึงรายงาน	4.76 (95.2)	มากที่สุด
ภาพรวมความพึงพอใจของท่านต่อระบบ e-report	4.71 (94.3)	มากที่สุด

วิจารณ์

การพัฒนาระบบรายงานผลวิเคราะห์ออนไลน์ เป็นการเปลี่ยนแปลงขั้นตอนการทำงานเพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพการให้บริการ มีความสอดคล้องกับข้อกำหนด ISO/IEC 17025: 2005 ข้อกำหนดที่ 4.10 ระบุว่า ห้องปฏิบัติการต้องมีการปรับปรุงประสิทธิภาพระบบการบริหารอย่างต่อเนื่อง ผ่านการใช้นโยบายคุณภาพ วัตถุประสงค์คุณภาพ ผลการตรวจประเมิน การวิเคราะห์ข้อมูล ปฏิบัติการแก้ไขและปฏิบัติการป้องกัน และการทบทวนระบบบริหาร ซึ่งการทบทวนระบบบริหารของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ให้ความสำคัญกับข้อเสนอแนะผู้รับบริการ เรื่องการลดระยะเวลาให้บริการ นอกจากนี้การพัฒนายังต้องคำนึงถึงการรักษาความลับของผู้รับบริการ (confidentiality) และการปกป้องสิทธิ์ผู้รับบริการ การออกแบบระบบต้องทำให้มั่นใจว่ารายงานผลการตรวจวิเคราะห์จะได้รับการป้องกันและเข้าถึงได้เฉพาะผู้รับบริการที่เป็นเจ้าของรายงานผลวิเคราะห์เท่านั้น ซึ่งนอกจากเป็นข้อกำหนดของ ISO/IEC 17025: 2005 แล้วยังเป็นจริยธรรมของผู้ให้บริการ และเป็นการคุ้มครองข้อมูลส่วนบุคคลตามกฎหมาย

ระบบรายงานผลวิเคราะห์ออนไลน์สามารถรองรับการให้บริการกับผู้รับบริการทุกราย จึงมีความแตกต่างจากระบบอี-รีพอร์ต (e-report) ของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 2 พิษณุโลก ที่รองรับการให้บริการเฉพาะกลุ่มโรงพยาบาล เมื่อเปรียบเทียบกับ การส่งรายงานผลวิเคราะห์ทางไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail) มีความแตกต่างกัน คือ ไฟล์ข้อมูลรายงานผลวิเคราะห์จะจัดเก็บไว้ในคอมพิวเตอร์ของผู้ให้บริการไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail service provider) ข้อมูลที่ยืนยันการได้รับรายงานผลคือ รายงานการเปิดจดหมายไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ ขณะที่ระบบรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ออนไลน์สามารถบันทึกวันที่และเวลาในการดาวน์โหลดรายงานผลวิเคราะห์ ซึ่งจะละเอียดกว่าและไฟล์ข้อมูลที่สำคัญยังคงอยู่ในระบบคอมพิวเตอร์เซิร์ฟเวอร์ของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ ประโยชน์ที่ผู้รับบริการได้จากการใช้ระบบรายงานผลวิเคราะห์ออนไลน์ คือ 1) ได้รับรายงานผลการตรวจวิเคราะห์เร็วขึ้น 2-5 วัน และสามารถเข้าถึงรายงานผลวิเคราะห์ได้ทุกที่ ทุกเวลา 2) มีฐานข้อมูลส่วนตัวที่เก็บประวัติการส่งตัวอย่างทั้งปี หากมีความจำเป็นต้องเก็บข้อมูลไว้ใช้ประโยชน์ ผู้ใช้บริการสามารถจัดเก็บไฟล์ได้ด้วยตนเอง 3) ลดภาระค่าใช้จ่ายในการขอคัดสำเนา กรณีที่ทำเอกสารสูญหาย ซึ่งการพัฒนาบบรายงานผลวิเคราะห์ออนไลน์ ทำให้ไม่มีปัญหาเรื่องรายงานผลวิเคราะห์สูญหายระหว่างการจัดส่ง ลดภาระงานสืบค้นเอกสาร การรับโทรศัพท์และสืบค้นข้อมูลเพื่อตอบคำถามผู้รับบริการเรื่องติดตามการส่งมอบรายงานผลวิเคราะห์ และลดค่าใช้จ่ายจากการส่งรายงานผลวิเคราะห์ทางไปรษณีย์ลงทะเบียน และทำให้มีเทคโนโลยีสารสนเทศห้องปฏิบัติการที่มีความสมบูรณ์ ตั้งแต่ต้นน้ำคือ ขั้นตอนการรับตัวอย่าง กลางน้ำคือ ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ และปลายน้ำคือ ขั้นตอนการส่งมอบรายงานผลการตรวจวิเคราะห์

ขั้นตอนการพัฒนาบบรายงานผลวิเคราะห์ออนไลน์ มีความซับซ้อนในขั้นตอนการพัฒนาฐานข้อมูลใหม่ และต้องนำเข้าข้อมูลจากระบบฐานข้อมูล SMIS ผู้พัฒนาใช้ระบบฐานข้อมูล My SQL โดยใช้โปรแกรม Navicat เป็นเครื่องมือช่วยในการพัฒนา ข้อจำกัดของระบบรายงานผลวิเคราะห์ออนไลน์ คือ การเชื่อมโยงกับระบบฐานข้อมูลจัดการตัวอย่าง SMIS ดังนั้นหากมีการเปลี่ยนแปลงระบบฐานข้อมูลจัดการตัวอย่างหรือยกเลิกการใช้ระบบฐานข้อมูล SMIS จะทำให้ระบบรายงานผลวิเคราะห์ออนไลน์ที่พัฒนานี้ไม่สามารถใช้งานได้หรือหากจะใช้งานต่อต้องทำการปรับปรุงให้สามารถเชื่อมโยงกับระบบฐานข้อมูลการจัดการตัวอย่างด้วย และยังมีขั้นตอนที่ยังไม่เป็นอัตโนมัติ คือ การสแกนภาพรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ต้นฉบับ ให้เป็นอิเล็กทรอนิกส์ไฟล์นามสกุล .pdf และใช้โปรแกรม Adobe Acrobat ในการกำหนดรหัสการเปิดไฟล์ (Encrypt with password) และสร้างลายน้ำ (Watermark) บนภาพรายงานผลวิเคราะห์ ก่อนที่จะอัปโหลดไฟล์เข้าระบบรายงานผลวิเคราะห์ออนไลน์ นอกจากนี้ระบบรายงานผลวิเคราะห์ออนไลน์ที่พัฒนาขึ้น อาจไม่สะดวกสำหรับผู้รับบริการงานรังสีและเครื่องมือแพทย์ เนื่องจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์มีการพัฒนาระบบการให้บริการตรวจคุณภาพและความปลอดภัยของเครื่องเอกซเรย์ที่เป็นระบบฐานข้อมูลกลาง เพื่อให้หน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการอนุญาตใช้รังสีทางการแพทย์ได้ใช้ประโยชน์ร่วมกัน ผู้รับบริการจะต้องแจ้งความประสงค์

ให้บริการไปจนถึงได้รับรายงานผลการตรวจวิเคราะห์คุณภาพและความปลอดภัยของเครื่องเอกซเรย์โดยผ่านระบบนี้ กรณีดังกล่าวเป็นประเด็นที่ควรพิจารณาสำหรับการพัฒนาระบบใหม่ใด ๆ หากพัฒนาระบบของกระบวนการย่อย (Sub Process) โดยไม่ได้พิจารณาวิเคราะห์ภาพรวมการให้บริการ อาจกระทบทั้งผู้ปฏิบัติและผู้รับบริการ อาจสูญเสียเวลาและงบประมาณ หากการพัฒนาระบบกระบวนการย่อยไม่สอดคล้องกับกระบวนการในภาพรวม

นอกจากนี้ยังพบว่าผู้รับบริการภาคเอกชนแจ้งความประสงค์ใช้ระบบรายงานผลวิเคราะห์ออนไลน์ค่อนข้างน้อย โดยเฉพาะผู้รับบริการที่มาใช้บริการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการปีละครั้ง จะประสงค์ใช้ระบบการรายงานแบบเดิม คือ การส่งรายงานทางไปรษณีย์ ผู้รับบริการที่ให้ความสนใจแจ้งความประสงค์ใช้บริการระบบรายงานผลวิเคราะห์ออนไลน์มากที่สุด คือ สถานีตำรวจและโรงพยาบาล ซึ่งส่งตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการเป็นประจำ ดังนั้นการประชาสัมพันธ์เชิญชวนควรมุ่งเน้นผู้รับบริการที่ใช้บริการเป็นประจำและส่งตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการมากที่สุด 10 อันดับแรกก่อน จะทำให้โครงการนี้เกิดประสิทธิผลมากที่สุด และหากมีการพัฒนาระบบแจ้งเตือนให้ผู้รับบริการทราบว่าศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ ได้มีการส่งมอบรายงานผลวิเคราะห์ในระบบรายงานผลวิเคราะห์ออนไลน์เรียบร้อยแล้ว จะทำให้ผู้รับบริการได้รับทราบข้อมูลข่าวสารที่ครบถ้วนและมีความประทับใจในการบริการมากยิ่งขึ้น สำหรับผู้รับบริการที่เป็นโรงพยาบาลซึ่งมีหลายแผนกงานที่ใช้บริการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ เช่น แผนกพยาธิวิทยาคลินิก แผนกเอกซเรย์ ประกอบกับรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ถือเป็นความลับของผู้ป่วย กรณีนี้ควรกำหนดชื่อผู้ใช้และรหัสผ่านมากกว่า 1 ผู้ใช้ (User) ให้แก่หน่วยงานดังกล่าว

อย่างไรก็ตาม เพื่อให้ระบบรายงานผลวิเคราะห์ออนไลน์เป็นที่ยอมรับ และเปลี่ยนจากการส่งมอบรายงานผลวิเคราะห์ต้นฉบับเป็นอิเล็กทรอนิกส์ไฟล์สู่การรายงานผลที่เป็นดิจิทัล (digital report) หน่วยงานควรกำหนดขั้นตอนการรายงานผลวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการที่เป็นระบบอิเล็กทรอนิกส์ หรือออกประกาศรองรับทางกฎหมาย รวมถึงการปฏิบัติตามกฎหมายที่เกี่ยวข้อง เช่น ลายเซ็นอิเล็กทรอนิกส์ (e-signature) ต้องปฏิบัติตามพระราชบัญญัติธุรกรรมอิเล็กทรอนิกส์ เป็นต้น เพื่อให้รายงานผลวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการในระบบอิเล็กทรอนิกส์มีผลตามกฎหมาย นอกจากนี้หากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์มีระบบฐานข้อมูลกลาง ทุกหน่วยงานใช้ระบบเดียวกัน จะเป็นประโยชน์ด้านการจัดการข้อมูลในภาพรวมของประเทศ และผู้รับบริการจะไม่สับสนในการใช้บริการไม่ว่าจะไปใช้บริการที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ใดหรือที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ การส่งมอบรายงานผลวิเคราะห์จะเป็นระบบเดียวกัน

สรุป

ระบบรายงานผลวิเคราะห์ออนไลน์ เป็นการเปลี่ยนแปลงขั้นตอนการส่งมอบรายงานผลวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ จากรายงานผลวิเคราะห์ที่เป็นกระดาษให้เป็นรายงานผลวิเคราะห์อิเล็กทรอนิกส์ เปลี่ยนจากการส่งมอบรายงานผลวิเคราะห์ทางไปรษณีย์เป็นการส่งมอบในระบบฐานข้อมูลให้ผู้รับบริการสามารถเข้าถึงได้ตลอดเวลา ทำให้ผู้รับบริการสามารถเข้าถึงรายงานผลวิเคราะห์ทันทีที่ได้อัปโหลดไฟล์เข้าสู่ระบบ คือ ภายใน 1 วัน หลังจากที่ได้รับอนุมัติเร็วกว่าการส่งมอบทางไปรษณีย์ลงทะเลเบียน 2-5 วัน และเป็นการปรับปรุงประสิทธิภาพการให้บริการและระบบบริหารคุณภาพ โดยยังคงรักษาความลับและปกป้องสิทธิ์ของผู้รับบริการ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 2 พิษณุโลก ที่กรุณาให้เข้าศึกษาดูงานระบบการรายงานผลวิเคราะห์อี-รีพอร์ต (e-report)

เอกสารอ้างอิง

1. มาตรฐานระยะเวลาการฝากส่งถึงปลายทางเป็นอย่างไร. ใน: คำถามที่พบบ่อย. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 15 เม.ย. 2563]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://www.thailandpost.co.th/คำถามที่พบบ่อย.html>.
2. Tutorials Point Simply Easy Learning. SDLC-waterfall model. [online]. 2019; [cited 2019 Sep 25]; [3 screens]. Available from: URL: https://www.tutorialspoint.com/sdlc/sdlc_waterfall_model.htm.
3. Gupta P, Mata-Toledo RA, Monger MD. Database development life cycle. Rom Econ Bus Rev 2011; 5(1): 8-17.

Improvement of Laboratory Service of Regional Medical Science Center 3 Nakhonsawan with Online Laboratory Reporting System

Lomsalai Wongchanta¹ Wasu Bumrungchaichana¹ Kittichand Juntorn² Parichat Kanyaboon¹
and Wichayada Woothiadirek¹

¹Regional Medical Science Center 3 Nakhonsawan, Department of Medical Science, Amphoe Meung,
Nakhonsawan 60000

²TOT Public Company Limited, Chaengwattana Road, Lak si, Bangkok 10210, Thailand

ABSTRACT The Regional Medical Sciences Center 3, Nakhonsawan carried out satisfaction survey in 2017 and found that customers would like to receive the laboratory analysis report faster. Since laboratory testing time cannot be reduced, then we are trying to improve the reporting process by developing an Online Laboratory Reporting System. The aim of improvement is to deliver laboratory report quickly and solve the problem of postal delivery lost. We started studying the strengths of the network reporting system, developing a new system with Waterfall Model process and linking it to the existing Sample Management Information System (SMIS). The new system emphasized customer right protection and confidentiality. It was successful and implemented on 15 March 2019. The evaluation result after 6 months of service had 100 applicants and these included private customer (39), police (44), provincial public health offices (3) and hospitals (14). A total of 1,852 reports approved between 15 March and 30 September 2019 were delivered within 1 day after approval, allowing customers to receive reports 2–5 days faster than postal mail. The time from report upload to report download by customer were between 1 day and 95.4 days and the mode was less than 1 day. It solved the problem of postal delivery lost and reduced postal service costs approximately 33,000 Baht. The results of the Online Laboratory Reporting System satisfaction survey from 21 customers was the highest level satisfaction with score 4.71 out of 5. The most satisfaction were security, confidentiality and convenience of data storage.

Keywords: Laboratory report, On-line service, Continuous improvement, Customer focus, ISO/IEC

17025

การเปรียบเทียบวิธีการเฝ้าระวังยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ในการควบคุมโรคไข้เลือดออก

จิราภรณ์ เสวงนา บุษราคัม สีนาคม และบุญเสริม อ่วมอ่อง

กองโรคติดต่อทางแมลง กรมควบคุมโรค ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ โรคไข้เลือดออกเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทยมายาวนานมากกว่าทศวรรษ หนึ่งในมาตรการสำคัญที่ใช้ในการป้องกันควบคุมโรคคือการเฝ้าระวังยุงลายซึ่งเป็นพาหะ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบการเฝ้าระวังยุงลาย 3 วิธี คือ การสำรวจลูกน้ำยุงลาย การสำรวจยุงตัวเต็มวัย และการสำรวจไข่ยุงลาย ในพื้นที่ชุมชนบ้านท่าแดง หมู่ที่ 7 ตำบลจำปา อำเภอกาญจนบุรี จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ซึ่งมีลักษณะบ้านที่หลากหลาย ประกอบด้วยบ้านเดี่ยว 1 และ 2 ชั้น, ทาวน์โฮม 2 ชั้น และบ้านสวน ผลการศึกษาพบว่าบ้านทุกลักษณะที่สำรวจพบทั้งไข่ยุงลายในกับดักไข่ยุงลายโอเทรป ลูกน้ำยุงลาย และยุงตัวเต็มวัยภายในบ้าน แสดงว่าลักษณะบ้านไม่มีผลต่อการพบไข่ยุง ลูกน้ำ และตัวยุงลาย เมื่อเปรียบเทียบวิธีการเฝ้าระวังยุงลายทั้ง 3 วิธี พบว่าการใช้กับดักไข่ยุงลายโอเทรปซึ่งนำมาใช้ดำเนินการเฝ้าระวังมีประสิทธิภาพดีที่สุด สะดวกต่อการปฏิบัติงาน ประหยัดเวลาและงบประมาณ ลดภาระงานของเจ้าหน้าที่สาธารณสุข สามารถเก็บแผ่นไข่ยุงลายและนำกลับมารวณนับที่ห้องปฏิบัติการได้ ซึ่งจะทำให้ทราบจำนวนยุงลายที่แท้จริงที่จะเกิดขึ้นในอนาคต สามารถนำไปวิเคราะห์หาพื้นที่เสี่ยงด้านระบาดวิทยา และกำหนดมาตรการในการควบคุมยุงลายในพื้นที่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ : กับดักไข่ยุง, ยุงลายบ้าน, การเฝ้าระวัง, การสำรวจยุง, โรคไข้เลือดออก

Corresponding author E-mail: jira.ento@gmail.com

Received: 11 January 2021

Revised: 3 February 2021

Accepted: 25 February 2021

บทนำ

โรคไข้เลือดออก (Dengue Hemorrhagic Fever, DHF) เป็นโรคประจำถิ่น (Endemic area) ของประเทศไทย ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี (Dengue virus) โดยมียุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) และยุงลายสวน (*Ae. albopictus*) เป็นพาหะ ทั้งนี้มีรายงานว่าพบการติดเชื้อไวรัสเดงกีในยุงลายบ้านและยุงลายสวนในธรรมชาติสูงถึงร้อยละ 37.75⁽¹⁾ โดยมีแนวโน้มของจำนวนผู้ป่วยในระยะยาวสูงขึ้นเรื่อยๆ รวมทั้งพบผู้ป่วยได้ทุกเดือนตลอดทั้งปี แม้ในช่วงนอกฤดูการระบาดก็ยังคงพบผู้ป่วยไม่น้อยกว่า 500–1,000 รายต่อเดือน และอาจสูงมากถึง 20,000–30,000 ราย ในช่วงที่มีการระบาดรุนแรง โดยเฉลี่ยพบผู้ป่วย 60,000 รายต่อปี ส่วนปีที่ระบาดจะมีรายงานผู้ป่วยมากถึง 100,000 รายขึ้นไป⁽²⁾ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีมาตรการการเฝ้าระวังและควบคุมยุงลายพาหะนำโรคไข้เลือดออก โดยหลักการป้องกันและควบคุมยุงลายพาหะนำโรคที่สำคัญ ได้แก่ ป้องกันคนไข้และคนปกติไม่ให้ถูกยุงกัด กำจัดยุงและลูกน้ำลดแหล่งเพาะพันธุ์ไม่ให้ยุงสามารถแพร่พันธุ์เพิ่มความหนาแน่นได้⁽³⁾ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2515 องค์การอนามัยโลก (WHO) แนะนำการเฝ้าระวังยุงลายโดยการสำรวจด้วยวิธี Visual Larval Survey⁽⁴⁾ กระทรวงสาธารณสุขใช้ดำเนินการในพื้นที่คือ การสำรวจลูกน้ำยุงลาย โดยใช้ค่า House Index (HI) คือ ร้อยละของบ้านที่สำรวจพบลูกน้ำยุงลาย และค่า Container Index (CI) คือ ร้อยละของภาชนะซึ่งน้ำที่พบลูกน้ำยุงลาย เป็นเกณฑ์ในการแบ่งพื้นที่เสี่ยง⁽⁵⁾ และเก็บตัวอย่างยุงลายเพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสในยุงลายกรณีเกิดการระบาด แต่การสำรวจลูกน้ำยุงลายและการจับยุงลายต้องใช้เวลา งบประมาณ และกำลังคนเป็นจำนวนมาก ซึ่งปัจจุบันเจ้าหน้าที่สาธารณสุขมีภาระงานที่ต้องรับผิดชอบหลายหน้าที่ ทำให้ดำเนินการสำรวจลูกน้ำยุงลายไม่เป็นไปตามแผนการดำเนินงานที่กำหนดไว้ ดังนั้นเพื่อหาวิธีการที่สะดวก ประหยัดเวลา และสะดวกต่อการปฏิบัติงาน จึงทดลองนำวิธีการเฝ้าระวังยุงลายพาหะนำโรคไข้เลือดออก โดยการใช้กับดักไข่ยุงลายเปรียบเทียบกับวิธีการสำรวจลูกน้ำยุงลายและวิธีการจับยุงลายที่ใช้เป็นมาตรการหลักในการเฝ้าระวังโรคไข้เลือดออกในปัจจุบัน เพื่อหาวิธีการและมาตรการใหม่ๆ มาใช้ในการเฝ้าระวังและควบคุมยุงลายในต่างประเทศกับดักไข่ยุงลายมีหลากหลายรูปแบบที่นำมาใช้ในการป้องกันและควบคุมยุงลาย เช่น Novel lethal ovitrap, In2care trap, Gravid ovitrap, Ticino ovitrap และ Typical ovicup trap เป็นต้น สืบเนื่องจากการเกิดปัญหาไข้เลือดออกได้ระบาดไปหลายภูมิภาคทั่วโลก รวมถึงประเทศไทยด้วย ผู้เชี่ยวชาญของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์และบริษัท อีคาร์ เทรตติ้ง (ประเทศไทย) จำกัด จึงได้ร่วมกันพัฒนาผลิตภัณฑ์ “กับดักไข่ยุงสีโอแทรป (LeO-Trap)” โดยได้ขึ้นบัญชีนวัตกรรมไทย รหัส 140003 ชื่อสามัญของผลงานนวัตกรรมไทยว่า กับดักไข่ยุง (Lethal ovitrap) ชื่อทางการค้าของผลงานนวัตกรรมไทยว่า กับดักไข่ยุงสีโอแทรป (LeO-Trap) ซึ่งกับดักไข่ยุงสีโอแทรปใช้หลักการคือพัฒนาสารดึงดูดยุงลาย ชื่อ Carpet Shell Plus ซึ่งเป็นการผสมสารสกัดจากหอยลายกับสารสังเคราะห์เลียนแบบสารจากธรรมชาติ ล่อให้ยุงลายเข้ามาวางไข่ในกับดัก เป็นการตัดตอนไม่ให้มีปริมาณยุงเพิ่มขึ้นจนกระทั่งหมดไป โดยที่ในกับดักไข่ยุงสีโอแทรปจะใช้สารกำจัดลูกน้ำยุงลายชนิดเกล็ดซีโอไลท์กำจัดตัวอ่อนยุง โดยสรุปประสิทธิภาพของกับดักไข่ยุง คือ 1) ช่วยลดปริมาณการแพร่พันธุ์ของยุง 2) ลดการใช้สารกำจัดลูกน้ำยุงที่ใส่น้ำตามบ้านเรือน 3) ลดพื้นที่การใช้สารกำจัดลูกน้ำยุงในภาชนะและสิ่งแวดล้อม⁽⁶⁾ ณ ปัจจุบันการใช้ทรายที่มีฟอสฟอรัสกำจัดลูกน้ำยุงลายใส่ลงไปในน้ำใช้ประชาชนบางส่วนไม่ให้การยอมรับ เนื่องจากมีผลทำให้น้ำใช้มีกลิ่นสารเคมีเมื่อนำน้ำไปอุปโภคและบริโภค นอกจากนี้ยังมีรายงานการต้านทานของลูกน้ำยุงลายต่อทรายที่มีฟอสฟอรัสในบางพื้นที่⁽⁷⁾ จึงจำเป็นต้องหาวิธีการลดการใช้ทรายที่มีฟอสฟอรัสในน้ำใช้ เพื่อให้ประชาชนยอมรับและดำเนินการควบคุมยุงลายให้เกิดประสิทธิภาพ

ดังนั้น กองโรคติดต่อฯ โดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข จึงมีความประสงค์ทดลองเปรียบเทียบวิธีการเฝ้าระวังยุงลายพาหะนำโรคไข้เลือดออก 3 วิธีการ ได้แก่ 1) การสำรวจลูกน้ำยุงลาย 2) การจับยุงลายตัวเต็มวัย 3) การใช้กับดักไข่ยุงสีโอแทรปที่ชุมชนบ้านท่าแดง หมู่ที่ 7 ตำบลจำปา อำเภอนาทวี จังหวัดน่าน เพื่อกำหนดวิธีการเฝ้าระวังยุงลายที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการปฏิบัติงานต่อไป

วัสดุและวิธีการ

พื้นที่ศึกษา

คัดเลือกหมู่บ้านเพื่อเปรียบเทียบวิธีการเฝ้าระวังยุงลายพาหะนำโรคไข้เลือดออก ได้แก่ ชุมชนบ้านท่าแดง หมู่ที่ 7 ตำบลจำปา อำเภอนาทวี จังหวัดพระนครศรีอยุธยา เนื่องด้วยมีรายงานผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกในพื้นที่ โดยมีลักษณะบ้านเรือนและสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน ได้แก่ บ้านเดี่ยว 2 ชั้น บ้านเดี่ยว 1 ชั้น บ้านเป็นร้านค้า บ้านทาวน์โฮม 2 ชั้น และบ้านสวนที่มีบริเวณส่วนตัว

วิธีการสำรวจและเฝ้าระวังยุงลายพาหะนำโรคไข้เลือดออก

ประกอบด้วย 3 วิธีการ ได้แก่

วิธีการที่ 1 การสำรวจลูกน้ำยุงลาย โดยการสุ่มสำรวจลูกน้ำยุงลายโดยใช้ไฟฉายส่อง (Visual larval survey) จำนวน 80 หลังคาเรือน ช่วงเวลาดำเนินการและติดตามประเมินผลระหว่างเดือนมิถุนายน - กันยายน พ.ศ. 2561 รวมระยะเวลา 4 เดือน

วิธีการที่ 2 การสำรวจยุงลายตัวเต็มวัย โดยการสุ่มจับยุงลายด้วยสวิงจับ (Sweep nets) จำนวน 30 หลังคาเรือน ช่วงเวลาดำเนินการและติดตามประเมินผลระหว่างเดือนมิถุนายน - กันยายน พ.ศ. 2561 รวมระยะเวลา 4 เดือน

วิธีการที่ 3 การสำรวจไข่ยุงลาย โดยการวางกับดักไข่ยุงสีโอเทรปภายในบ้านจำนวน 2 กับดักต่อหลังคาเรือน ทั้งหมดจำนวน 80 หลังคาเรือน โดยเริ่มวางกับดักไข่ยุงสีโอเทรปเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2561 และติดตามประเมินผลระหว่างเดือนกรกฎาคม - กันยายน พ.ศ. 2561 รวมระยะเวลาดังกล่าวกับดัก 4 เดือน

การคำนวณหาปริมาณยุงลายตัวเต็มวัยที่จะลดลงจากการวางกับดักไข่ยุงสีโอเทรป โดยคิดว่ายุงลาย เพศเมียต่อเพศผู้ = 1:1 และเพศเมีย 1 ตัว สามารถวางไข่ตลอดชีวิตได้ 500 ฟอง ดังนั้น ใช้สูตรของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์⁽⁸⁾

$$\text{จำนวนยุงลายที่ลดลง} = \frac{\text{จำนวนไข่ยุงลายทั้งหมดที่พบในกับดัก}}{2} \times 500$$

การสำรวจลูกน้ำยุงลาย จับยุงลาย และตรวจนับไข่ยุงลายภายในกับดักไข่ยุงสีโอเทรป

การสำรวจลูกน้ำยุงลายดำเนินการเดือนละ 1 ครั้ง เป็นระยะเวลา 4 เดือน สุ่มสำรวจลูกน้ำยุงลายโดยใช้ไฟฉายส่อง (Visual larval survey) ตามภาชนะซึ่งน้ำทุกภาชนะภายในบ้านและภาชนะซึ่งน้ำบริเวณนอกบ้าน พร้อมทั้งตรวจนับจำนวนภาชนะซึ่งน้ำที่สำรวจทั้งหมดที่พบลูกน้ำยุงลายและไม่พบลูกน้ำยุงลาย ทำการบันทึกผลการสำรวจลงในแบบฟอร์มการสำรวจลูกน้ำยุงลาย

การสำรวจยุงลายตัวเต็มวัย ดำเนินการจับยุงลายเดือนละ 1 ครั้ง เป็นระยะเวลา 4 เดือน สุ่มจับยุงลายด้วยสวิงจับ (Sweep nets) จำนวน 30 หลังคาเรือน โดยใช้สวิงจับยุงลายภายในบ้านตามราวตากผ้า มุ้ง ที่นอน ตู้เสื้อผ้า มุมมืดภายในบ้าน เป็นเวลา 20 นาทีต่อหลังคาเรือน แยกเพศยุงลายและตรวจนับจำนวนยุงลายทั้งหมดที่จับได้ ทำการบันทึกผลการจับยุงลายลงในแบบฟอร์มการจับยุงลาย

การสำรวจไข่ยุงลาย ทำการวางกับดักไข่ยุงสีโอเทรปภายในบ้านจำนวน 2 กับดักต่อหลังคาเรือน ทั้งหมดจำนวน 80 หลังคาเรือน โดยเริ่มวางกับดักไข่ยุงสีโอเทรปเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2561 และติดตามประเมินผลระหว่างเดือนกรกฎาคม - กันยายน พ.ศ. 2561 เป็นระยะเวลา 3 เดือน ตรวจนับไข่ยุงลายภายในกับดักไข่ยุงสีโอเทรป เดือนละ 1 ครั้ง ทำการบันทึกผลการสำรวจลงในแบบฟอร์มการสำรวจไข่ยุงลาย พร้อมทั้งเปลี่ยนน้ำภายในกับดักไข่ยุงสีโอเทรป และเติมเกลือดีไอโอไลท์ใหม่ทุกครั้งที่ทำสำรวจ

การประเมินค่าใช้จ่ายในการเฝ้าระวังยุงพาหะนำโรคไข้เลือดออก 3 วิธี

ในการประเมินค่าใช้จ่าย ใช้อัตราเบี้ยเลี้ยงตามระเบียบราชการ ค่าใช้จ่ายอื่นประเมินตามราคาที่ยั่งยืนจริงในปี พ.ศ. 2561

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การสำรวจลูกน้ำยุงลาย โดยนำจำนวนลูกน้ำยุงลายที่สำรวจมาคำนวณหาค่า House Index (HI) คือ ร้อยละของบ้านที่สำรวจพบลูกน้ำยุงลาย และค่า Container Index (CI) คือ ร้อยละของภาชนะซึ่งน้ำที่พบลูกน้ำยุงลาย

การสำรวจยุงลายตัวเต็มวัย นำจำนวนยุงลายที่จับได้มาคำนวณหาค่าเฉลี่ยยุงลายที่พบต่อหลังคาเรือน และหาค่าร้อยละของบ้านที่พบยุงลาย และหาค่าเฉลี่ยจำนวนยุงต่อบ้านที่พบยุง

การสำรวจไข่ยุงลาย นำจำนวนไข่ยุงลายมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยไข่ยุงลายที่พบต่อกับดัก หาค่าร้อยละกับดักที่พบไข่ยุงลาย ค่าร้อยละของบ้านที่พบไข่ยุงลาย และหาค่าเฉลี่ยไข่ยุงต่อบ้านที่พบไข่ยุง

การเปรียบเทียบลักษณะบ้านที่มีผลต่อการพบไข่ยุงลาย ลูกน้ำยุงลาย และยุงลายตัวเต็มวัย ด้วย 3 วิธีการ โดยการวิเคราะห์ทางสถิติแบบ One-Way ANOVA โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics 26 โดยมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\text{-value} < 0.05$

ผล

จากการเปรียบเทียบวิธีการเฝ้าระวังยุงลายพาหะนำโรคไข้เลือดออก 3 วิธีการ ได้แก่ การสำรวจลูกน้ำยุงลาย การจับยุงลายตัวเต็มวัย และการวางกับดักไข่ยุงลายโอแทรป พบว่าวิธีการที่ 1 ก่อนวางกับดักไข่ยุงลายในเดือนมิถุนายน มีจำนวนบ้านที่พบลูกน้ำยุงลายร้อยละ 39.76 หลังจากวางกับดักไข่ยุงลายในเดือนกันยายน จำนวนบ้านที่พบลูกน้ำยุงลายลดลงเหลือร้อยละ 28.13 สำหรับภาชนะที่พบลูกน้ำยุงลายในบ้านลดลงจากร้อยละ 19.28 เหลือร้อยละ 12.50 ภาชนะนอกบ้านลดลงจากร้อยละ 24.10 เหลือร้อยละ 17.19 ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการสำรวจลูกน้ำยุงลายด้วยวิธีการสุ่มสำรวจลูกน้ำยุงลายโดยใช้ไฟฉายส่อง (Visual larval survey)

เดือน	จำนวน บ้านสำรวจ ลูกน้ำ	จำนวน บ้าน พบลูกน้ำ	%บ้าน พบลูกน้ำ (HI) ¹	จำนวนภาชนะ ในบ้าน พบลูกน้ำ	%ภาชนะในบ้าน พบลูกน้ำ (CI) ²	จำนวนภาชนะ นอกบ้าน พบลูกน้ำ	%ภาชนะ นอกบ้าน พบลูกน้ำ (CI) ²
มิถุนายน	83	33	39.76	16	19.28	20	24.10
กรกฎาคม	83	30	36.14	16	19.28	19	22.89
สิงหาคม	75	22	29.33	8	10.67	16	21.33
กันยายน	64	18	28.13	8	12.50	11	17.19

1. HI หมายถึง ร้อยละของบ้านที่สำรวจพบลูกน้ำยุงลาย
2. CI หมายถึง ร้อยละของภาชนะซึ่งน้ำที่พบลูกน้ำยุงลาย

วิธีการที่ 2 การสำรวจยุงลายตัวเต็มวัย ในเดือนมิถุนายนจับยุงลายตัวเต็มวัยได้ร้อยละ 100 พบยุงลายตัวเต็มวัยในบ้านทั้ง 30 หลังคาเรือนที่สุ่มจับยุงลายตัวเต็มวัย แต่หลังจากได้วางกับดักไข่ยุงลายโอแทรป จำนวนบ้านที่พบยุงตัวเต็มวัยในเดือนกรกฎาคม - กันยายน ลดลงเหลือร้อยละ 76.67, 53.33 และ 53.33 ตามลำดับ ซึ่งปริมาณของยุงลาย

ที่จับได้ทั้งหมดในเดือนมิถุนายน จำนวน 296 ตัว แต่เดือนกรกฎาคม – กันยายน ปริมาณยุงลายที่จับได้ทั้งหมดลดลงเหลือ 89, 80 และ 88 ตัว (ลดลงร้อยละ 69.93, 72.97 และ 70.27 ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับเดือนมิถุนายน ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการสำรวจยุงลายตัวเต็มวัยโดยใช้สวิงโฉบ (Sweep nets)

เดือน	จำนวนบ้านสำรวจตัวยุง	จำนวนบ้านพบตัวยุง	%บ้านพบตัวยุง	จำนวนยุงที่จับได้ (ตัว)		
				ตัวเมีย	ตัวผู้	รวม
มิถุนายน	30	30	100.00	145	151	296
กรกฎาคม	30	23	76.67	39	50	89
สิงหาคม	30	16	53.33	33	47	80
กันยายน	30	16	53.33	47	41	88

วิธีการที่ 3 การสำรวจไขยุงลายด้วยกับดักไขยุงลีโอแทรป เมื่อพิจารณาปริมาณยุงลายที่เข้ามาวางไข่ในกับดักไขยุงลีโอแทรป ระยะเวลา 1 เดือนแรก พบว่ามียุงลายเข้ามาวางไข่ภายในกับดักไขยุงลีโอแทรปเพียงร้อยละ 24.10 จำนวนไขยุง 1,178 ฟอง แต่เดือนที่ 2 และเดือนที่ 3 ยุงลายเข้ามาวางไข่ภายในกับดักไขยุงลีโอแทรปเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 72.67 และร้อยละ 76.56 และมีจำนวนไขยุงลายที่พบจำนวน 4,395 ฟอง และ 3,217 ฟอง เมื่อคำนวณหาปริมาณยุงลายตัวเต็มวัยที่จะลดลงจากการวางกับดักไขยุงลายลีโอแทรป พบว่า เดือนที่ 1 จะสามารถลดยุงลายได้จำนวน 294,500 ตัว เดือนที่ 2 จะสามารถลดยุงลายได้จำนวน 1,098,750 ตัว และในเดือนที่ 3 จะสามารถลดยุงลายได้จำนวน 804,250 ตัว ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการสำรวจไขยุงลายโดยใช้กับดักไขยุงลีโอแทรป LeO-Trap

เดือน	จำนวนบ้านสำรวจไขยุง	จำนวนบ้านพบไขยุง	%บ้านพบไขยุง	%กับดักพบไขยุง	ค่าเฉลี่ยไขยุงที่พบต่อกับดัก (ฟอง)	ไข่ที่พบ (ฟอง)	ยุงลายที่จะลดลง (ตัว)
กรกฎาคม	83	27	32.53	24.10	29.45	1,178	294,500
สิงหาคม	75	64	85.33	72.67	40.32	4,395	1,098,750
กันยายน	64	55	85.94	76.56	33.52	3,217	804,250

เมื่อเปรียบเทียบบ้านทั้ง 3 วิธีการ ได้แก่ 1) การสำรวจลูกน้ำยุงลาย 2) การสำรวจยุงลายตัวเต็มวัย และ 3) การสำรวจไขยุงด้วยกับดักไขยุงลีโอแทรป พบว่าจำนวนบ้านที่สำรวจพบลูกน้ำยุงลดลง และจำนวนบ้านที่พบลูกน้ำยุงจะลดลงในเดือนถัดไป หลังวางกับดักไขยุงลาย เช่นเดียวกับบ้านที่ทำการสำรวจยุงตัวเต็มวัยจะจับยุงตัวเต็มวัยได้น้อยลงในเดือนถัดไปหลังจากได้ทำการวางกับดักไขยุงลาย แต่กลับพบปริมาณไขยุงลายภายในกับดักไขยุงลีโอแทรปเพิ่มขึ้นในเดือนถัดไปเมื่อวางกับดักในเดือนที่ 1, 2 และ 3 และเมื่อเปรียบเทียบการสำรวจบ้านที่พบลูกน้ำยุงลาย ยุงลายตัวเต็มวัย และไขยุงลายด้วยวิธีการ 3 แบบ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

การประเมินค่าใช้จ่ายในการเฝ้าระวังยุงพาหะไข้เลือดออกทั้ง 3 วิธี พบว่าวิธีการสำรวจยุงลายจะใช้เวลามากที่สุด ค่าใช้จ่ายรวมต่อปีก็มากที่สุด ส่วนวิธีการสำรวจไข่ยุงลายโดยใช้กับดักไข่ยุงสีโอแตรจะใช้เวลาน้อยกว่าและค่าใช้จ่ายรวมต่อปีน้อยที่สุด ผลลัพธ์ที่ได้จากการสำรวจแต่ละวิธีแตกต่างกัน การสำรวจลูกน้ำจะไม่ได้จำนวนเชิงปริมาณ ลูกน้ำต่างจากการสำรวจยุงและการสำรวจไข่ยุง ซึ่งได้ทราบจำนวนยุงเฉลี่ยต่อบ้านที่พบยุงเท่ากับ 6.5 ตัวต่อบ้าน และจำนวนไข่ยุงเฉลี่ย 60.2 ฟองต่อบ้านที่พบไข่ยุง ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การประเมินค่าใช้จ่ายในการเฝ้าระวังยุงพาหะไข้เลือดออก 3 วิธี

วิธีการ	จำนวนทีมปฏิบัติงาน	จำนวนบ้านที่สำรวจ	จำนวนวันปฏิบัติงาน	เบี้ยเลี้ยง* (บาท)	ค่าน้ำมัน (บาท)	รวมค่าใช้จ่ายต่อ 1 ครั้ง (บาท)	ค่าใช้จ่าย 4 ครั้งต่อปี (บาท)	ค่าวัสดุอุปกรณ์ ต่อปี (บาท)	รวมค่าใช้จ่ายต่อปี (บาท)	ผลลัพธ์ค่าเฉลี่ยจำนวนยุงหรือไข่ยุงต่อบ้าน***
1. สำรวจลูกน้ำด้วย Visual larval survey	4 (ทีมละ 2 คน)	80 หลัง (ทีมละ 20 หลัง/วัน)	1	1,920	2,000 (รถตู้)	3,920	15,680	2,500 (ไฟฉาย + ทรายที่มีฟอส)	18,180	ไม่มี
2. สำรวจยุงลายด้วยสวิง	2 (ทีมละ 4 คน)	80 หลัง (ทีมละ 20 หลัง/วัน)	2	3,840	4,000 (รถตู้)	7,840	31,360	4,500 (สวิง+คัพยุง + ทรายที่มีฟอส)	35,860	6.5 ตัว
3. สำรวจไข่ยุงด้วยกับดักสีโอแตร	2 (ทีมละ 2 คน)	80 หลัง (ทีมละ 20 หลัง/วัน)	1	960	1,250 (รถยนต์ 4 ประตู)	2,210	6,630	8,000 (กับดักไข่ยุง** 160 อัน)	14,630	60.2 ฟอง

หมายเหตุ : * ค่าเบี้ยเลี้ยงวันละ 240 บาท/คน-วัน

** กับดักไข่ยุงมีอายุการใช้งานอย่างน้อย 3 ปี ราคา 150 บาทต่อกับดัก

*** ค่าเฉลี่ยต่อบ้านที่พบยุงหรือไข่ยุง

วิจารณ์

จากการเปรียบเทียบ 3 วิธีการ ได้แก่ วิธีการที่ 1 การสำรวจลูกน้ำยุงลาย วิธีการที่ 2 การสำรวจยุงลาย และวิธีการที่ 3 การสำรวจไข่ยุงลาย ในการเฝ้าระวังยุงลายในพื้นที่ชุมชนบ้านท่าแดง หมู่ที่ 7 ตำบลจำปา อำเภอบางละมุง จังหวัดชลบุรี ซึ่งมีลักษณะของบ้านที่หลากหลาย เช่น บ้านเดี่ยว 2 ชั้น, บ้านเดี่ยว 1 ชั้น, บ้านเป็นร้านค้า, บ้านทาวน์โฮม 2 ชั้น และบ้านสวนที่มีบริเวณส่วนตัว พบว่าบ้านทุกลักษณะสำรวจพบทั้งไข่ยุงลายในกับดักไข่ยุงสีโอแตร ลูกน้ำยุง และยุงตัวเต็มวัยภายในบ้าน แสดงว่าลักษณะบ้านไม่มีผลต่อการพบไข่ยุง ลูกน้ำ และตัวยุงลาย เมื่อเริ่มวางกับดักไข่ยุงสีโอแตรในเดือนมิถุนายน พบว่าผลการสำรวจลูกน้ำยุงลายตั้งแต่เดือนกรกฎาคม - กันยายน จำนวนบ้านที่สำรวจพบลูกน้ำยุงลายภายในบ้านลดลง เช่นเดียวกับการจับยุงลายตัวเต็มวัยในเดือนกรกฎาคม - กันยายน จับยุงลายได้จำนวนลดลงอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงก่อนการวางกับดักไข่ยุงสีโอแตรในเดือนมิถุนายน และการสำรวจไข่ยุงลายในกับดักไข่ยุงสีโอแตร หลังจากวางกับดักไข่ยุงลาย 1 เดือน พบว่ายุงลายเข้ามาวางไข่ภายในกับดักไข่ยุงสีโอแตรเพิ่มมากขึ้นในเดือนกรกฎาคม - กันยายน ซึ่งวิธีการที่ 3 สามารถนำมาใช้ในการเฝ้าระวังยุงลายได้ดี เนื่องจากการปฏิบัติงานสะดวก ช่วยลดจำนวนเจ้าหน้าที่ในการสำรวจลูกน้ำยุงลายและจับยุงลายตัวเต็มวัย ประหยัด

ค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานเฝ้าระวังยุงลาย เพียงนำกับดักไข่ยุงสีโอเทรปไปวางไว้ภายในบ้านจำนวน 2 กับดัก ที่บริเวณตู้เสื้อผ้า ราวตากผ้า หรือใต้บันได ซึ่งกับดักไข่ยุงสีโอเทรปจะดึงดูดให้ยุงลายตัวเต็มวัยมาวางไข่ภายในกับดักหากมียุงลายตัวเต็มวัยอาศัยอยู่ภายในบ้าน การใช้กับดักไข่ยุงสีโอเทรปช่วยลดขั้นตอนการปฏิบัติงานในการสำรวจลูกน้ำยุงลาย และการจับยุงลายตัวเต็มวัย และลดจำนวนบุคลากรที่ปฏิบัติงานลงไปถึงครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับการสำรวจลูกน้ำยุงลาย และการจับยุงลายตัวเต็มวัย โดยทำการเก็บแผ่นไข่และเปลี่ยนแผ่นไข่ใหม่ภายในกับดักทุก 5 วัน พร้อมทั้งเปลี่ยนน้ำและเติมเกลือดีซีโอไลท์หรือทรายที่มีฟอสฟอรัสกำจัดลูกน้ำยุงลาย แล้วนำแผ่นไข่กลับมาตรวจนับที่ห้องปฏิบัติการ สามารถนำข้อมูลไข่ยุงลายที่สำรวจพบมาวิเคราะห์ความชุกชุมของยุงลาย วางแผนกำหนดมาตรการเชิงรุกให้มีประสิทธิภาพในการควบคุมยุงลายได้สะดวกรวดเร็วยิ่งขึ้น นอกจากนี้กับดักไข่ยุงยังสามารถลดจำนวนยุงลายลงได้ หลังจากวางกับดักไข่ยุงลายในเดือนที่ 1 สามารถลดจำนวนยุงลายได้ 294,500 ตัว เดือนที่ 2 สามารถลดจำนวนยุงลายลงได้ถึง 1,098,750 ตัว และในเดือนที่ 3 สามารถลดจำนวนยุงลายลงได้ 804,250 ตัว ดังแสดงในตารางที่ 3 สอดคล้องกับการศึกษาการประยุกต์ใช้ดักไข่ยุงเพื่อลดความหนาแน่นของยุงลายในพื้นที่ระบาดของโรคไข้เลือดออก จังหวัดสงขลา ที่ศึกษาในชุมชนที่พักอาศัย ชุมชนแออัด และชุมชนพาณิชย์ จำนวน 108 หลังคาเรือน ทำการวางกับดัก 36 หลังคาเรือนต่อชุมชนใน 4 รูปแบบ พบว่าค่าดัชนีลูกน้ำยุงลาย (HI) ก่อนวางกับดัก คิดเป็นร้อยละ 58.33 เมื่อวางทิ้งไว้ 4 วัน ยุงลายเข้ามาวางไข่ในกับดักไข่ยุง ร้อยละ 95.33 และ ค่า HI ลดลงเหลือร้อยละ 20.37 อัตราการพบไข่ยุงในกับดัก ร้อยละ 67.43 เฉลี่ย 47.90 ฟอง/กับดัก โดยสามารถดักจับไข่ยุงลายได้ทั้งหมด 16,765 ฟอง ผลการวางกับดักไข่ยุง “LeO-Trap” 4 รูปแบบ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ⁽⁹⁾ และจากการศึกษาเปรียบเทียบพัฒนาการรูปแบบและสารดึงดูดของกับดักไข่ยุงสีโอเทรปต่อยุงลายบ้านและยุงลายสวน พบว่า LeO-Trap-V2 ดึงดูดยุงลายบ้านให้มาวางไข่เฉลี่ย 519.1 ฟอง มากกว่า LeO-Trap-V1 ที่ดึงดูดยุงลายบ้านให้มาวางไข่เฉลี่ย 268.6 ฟอง และ LeO-Trap-V2 ดึงดูดยุงลายสวนให้มาวางไข่เฉลี่ย 431.6 ฟอง มากกว่า LeO-Trap-V1 ที่ดึงดูดยุงลายสวนให้มาวางไข่เฉลี่ย 268.6 ฟอง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ⁽¹⁰⁾ นอกจากนี้ในต่างประเทศก็มีการนำกับดักไข่ยุงลายมาใช้ในการเฝ้าระวังโรคไข้เลือดออกเช่นกัน จากการเฝ้าระวังยุงพาหะนำโรคไข้เลือดออกโดยการแบ่งพื้นที่ตามจำนวนประชากรด้วยการใช้กับดักไข่ยุงลายของประเทศไต้หวัน โดยการวางกับดักไข่ยุงลายในพื้นที่เสี่ยงสูงเป็นระยะเวลา 14 สัปดาห์ พบว่ายุงลายบ้านตัวเมียเข้ามาวางไข่ภายในกับดักในบ้านมากกว่านอกบ้านแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นการสำรวจไข่ยุงลายจึงนำมาวิเคราะห์การวางไข่ของยุงลายตลอดทั้งปีในการกระจายเชิงพื้นที่ของยุงลายบ้านเพื่อหาความสัมพันธ์ย้อนหลัง 14 สัปดาห์ กับอุบัติการณ์ไข้เลือดออกเพื่อวางแผนการควบคุมยุงลายเชิงรุกอย่างมีประสิทธิภาพ⁽¹¹⁾ และการศึกษาการเฝ้าระวังโดยใช้กับดักไข่กับยุงลายบ้านและยุงลายสวนในพื้นที่ระบาดของโรคไข้เลือดออกในชุมชน Keramat และชุมชน Shah Alam รัฐ Selangor ประเทศมาเลเซีย ปี 2016 พบว่าดัชนีการวางไข่ในกับดักของยุงลายบ้านและยุงลายสวนยังอยู่ในเกณฑ์ที่สูงทั้งบริเวณในบ้านและบริเวณนอกบ้าน ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่ายุงลายบ้านและยุงลายสวนสามารถวางไข่ภายในภาชนะเดียวกันอีกได้ด้วย⁽¹²⁾ และการใช้กับดัก autocidal gravid ovitrap (กับดัก CDC-AGO) เพื่อควบคุมและป้องกันการระบาดของยุงลายบ้านในภาคสนามที่พื้นที่เขตเมือง 2 แห่ง ทางตอนใต้ของเปอร์โตริโก เป็นระยะเวลา 1 ปี พบว่ายุงลายบ้านตัวเมียลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และการวางกับดัก AGO จำนวน 3-4 กับดัก/บ้าน สามารถป้องกันการแพร่ระบาดของยุงลายบ้านได้ถึง 81% ซึ่งคาดว่ายุงลายบ้านจะเพิ่มขึ้นหลังจากฝนตก การจับยุงโดยใช้กับดักจับ BG-Sentinel และ AGO มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อวิเคราะห์เชิงบวกจะเห็นว่ากับดัก AGO เป็นอุปกรณ์เฝ้าระวังยุงที่มีประโยชน์และราคาไม่แพง การใช้กับดัก AGO ในการจัดการยุงลายบ้านควรใช้ร่วมกันกับวิธีการอื่น ๆ เช่น การลดแหล่งเพาะพันธุ์ของยุงลาย การกำจัดลูกน้ำยุงลาย และการใช้เทคนิคทำหมันยุง เป็นต้น⁽¹³⁾ เมื่อเปรียบเทียบวิธีการเฝ้าระวังยุงลายทั้ง 3 วิธีการ จะเห็นได้ว่าการนำกับดักไข่ยุงสีโอเทรปมาใช้ดำเนินการเฝ้าระวังมีประสิทธิภาพดี สะดวกต่อการปฏิบัติ ประหยัดเวลา สามารถลดภาระงานของเจ้าหน้าที่สาธารณสุข และประหยัดงบประมาณในการดำเนินงานเฝ้าระวังยุงลาย ดังแสดงในตารางที่ 4 เนื่องจากการสำรวจลูกน้ำยุงลายต้องใช้คนและการสำรวจ

ต่อหลังคาเรือนเป็นเวลานานเพื่อที่จะดูที่ภาชนะซึ่งน้ำให้ครอบคลุม เช่นเดียวกันกับวิธีการสำรวจยุงลายตัวเต็มวัยที่ต้องใช้คนจับยุงลายตัวเต็มวัยจำนวนมาก ใช้เวลาจับยุงลายตัวเต็มวัย 20 นาทีต่อหลังคาเรือน ต้องใช้เงินงบประมาณจำนวนมากในการดำเนินงาน แต่การใช้กับดักไข่ยุงสีโอแทร์ปสามารถลดภาระงานของเจ้าหน้าที่สาธารณสุข เพียงนำกับดักไข่ยุงสีโอแทร์ปไปวางไว้ภายในบ้านประชาชนสำหรับเฝ้าระวังยุงลายเป็นเวลา 3-5 วัน และทำการเก็บแผ่นไข่มาตรวจนับจำนวนไข่ยุงลาย แล้วนำข้อมูลไข่ยุงลายที่สำรวจพบภายในกับดักไข่ยุงสีโอแทร์ปมาวิเคราะห์หาความชุกชุมของยุง และกำหนดมาตรการเชิงรุกในการควบคุมยุงลายในพื้นที่ได้อย่างมีประสิทธิภาพและสะดวกรวดเร็วมากยิ่งขึ้น

ในการศึกษานี้ เนื่องจากได้นำกับดักไข่ยุงสีโอแทร์ปไปทดลองใช้จริงในบ้านของประชาชนเป็นครั้งแรก จึงไม่ได้ใส่แผ่นกระดาษสำหรับให้ยุงลายวางไข่ ทำให้นับจำนวนไข่ยาก จึงแนะนำว่าควรใส่แผ่นกระดาษหรือแผ่นฟองน้ำสำหรับให้ยุงลายวางไข่ภายในกับดัก แล้วเก็บแผ่นไข่กลับมามาตรวจนับที่ห้องปฏิบัติการ และควรเปลี่ยนน้ำทุกครั้งที่เก็บแผ่นไข่ พร้อมทั้งเติมเกลือดีซีโอไลท์หรือทรายที่มีฟอสฟอรัสกำจัดลูกน้ำยุงลายทุกครั้ง เพราะในตัวกับดักมีสารดึงดูดล่อให้ยุงลายเข้ามาวางไข่ในกับดักได้ตลอดเวลา นอกจากนี้ยังมีแมลงและสัตว์ชนิดอื่นเข้ามากินซากยุงลายและไข่ยุงลายภายในกับดักด้วย เช่น แมลงสาบ แมงมุม จิ้งจก กบ อึ่งอ่าง และคางคก เป็นต้น ทำให้น้ำสกปรก และควรให้ความรู้และทำความเข้าใจกับชาวบ้านด้วยว่ากับดักไข่ยุงสีโอแทร์ปช่วยลดลูกน้ำยุงลายกับยุงลายตัวเต็มวัยก็จริง แต่เจ้าของบ้านยังต้องเก็บหรือทำลายภาชนะซึ่งน้ำอื่นที่ไม่ใช่แล้วด้วย เพื่อไม่ให้ยุงลายไปวางไข่ในภาชนะซึ่งน้ำอื่นๆ ได้ นอกจากนั้นควรมีการนำกับดักไข่ยุงชนิดนี้ไปขยายผลเพื่อการประเมินผลในพื้นที่อื่น รวมถึงศึกษาผลกระทบในการใช้กับดักไข่ยุงต่อการควบคุมโรคติดต่อมาโดยยุงลายในระยะยาวต่อไป

สรุป

จากการเปรียบเทียบ 3 วิธีการ ในการเฝ้าระวังยุงลาย ได้แก่ การสำรวจลูกน้ำยุงลาย การสำรวจยุงลายตัวเต็มวัย และการสำรวจไข่ยุงลายโดยใช้กับดักไข่ยุงสีโอแทร์ป พบว่าการสำรวจไข่ยุงลายโดยใช้กับดักไข่ยุงสีโอแทร์ปให้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุด ทั้งประหยัดเวลาและงบประมาณ อีกทั้งกับดักไข่ยุงสีโอแทร์ปยังช่วยกำจัดลูกน้ำยุงลายที่ฟักออกจากไข่ เพราะในกับดักได้เติมเกลือดีซีโอไลท์สำหรับกำจัดลูกน้ำยุงลายไว้แล้ว จึงช่วยลดจำนวนลูกน้ำยุงลายและยุงลายตัวเต็มวัยในบ้านที่วางกับดักไข่ให้มีจำนวนลดลงด้วย นอกจากนี้การวางกับดักไข่ยุงยังสามารถลดภาระงานของเจ้าหน้าที่สาธารณสุขในการป้องกันควบคุมโรคไข้เลือดออกเชิงรุกได้อย่างดี

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่โรงพยาบาลท่าเรือ และอาสาสมัครสาธารณสุข (อสม.) หมู่ที่ 7 ตำบลจำปา อำเภوتاเรือ จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ซึ่งให้ความร่วมมือและช่วยเหลือในการเก็บข้อมูลเป็นอย่างดีตลอดการติดตามและประเมินผล การเปรียบเทียบวิธีเฝ้าระวังยุงลายพาหะนำโรคไข้เลือดออกในภาคสนาม

เอกสารอ้างอิง

1. อุษาดี ถาวรระ, พายุ ภักดีนวน, อภิวัฏ ธวัชสิน, จักรวาล ชมภูศรี, ชญาดา ขำสวัสดิ์, ยุทธนา ภูทรัพย์ และคณะ. ชีวิตวิทยาของยุงพาหะโรคไข้เลือดออกและซีโรทัยปของเชื้อไวรัสเดงกีในวงจรการเกิดโรคในประเทศไทย. ว กรมวิทย พ 2558; 57(2): 186-96.
2. กองโรคติดต่อมาโดยแมลง กรมควบคุมโรค. แนวทางและมาตรฐานการสำรวจลูกน้ำยุงลาย เพื่อการเฝ้าระวังโรคติดต่อมาโดยยุงลาย. [ออนไลน์]. 2562; [สืบค้น 2 เม.ย. 2563]; [11 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://drive.google.com/drive/folders/1mV8KoK6a64X8t2kGp7mHCYp0z6WxQSS>.

3. คู่มือวิชาการโรคติดต่อเฉียบพลันและโรคไข้เลือดออกเฉียบพลันด้านการแพทย์และสาธารณสุข. นนทบุรี: สำนักโรคติดต่อ นำโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข; 2558.
4. World Health Organization. A system of world-wide surveillance for vectors = système de surveillance mondiale des vecteurs. Wkly Epidemiol Rec 1972; 47(07): 73-80.
5. กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. รายงานพยากรณ์โรคไข้เลือดออก ปี 2562. [ออนไลน์]. 2562; [สืบค้น 2 เม.ย. 2563]; [53 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://ddc.moph.go.th/uploads/ckeditor/6f4922f45568161a8cdf4ad2299f6d23/files/Dangue/Prophecy/2562.pdf>.
6. บัญชีนวัตกรรมไทย สำนักงานประมาณ. กักตักไข่ยุง (Lethal Ovitrap). [ออนไลน์]. 2559; [สืบค้น 7 ม.ค. 2563]; [4 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <http://164.115.33.180/innovation/PDF/14000002.pdf>.
7. กองโรคติดต่อ นำโดยแมลง กรมควบคุมโรค. รายงานประจำปี 2562. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 24 ก.ย. 2563]; เข้าถึงได้ที่: URL: https://ddc.moph.go.th/dvb/journal_detail.php?publish=7341.
8. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. การป้องกันกำจัดยุงลายสาเหตุโรคไข้เลือดออก ชีวคุณนยา และใช้ชีกา. [วิดีโอออนไลน์]. 2563; เข้าถึงได้ที่ URL: <https://www.youtube.com/watch?v=yYfQe-AXGHs>.
9. ชุติศักดิ์ โมลิโต, สุวิษ ธรรมปาโล, โสภณดี มูลเมฆ, ธาธิยา เสาวรัญ, บัลลังก์ อุปพงษ์. การประยุกต์ใช้กับดักไข่ยุง “LeO-Trap” เพื่อลดความหนาแน่นของยุงลายในพื้นที่ระบาดของโรคไข้เลือดออก จังหวัดสงขลา. วกรรมวิทย์ พ 2563; 62(1): 6-15.
10. Tawatsin A, Thavara U, Srivarom N, Siriyasatien P, Wongtitirote A. LeO-Trap®: a novel lethal ovitrap developed from combination of the physically attractive design of the ovitrap with biochemical attractant and larvicide for controlling *Aedes aegypti* (L.) and *Ae. albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae). Biomed J Sci & Tech Res 2019; 21(5): 16183-92.
11. Wu HH, Wang CY, Teng HJ, Lin C, Lu LC, Jian SW, et al. A dengue vector surveillance by human population-stratified ovitrap survey for *Aedes* (Diptera: Culicidae) adult and egg collections in high dengue-risk areas of Taiwan. J Med Entomol 2013; 50(2): 261-9.
12. A NA, AK MA, WA N, HL L. Ovitrap surveillance of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in dengue endemic areas in Keramat and Shah Alam, Selangor in 2016. IIUM Med J Malaysia 2018; 17(3): 59-64.
13. Barrera R, Amador M, Acevedo V, Caban B, Felix G, Mackay AJ. Use of the CDC autocidal gravid ovitrap to control and prevent outbreaks of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol 2014; 51(1): 145-54.

Comparison of Surveillance Methods for *Aedes aegypti* for Dengue Haemorrhagic Fever Control

Jiraporn Sevana Bussarakum Sinakom and Boonserm Aumaung

Vector Borne Diseases Division, Department of Disease Control, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Dengue haemorrhagic fever (DHF) has been an important public health problem of Thailand for over six decades. One of major strategies to prevent and control the disease is surveillance of disease vectors, *Aedes* mosquitoes. This study aimed to compare three methods for *Aedes* surveillance system: larval survey, adult survey and oviposition survey. The study was carried out in Ban Tha Daeng community, village No.7, Champa Subdistrict, Tha Ruea District, Ayutthaya Province, Thailand. The study area has different types of houses compose of concrete single houses (one-and two-story), 2-story town homes and detached houses with garden. It was found that there was no significant difference in appearance of *Aedes* mosquito eggs among the three types of houses ($p > 0.05$). However, the oviposition survey for *Aedes* mosquito eggs using LeO-Trap was the most effective method for *Aedes* surveillance among the test methods. It was quite easy to apply in the area and could save time and budget for operation of health officers. The numbers of eggs deposited in traps could be counted and estimated for populations of further generations of *Aedes* mosquitoes that could be occurred in the future. It also could be useful for further risk assessment of epidemiology and effective control for the mosquitoes in the areas.

Keywords: Ovitraps, *Aedes aegypti*, Surveillance, Mosquito survey, Dengue haemorrhagic fever

วิธีลดปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช ตกค้างในผักและผลไม้

รติยากร ศรีโคตร และวิชาดา จงมีวาสนา

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การตกค้างของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในผักและผลไม้เป็นปัจจัยหนึ่งที่อาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพอนามัยของผู้บริโภค งานวิจัยนี้ได้ศึกษาวิธีลดปริมาณการตกค้างของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช โดยทำการศึกษาลดปริมาณการตกค้างในส้ม ด้วยการล้างน้ำและการปอกเปลือก ส่วนการศึกษาในผักใช้ตัวอย่างผัก 8 ชนิด ได้แก่ บรอกโคลี คะน้า บวบเหลี่ยม ถั่วฝักยาว มะเขือเปราะ พริกชี้ฟ้า ผักบุ้ง และเห็ด เพื่อศึกษาลดปริมาณการตกค้างด้วยการต้ม ทำการตรวจวิเคราะห์ก่อนและหลังกระบวนการ ลดปริมาณสารตกค้างด้วยวิธี AOAC Official Method 2007.01 ขอบข่ายการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มออร์กาโนคลอรีน (OCs) 21 ชนิด กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส (OPs) 24 ชนิด และกลุ่มสารสังเคราะห์ไพรีทรอยด์ (SPs) 8 ชนิด รวมทั้งสิ้น 53 ชนิด และตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี วิธีการดังกล่าวมีขีดจำกัดของการตรวจพบเท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และมีขีดจำกัดของการตรวจวัดเชิงปริมาณเท่ากับ 0.03 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ผลการศึกษา พบว่าการล้างน้ำและการปอกเปลือกสามารถลดปริมาณสารตกค้างได้ตั้งแต่ 14-96% และ 100% ตามลำดับ การต้มผักสามารถลดปริมาณสารตกค้างได้ตั้งแต่ 29-100% ดังนั้นวิธีการดังกล่าวสามารถช่วยลดความเสี่ยงของผู้บริโภคที่จะได้รับสารตกค้างเข้าสู่ร่างกายได้

คำสำคัญ: สารกำจัดศัตรูพืชตกค้าง, ผักผลไม้, วิธีลดปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้าง

Corresponding author E-mail: rattiyakorn.s@dmasc.mail.go.th

Received: 10 August 2020

Revised: 24 November 2020

Accepted: 15 February 2021

บทนำ

ผักผลไม้จัดเป็นหนึ่งในอาหารหลัก 5 หมู่ของคนไทย เป็นแหล่งของสารอาหารที่จำเป็นต่อร่างกาย โดยเฉพาะวิตามินและเกลือแร่ชนิดต่าง ๆ ช่วยในเรื่องระบบขับถ่าย ช่วยบำรุงสายตา⁽¹⁾ เป็นปัจจัยหนึ่งที่ช่วยให้สุขภาพร่างกายแข็งแรง การรับประทานผักและผลไม้ช่วยลดปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดโรคต่าง ๆ องค์การอนามัยโลกแนะนำให้ควรบริโภคผักและผลไม้อย่างน้อย 400 กรัมต่อวัน⁽²⁾ เพื่อลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหัวใจและมะเร็งบางชนิด แต่จากรายงานการเฝ้าระวังการตรวจวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชของห้องปฏิบัติการของสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ได้ดำเนินการอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ปี พ.ศ. 2550 จนถึงปัจจุบันพบว่าผักผลไม้ที่ผลิตภายในประเทศยังตรวจพบการตกค้างของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในปริมาณที่สูงอยู่⁽³⁾ จึงทำให้ผู้บริโภคเกิดความกังวลในความไม่ปลอดภัยของผักผลไม้ ถึงแม้ว่าการประเมินความปลอดภัยของผู้บริโภคโดยสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ได้ดำเนินการศึกษาปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่คนไทยได้รับการบริโภคอาหาร (Total Diet Study)⁽⁴⁾ ซึ่งเป็นการประเมินการได้รับสัมผัสสารพิษที่องค์การอนามัยโลกยอมรับว่าเป็นการศึกษาที่ใกล้เคียงความเป็นจริงเพื่อใช้ประเมินความเสี่ยงของคนไทย ในช่วงตั้งแต่ปี พ.ศ. 2544-2560 คนไทยยังปลอดภัยจากการได้รับสารพิษตกค้างจากบริโภคอาหาร ผู้บริโภคสามารถลดความเสี่ยงของการได้รับสารตกค้างได้ ซึ่งมีรายงานบทความวิจัยในต่างประเทศเกี่ยวกับวิธีลดปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในผัก โดยการศึกษาผลของการลดปริมาณด้วยวิธีการล้างน้ำ การล้างด้วยน้ำยาล้างผักผลไม้ การล้างด้วย sodium bicarbonate และการทำ ultrasonic cleaning⁽⁵⁾ และในประเทศไทยมีรายงานบทความสำหรับเผยแพร่ความรู้ให้กับประชาชนเกี่ยวกับวิธีลดปริมาณสารตกค้างในผักและผลไม้โดยวิธีต่าง ๆ ที่ได้รับความนิยม เช่น การล้างผักผลไม้ด้วยน้ำเกลือ การล้างด้วยน้ำส้มสายชู การแช่น้ำด่างทับทิม และการล้างด้วยน้ำปูนใส⁽⁶⁾ แต่อาจยังไม่ครอบคลุมงานวิจัยจากห้องปฏิบัติการทดสอบทางวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับวิธีลดปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช ด้วยภารกิจของสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ คือ การคุ้มครองผู้บริโภคด้านอาหาร นอกจากเฝ้าระวังอันตรายที่ผู้บริโภคอาจได้รับสารพิษตกค้างในอาหารแล้ว การหาแนวทาง แนะนำ ป้องกัน ตรวจวิเคราะห์ ในการลดสารพิษตกค้างในอาหารเพื่อสร้างความรู้ให้กับประชาชน ดังนั้นจึงได้ศึกษาผลของกระบวนการลดปริมาณการตกค้างของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในผักและผลไม้ก่อนการบริโภค ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกวิธีอย่างง่าย เป็นวิธีที่ใช้ในครัวเรือน และเป็นวิธีที่ใช้สำหรับบริโภคจริง เช่น การปอกเปลือก การล้างน้ำ หรือการต้ม โดยใช้ส้มเป็นตัวแทนของผลไม้ในการศึกษา เพราะส้มเป็นผลไม้ที่มีอัตราการตรวจพบการตกค้างของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชสูง⁽⁷⁾ และเป็นผลไม้ที่นิยมรับประทาน โดยส้มที่นำมาศึกษาเป็นตัวอย่างส้มในโครงการสำรวจการตกค้างของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชและการปนเปื้อนจุลินทรีย์ดื้อสารต้านจุลชีพในผลส้ม โดยศึกษาปริมาณการตกค้างของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชตกค้างในส้มก่อนและหลังล้างน้ำ โดยวิเคราะห์ส้มทั้งเปลือกในตัวอย่างส้มจำนวน 10 ตัวอย่าง และศึกษาผลของการลดปริมาณการตกค้างของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในส้มไม่ล้างน้ำก่อนและหลังปอกเปลือก ในตัวอย่างส้มจำนวน 20 ตัวอย่าง ตัวอย่างผักที่นำมาทำการศึกษา มาจากโครงการประเมินความเสี่ยงการได้รับสัมผัสสารเคมีและสารปนเปื้อนที่คนไทยได้รับการบริโภค (Total Diet Study) โดยทำการเก็บตัวอย่างผักสดจากตลาดค้าส่ง หรือศูนย์กระจายสินค้าในแต่ละจังหวัด ทำการตรวจวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในตัวอย่างผักสดที่เป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่มตัวอย่างจำนวน 8 กลุ่มตัวอย่าง ได้แก่ บรอกโคลี คะน้า บวบเหลี่ยม ถั่วฝักยาว มะเขือเปราะ พริกชี้ฟ้า ผักบุ้ง และเห็ดรวม ซึ่งเป็นผักที่คนไทยบริโภคในปริมาณมาก⁽⁸⁾ เป็นแหล่งของใยอาหาร และมีสารโพลีฟีนอล ซึ่งช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรค หรือชะลอความรุนแรงของโรคต่าง ๆ ได้ โดยทำการตรวจวิเคราะห์ผักสดที่ไม่ล้าง ตัดแต่งเอาเฉพาะส่วนที่รับประทานได้มาวิเคราะห์ก่อนต้มและหลังต้ม เพื่อศึกษาผลของการลดปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผักและผลไม้ และเพื่อเผยแพร่สื่อสารข้อมูลทางวิชาการแก่สาธารณะ

วัสดุและวิธีการ

วิธีที่นำมาทดสอบนี้ เป็นวิธีที่พัฒนามาจาก AOAC Official Method 2007.01⁽⁹⁾ ซึ่งเป็นวิธีที่ผ่านการทดสอบความถูกต้องของวิธี และเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างผักและผลไม้ของสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ได้รับรองความสามารถตามระบบคุณภาพมาตรฐาน ISO/IEC 17025: 2017 ของสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการอย่างต่อเนื่อง มีการควบคุมคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ทั้งภายใน (internal quality control) และการควบคุมคุณภาพภายนอก (external quality control) ขอบข่ายการตรวจวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชจำนวนทั้งสิ้น 53 ชนิด ได้แก่ สารกลุ่มออร์กาโนคลอรีนจำนวน 21 ชนิด สารกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสจำนวน 24 ชนิด และสารกลุ่มสารสังเคราะห์ไพรีทรอยด์จำนวน 8 ชนิด ทำการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรมิเตอร์ (GC-MS/MS)

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี: acetonitrile PR, glacial acetic acid AR, n-hexane PR, ethyl acetate AR, magnesium sulfate anhydrous (MgSO_4) AR, sodium acetate (NaOAc) AR, mixture of 150 mg MgSO_4 , 50 mg primary secondary amine (PSA) and 50 mg graphite carbon black (GCB) (dispersive 2 ml pig and fats, AOAC, W/CH ยี่ห้อ Agilent), mixture of 150 mg MgSO_4 50 mg primary secondary amine (PSA) 50 mg graphite carbon black (GCB) and 50 mg C18EC (silica type irregular particles 40-63 micron, 6 angstroms, lot number 98106-BH), acetonitrile + 1% acetic acid: ตวง acetonitrile มาประมาณ 200 มิลลิลิตร เติม acetic acid 2.5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย acetonitrile จนครบ 250 มิลลิลิตร ใน volumetric flask, น้ำกลั่น

สารมาตรฐาน: สารมาตรฐานทั้งหมดเป็นผลิตภัณฑ์ของ Dr. Ehrenstorfer ซึ่งเป็นชนิดเดี่ยว (single standard) กลุ่มออร์กาโนคลอรีน (organochlorine compounds) OCs จำนวน 21 สาร ได้แก่ aldrin, α -BHC, α -chlordane, chlorothalonil, γ -chlordane, oxy-chlordane, pp'-DDE, pp'-TDE, pp'-DDT, dicofol, dieldrin, endrin, α -endosulfan, β -endosulfan, endosulfan sulfate, heptachlor, heptachlor epoxide, hexachlorobenzene, lindane, methoxychlor และ tetradifon กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส (organophosphorus compounds) OPs จำนวน 24 สาร ได้แก่ acephate, azinphos-methyl, chlorpyrifos, dichlorvos, diazinon, dicrotophos, dimethoate, EPN, ethion, fenitrothion, malathion, methamidophos, methidathion, mevinphos, monocrotophos, omethoate, parathion, parathion-methyl, phosalone, pirimiphos-methyl, profenofos, propargite, prothiophos, และ triazophos กลุ่มสารสังเคราะห์ไพรีทรอยด์ (synthetic pyrethroids) SPs จำนวน 8 สาร ได้แก่ bifenthrin, cyfluthrin, lambda-cyhalothrin, cypermethrin, deltamethrin, fenpropathrin, fenvalerate และ permethrin

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องชั่งความละเอียด 0.001 กรัม สำหรับชั่งตัวอย่าง, เครื่องชั่งความละเอียด 0.01 มิลลิกรัม สำหรับชั่งสารมาตรฐาน, เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรมิเตอร์ (GC-MS/MS), เครื่องปั่นตกตะกอน (centrifuge) ความเร็วรอบ 3,500-4,000 รอบต่อนาที, เครื่องระเหยสารละลายแบบ heating block ซึ่งใช้แก๊สไนโตรเจนในการระเหยสารสกัด, เครื่องหมุนปั่นผสมสารละลาย Vertex-2 Genie, micropipette ขนาด 2-20 ไมโครลิตร, micropipette ขนาด 20-200 ไมโครลิตร, micropipette ขนาด 1-10 มิลลิลิตร, amber vial ขนาด 8 มิลลิลิตร, centrifuge tube ขนาด 50 และ 15 มิลลิลิตร, volumetric flask ขนาด 500, 25 และ 10 มิลลิลิตร, pasteur pipette

เครื่องมือตรวจวัดชนิดและปริมาณ

เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ: GC-MS/MS Agilent Technologies 7890B GC system and 700 °C GC/MS Triple Quad: MMI inlet (Multi mode injection) 60 °C hold 0.35 min, ramp 900 °C/min to 280 °C cryogenic (CO₂) on, oven 60 °C hold 1 min, ramp 40 °C/min to 170 °C and ramp 10 °C/min to 310 °C hold 3 min (20.75 min runtime), analytical column DB5MS 30 m, 250 µm × 0.25 µm, flow 1.1 ml/min

ตัวอย่างผลไม้

ในการศึกษาปริมาณการตกค้างของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในผลไม้ ใช้ตัวอย่างส้มจากโครงการสำรวจการตกค้างของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชและการปนเปื้อนจุลินทรีย์ดื้อสารต้านจุลชีพในผลส้ม (โครงการบูรณาการด้านอาหารปลอดภัย ปีงบประมาณ 2560) ซึ่งส้มเป็นผลไม้ที่มีอัตราการตรวจพบการตกค้างของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชสูงและเป็นผลไม้ที่นิยมรับประทาน ทำการศึกษาผลของการล้างน้ำและผลของการลอกเปลือกส้ม

วิธีลดปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในส้ม

ทำการสุ่มตัวอย่างส้มทั้งหมด 30 ตัวอย่าง เป็น 2 ชุด โดยชุดที่ 1 ทำการศึกษาผลของการลดปริมาณการตกค้างของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชก่อนและหลังล้างน้ำ โดยใช้ส้มจำนวน 10 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 2 กิโลกรัม แล้วนำส้มแต่ละตัวอย่างมาแบ่งเป็น 2 ส่วนเท่ากัน ส่วนละ 1 กิโลกรัม ส่วนที่ 1 เป็นตัวอย่างส้มที่ไม่ล้างน้ำวิเคราะห์ทั้งเปลือก นำมาหั่นเป็นชิ้นขนาดเล็ก บดให้ละเอียด ชั่งตัวอย่าง 10 กรัม แล้วนำไปสกัด และตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟแมสสเปกโตรมิเตอร์ ส่วนที่ 2 เป็นตัวอย่างส้มที่ล้างน้ำวิเคราะห์ทั้งเปลือก โดยแช่น้ำ 2 ลิตร ทั้งไว้ 10 นาที เทน้ำทิ้ง เปิดน้ำระดับกลางไหลผ่าน (ครึ่งหนึ่งของวาล์ว) แล้วขัดถูด้วยฟองน้ำตาข่าย 10 วินาที ทุกผล⁽¹⁰⁾ ทั้งไว้ให้แห้ง นำมาหั่นเป็นชิ้นขนาดเล็ก บดให้ละเอียด ชั่งตัวอย่าง 10 กรัม แล้วนำไปสกัด และตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟแมสสเปกโตรมิเตอร์ เช่นเดียวกับส่วนที่ 1

ตัวอย่างส้มชุดที่ 2 ทำการศึกษาผลของกระบวนการลดปริมาณการตกค้างของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชก่อนและหลังลอกเปลือก โดยใช้ส้มจำนวน 20 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 2 กิโลกรัม โดยการแบ่งครึ่งผลส้มทุกผล ส่วนที่ 1 เป็นตัวอย่างส้มไม่ล้างน้ำที่ไม่ลอกเปลือก 1 กิโลกรัม นำมาหั่นเป็นชิ้นขนาดเล็ก บดให้ละเอียด ชั่งตัวอย่าง 10 กรัม แล้วนำไปสกัด และตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟแมสสเปกโตรมิเตอร์ ส่วนที่ 2 เป็นตัวอย่างส้มไม่ล้างน้ำที่ลอกเปลือก 1 กิโลกรัม ใช้เฉพาะส่วนเนื้อ นำมาหั่นเป็นชิ้นขนาดเล็ก บดให้ละเอียด ชั่งตัวอย่าง 10 กรัม แล้วนำไปสกัด และตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟแมสสเปกโตรมิเตอร์ เช่นเดียวกับส่วนที่ 1

ตัวอย่างผัก

ในการศึกษาปริมาณการตกค้างของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในผัก ใช้ตัวอย่างผักที่เป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง จากโครงการประเมินความเสี่ยงการได้รับสัมผัสสารเคมีและสารปนเปื้อนที่คนไทยได้รับจากการบริโภค (Total Diet Study) (โครงการบูรณาการด้านอาหารปลอดภัย ปีงบประมาณ 2560) โดยผักที่นำมาสำรวจการตกค้างนี้ได้รับความร่วมมือจากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่เป็นตัวแทนของแต่ละภาคในการเก็บตัวอย่างผักทั้งหมด 4 ภาค ได้แก่ ภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ ภาคละ 2 จังหวัด รวม 8 จังหวัด ซึ่งเป็นผักที่เป็นตัวแทนของกลุ่มตัวอย่างแต่ละชนิด ได้แก่ บรอกโคลีเป็นตัวแทนของกลุ่มผักตระกูลกะหล่ำ⁽¹¹⁾ คะน้าเป็นตัวแทนของกลุ่มผักใบ บวบเหลี่ยมเป็นตัวแทนของกลุ่มผักผลตระกูลแตง ถั่วฝักยาวเป็นตัวแทนของกลุ่มผักผลตระกูลถั่ว

มะเขือเปราะเป็นตัวแทนของกลุ่มผักผลตระกูลมะเขือ พริกชี้ฟ้าเป็นตัวแทนของกลุ่มผักผลตระกูลพริก ผักบุ้งเป็นตัวแทนของกลุ่มผักต้นหรือยอด และเห็ดรวม ได้แก่ เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรม เห็ดออริจิ และเห็ดเข็มทอง รวมผักทั้งหมด 8 กลุ่มตัวอย่าง ทำการศึกษาผลของกระบวนการลดปริมาณการตกค้างของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในผักที่ไม่ล้างก่อนต้มและหลังต้ม

วิธีลดปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในผัก

สุ่มตัวอย่างผักสดทั้งหมด 8 กลุ่มตัวอย่างจาก 8 จังหวัด จังหวัดละ 200 กรัม นำผักแต่ละชนิดมารวมกัน แล้วนำมาแบ่งเป็น 2 ส่วน โดยส่วนที่ 1 เป็นตัวอย่างผักสดที่ไม่ล้างน้ำหนัก 100 กรัม แล้วนำมาลอกหรือปอก หั่น ตัดแต่งเฉพาะส่วนที่รับประทานได้ และบดให้ละเอียด ซึ่งตัวอย่าง 10 กรัม แล้วนำไปสกัด และตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรมิเตอร์ ส่วนที่ 2 เป็นตัวอย่างผักสดที่ไม่ล้างน้ำหนัก 100 กรัม แล้วนำมาลอกหรือปอก หั่น ตัดแต่งเฉพาะส่วนที่รับประทานได้ จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือด 7 นาที ตักขึ้นจากน้ำ พึงไว้ให้เย็นจนสะเด็ดน้ำ และบดให้ละเอียด ซึ่งตัวอย่าง 10 กรัม แล้วนำไปสกัด และตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรมิเตอร์ เช่นเดียวกับส่วนที่ 1

วิธีวิเคราะห์ (Extraction)

ซึ่งตัวอย่างน้ำหนัก 10 กรัม ลงใน centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม acetonitrile + 1% acetic acid 10 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง 1 นาที จากนั้นเติม MgSO_4 4 กรัม และ NaOAc 1 กรัม แล้วเขย่า 1 นาที นำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วประมาณ 3,500–4,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นแบ่งสารสกัดส่วนใสที่ได้ประมาณ 6–7 มิลลิลิตร ใส่ใน centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ (clean up) ด้วย DSPE (dispersive solid phase extraction) โดยการเติม 150 มิลลิกรัม MgSO_4 + 50 มิลลิกรัม PSA + 50 มิลลิกรัม GCB (สำหรับตัวอย่างพริกชี้ฟ้า clean up โดยการเติม 150 มิลลิกรัม MgSO_4 + 50 มิลลิกรัม PSA + 50 มิลลิกรัม GCB + 50 มิลลิกรัม C18EC จากนั้นเขย่า 1 นาที แล้วนำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วประมาณ 3,500–4,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เก็บสารสกัดส่วนใส (สารละลายชั้นบน) 5 มิลลิลิตร ใส่ใน amber vial ขนาด 8 มิลลิลิตร นำไประเหยลดปริมาตรจนเกือบแห้ง แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายผสม n-hexane: ethyl acetate (3:1) จนครบ 1 มิลลิลิตร ความเข้มข้นตัวอย่าง 2 กรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างด้วยเครื่อง GC-MS/MS

ผล

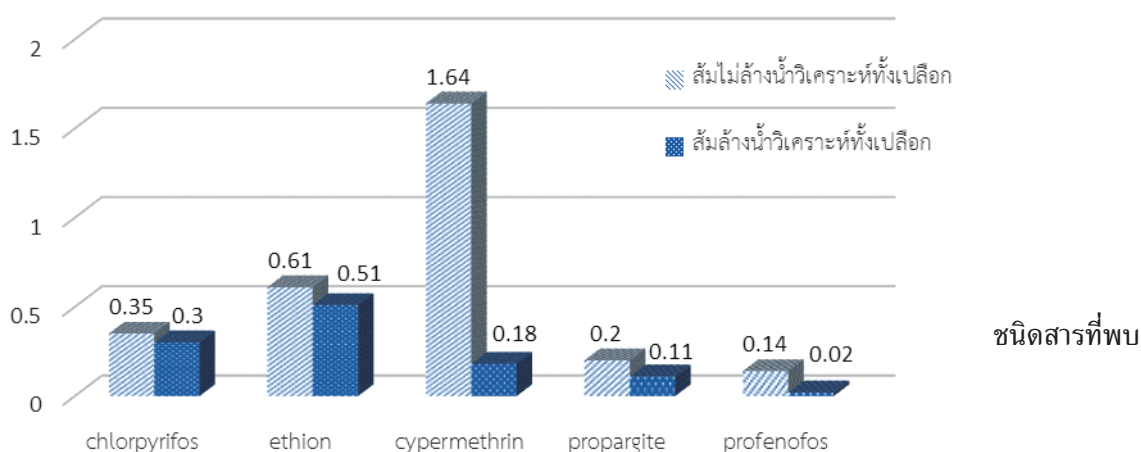
จากผลการวิเคราะห์ปริมาณสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในส้มไม่ล้างวิเคราะห์ทั้งเปลือกจำนวน 10 ตัวอย่าง พบการตกค้างของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในส้มทุกตัวอย่าง โดยพบสารตกค้างทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ chlorpyrifos มีค่าอยู่ในช่วง 0.04–0.35 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ethion มีค่าอยู่ในช่วง 0.52–0.61 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม cypermethrin มีค่าอยู่ในช่วง 0.04–1.64 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม propargite มีค่าอยู่ในช่วง 0.04–0.20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ profenofos มีค่าอยู่ในช่วง 0.04–0.14 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และพบว่าตัวอย่างส้มล้างน้ำวิเคราะห์ทั้งเปลือกพบการตกค้างของสาร 5 ชนิด แต่ปริมาณการตกค้างลดลง โดยพบการตกค้างของ chlorpyrifos มีค่าอยู่ในช่วง 0.02–0.30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ethion มีค่าอยู่ในช่วง 0.02–0.51 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม cypermethrin มีค่าอยู่ในช่วง 0.03–0.18 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม propargite มีค่าอยู่ในช่วง 0.02–0.11 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ profenofos มีค่าเท่ากับ 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณสารตกค้างลดลงอยู่ในช่วง 14–96% สามารถแสดงชนิดและปริมาณการตกค้างดังแสดงในตารางที่ 1 และภาพที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการลดปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยการล้างสัมด้วยน้ำ จำนวนตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์ 10 ตัวอย่าง ตรวจพบการตกค้างของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชทุกตัวอย่าง

ชนิดสาร ที่ตรวจพบ	กลุ่มสาร ที่ตรวจพบ	ปริมาณที่พบ (mg/kg)		ปริมาณสาร ที่ลดลง (%)	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
		ส้มไม่ล้างน้ำ	ส้มล้างน้ำ			
		วิเคราะห์ทั้งเปลือก (min-max)	วิเคราะห์ทั้งเปลือก (min-max)			
chlorpyrifos	OPs	0.04-0.35	0.02-0.30	14-50	0.01	0.03
cypermethrin	SPs	0.04-1.64	0.03-0.18	25-89	0.01	0.03
ethion	OPs	0.52-0.61	0.02-0.51	16-96	0.01	0.03
profenofos	OPs	0.04-0.14	0.02	50-86	0.01	0.03
propargite	OPs	0.04-0.20	0.02-0.11	45-50	0.01	0.03

หมายเหตุ: OPs หมายถึง กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส
SPs หมายถึง กลุ่มสารสังเคราะห์ไพรีทรอยด์

ปริมาณที่พบ (mg/kg)



ภาพที่ 1 ผลการลดปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยการล้างสัมด้วยน้ำ ปริมาณการตกค้างของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชลดลงอยู่ในช่วง 14-96%

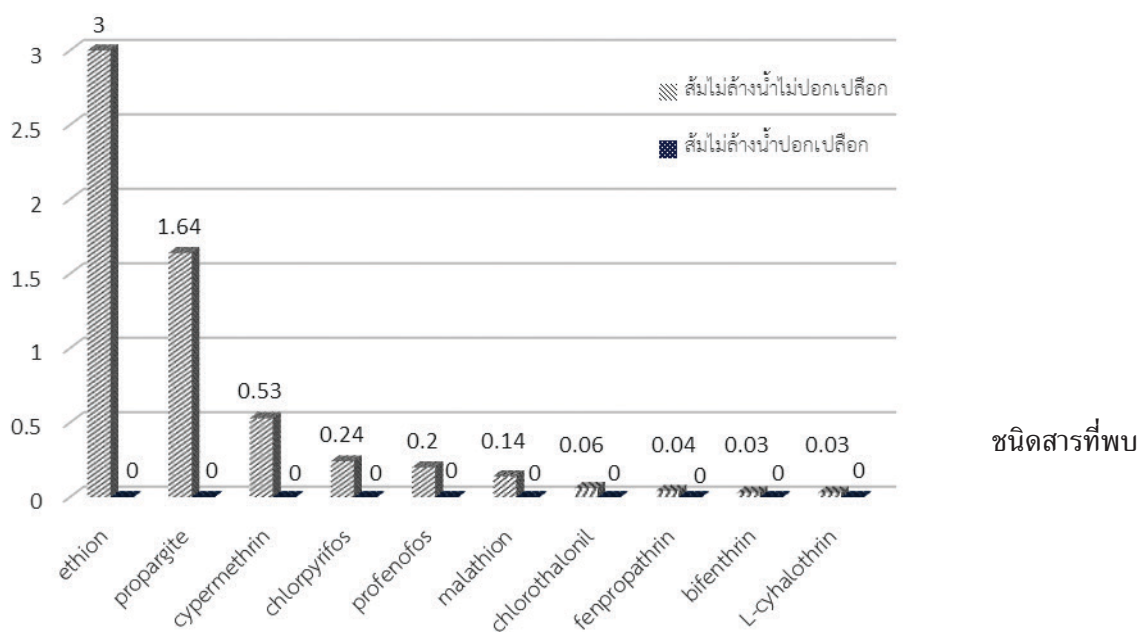
จากผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในส้มไม่ล้างน้ำก่อนและหลังปอกเปลือก พบว่า ส้มไม่ล้างน้ำไม่ปอกเปลือกพบการตกค้างของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในส้มทุกตัวอย่าง โดยพบสารตกค้างทั้งหมด 10 ชนิด ได้แก่ สาร chlorpyrifos, cypermethrin, propargite, profenofos, malathion, fenpropathrin, bifenthrin, chlorothalonil, lambda-cyhalothrin และ ethion มีค่าอยู่ในช่วง 0.04-0.24, 0.04-0.53, 0.04-1.64, 0.04-0.20, 0.04-0.14, 0.03, 0.03, 0.06, 0.04 และ 0.03-3.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และพบว่าส้มไม่ล้างน้ำปอกเปลือกตรวจวิเคราะห์เฉพาะส่วนเนื้อ ไม่พบการตกค้างของสารทุกชนิด ปริมาณการตกค้างลดลงคิดเป็น 100% สามารถแสดงชนิดและปริมาณการตกค้าง ดังแสดงในตารางที่ 2 และภาพที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการลดปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยการปกปิดเปลือกส้ม จำนวนตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์ 20 ตัวอย่าง ตรวจพบการตกค้างของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชทุกตัวอย่าง

ชนิดสาร ที่ตรวจพบ	กลุ่มสาร ที่ตรวจพบ	ปริมาณที่พบ (mg/kg)		ปริมาณสาร ที่ลดลง (%)	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
		ส้มไม่ล้างน้ำ ไม่ปกปิดเปลือก (min-max)	ส้มไม่ล้างน้ำ ปกปิดเปลือก (min-max)			
bifenthrin	SPs	0.03	ND	100	0.01	0.03
chlorpyrifos	OPs	0.04-0.24	ND	100	0.01	0.03
chlorothalonil	OCs	0.06	ND	100	0.01	0.03
cypermethrin	SPs	0.04-0.53	ND	100	0.01	0.03
ethion	OPs	0.03-3.00	ND	100	0.01	0.03
fenpropathrin	SPs	0.03	ND	100	0.01	0.03
L-cyhalothrin	SPs	0.04	ND	100	0.01	0.03
malathion	OPs	0.04-0.14	ND	100	0.01	0.03
profenofos	OPs	0.04-0.20	ND	100	0.01	0.03
propargite	OPs	0.04-1.64	ND	100	0.01	0.03

หมายเหตุ OCs หมายถึง กลุ่มออร์กาโนคลอรีน
 OPs หมายถึง กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส
 SPs หมายถึง กลุ่มสารสังเคราะห์ไพรีทรอยด์
 ND หมายถึง ตรวจไม่พบ
 ส้มไม่ล้างน้ำ ปกปิดเปลือก วิเคราะห์เฉพาะเนื้อ

ปริมาณที่พบ (mg/kg)



ภาพที่ 2 ผลการลดปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยการปกปิดเปลือกส้ม ปริมาณการตกค้างของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชลดลง 100%

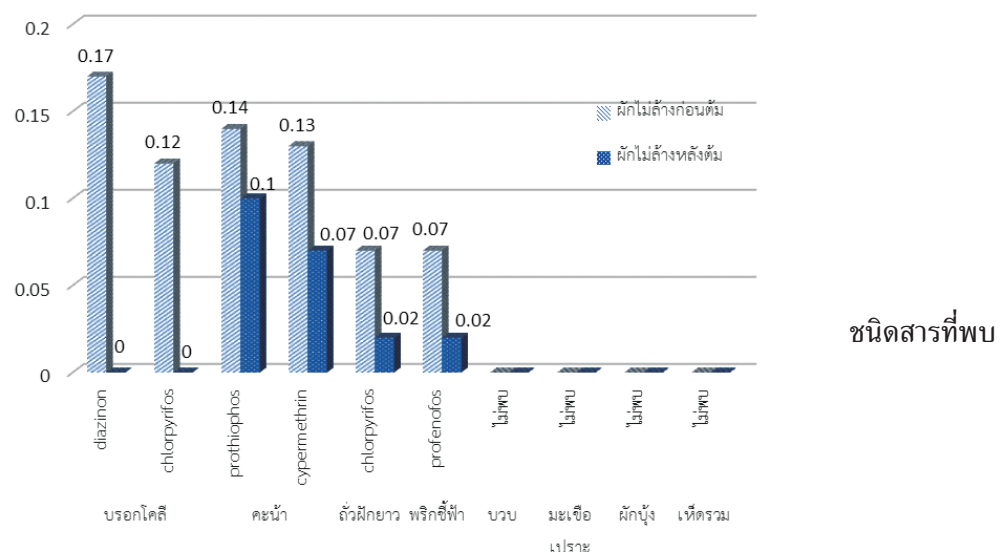
จากผลการวิเคราะห์ปริมาณสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในผักไม่ล้างก่อนต้มจำนวน 8 ชนิด พบการตกค้างของสารจำนวน 5 ชนิด ในผัก 4 ชนิด ได้แก่ บรอกโคลี พบการตกค้างของสาร 2 ชนิด คือ diazinon 0.17 และ chlorpyrifos 0.12 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม คื่นห้าน้ำ พบ prothiophos 0.14 และ cypermethrin 0.13 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ถั่วฝักยาว พบ chlorpyrifos 0.07 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พริกชี้ฟ้า พบ profenofos 0.07 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่พบการตกค้างในบวบเหลี่ยม มะเขือเปราะ ผักบุ้ง และเห็ดรวม เมื่อนำตัวอย่างผักไม่ล้างไปผ่านกระบวนการต้มแล้ว พบการตกค้างของสารลดลงเป็น 4 ชนิด ในผัก 3 ชนิด ได้แก่ คื่นห้าน้ำ พบ prothiophos 0.10 และ cypermethrin 0.07 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ถั่วฝักยาว พบ chlorpyrifos 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และพริกชี้ฟ้า พบ profenofos 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณการตกค้างลดลงอยู่ในช่วง 29-100% ไม่พบการตกค้างในบรอกโคลี บวบเหลี่ยม มะเขือเปราะ ผักบุ้ง และเห็ดรวม สามารถแสดงชนิดและปริมาณการตกค้าง ดังแสดงในตารางที่ 3 และภาพที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการลดปริมาณสารเคมีกำจัดศัตรูพืชโดยการต้มผัก จำนวนตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์ 8 ตัวอย่าง ตรวจพบการตกค้างของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชจำนวน 4 ตัวอย่าง

ชนิดตัวอย่างที่ตรวจพบ	กลุ่มสารที่ตรวจพบ	ปริมาณที่พบ (mg/kg)		ปริมาณสารที่ลดลง (%)	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
		ผักไม่ล้างก่อนต้ม	ผักไม่ล้างหลังต้ม			
บรอกโคลี	OPs	diazinon 0.17	ND	100	0.01	0.03
คื่นห้าน้ำ	OPs	chlorpyrifos 0.12	ND	100	0.01	0.03
ถั่วฝักยาว	OPs	prothiophos 0.14	prothiophos 0.10	29	0.01	0.03
บวบ	SPs	cypermethrin 0.13	cypermethrin 0.07	46	0.01	0.03
ผักบุ้ง	OPs	chlorpyrifos 0.07	chlorpyrifos 0.02	71	0.01	0.03
พริกชี้ฟ้า	ND	ND	ND	-	-	-
มะเขือเปราะ	ND	ND	ND	-	-	-
เห็ด	OPs	profenofos 0.07	profenofos 0.02	71	0.01	0.03

หมายเหตุ: OPs หมายถึง กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส SPs หมายถึง กลุ่มสารสังเคราะห์ไพรีทรอยด์
ND หมายถึง ตรวจไม่พบ

ปริมาณที่พบ (mg/kg)



ภาพที่ 3 ผลการลดปริมาณสารเคมีกำจัดศัตรูพืชโดยการต้มผัก ปริมาณการตกค้างของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชลดลงอยู่ในช่วง 29-100%

วิจารณ์

การเฝ้าระวังอันตรายเพื่อคุ้มครองผู้บริโภคด้านอาหารนั้นเป็นภารกิจหลักของสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยใช้ระบบคุณภาพตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025⁽¹²⁾ มีบุคลากรที่ได้รับการฝึกอบรมและมีประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องในด้านสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช มีอุปกรณ์และเครื่องมือที่ทันสมัย รวมถึงวิธีการทดสอบที่ได้รับการรับรองคุณภาพการตรวจประเมินความสามารถห้องปฏิบัติการ การตรวจวิเคราะห์มีความถูกต้อง มีคุณภาพ และผ่านเกณฑ์การควบคุมคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ทั้งภายในและภายนอก การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาผลของการลดปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผักผลไม้ โดยศึกษาผลของการล้างน้ำและผลของการปอกเปลือกส้ม และผลของการต้มผัก ขอบข่ายของการตรวจวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชจำนวน 53 ชนิด โดยสารกลุ่ม OCs, OPs และ SPs มีขีดจำกัดของการตรวจพบเท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยสารทั้ง 3 กลุ่ม มีขีดจำกัดของการตรวจวัดเชิงปริมาณเท่ากับ 0.03 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟแมสสเปกโตรมิเตอร์

จากการศึกษาผลของการลดปริมาณสารตกค้างในส้มไม่ล้างน้ำวิเคราะห์ทั้งเปลือก พบการตกค้างของสารทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ cypermethrin, ethion, profenofos, chlorpyrifos และ propargite เป็นสารที่มีค่า Maximum Residue Limits, MRLs 3 ชนิด ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เลขที่ 387⁽¹³⁾ ฉบับ พ.ศ. 2560 เรื่องอาหารที่มีสารพิษตกค้าง ได้แก่ cypermethrin, ethion และ profenofos มีค่ากำหนดเท่ากับ 0.3, 2 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และเป็นสารที่ไม่มีค่ากำหนด 2 ชนิด ได้แก่ สาร chlorpyrifos และ propargite สารที่ตรวจพบทั้งหมดเป็นสารกลุ่ม OPs และ SPs ซึ่งสาร 2 กลุ่มนี้ เป็นสารที่มักตรวจพบการตกค้างในพืชตระกูลส้ม⁽¹⁴⁾ เมื่อนำตัวอย่างส้มไปผ่านกระบวนการล้างน้ำแล้ววิเคราะห์ทั้งเปลือก พบการตกค้างของสารทั้งหมด 5 ชนิด แต่ปริมาณการตกค้างลดลงอยู่ในช่วง 14–96% ปริมาณการตกค้างของสารที่ลดลงจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับสมบัติทางกลายน้ำของสาร เช่น สาร profenofos⁽¹⁵⁾ เป็นสารที่สามารถละลายน้ำได้ เมื่อนำตัวอย่างส้มไปล้างน้ำ ปริมาณของสาร profenofos ที่ตกค้างอยู่บนเปลือกส้มสามารถลดลงได้ และการขัดถูผิวส้มผ่านน้ำไหล เป็นการช่วยให้สารเคมีที่เคลือบผิวส้มหลุดออกได้เช่นกัน

เมื่อศึกษาผลของการลดปริมาณสารตกค้างในส้มไม่ล้างน้ำ ไม่ปอกเปลือก พบการตกค้างของสารทั้งหมด 10 ชนิด ได้แก่ bifenthrin, chlorpyrifos, chlorothalonil, cypermethrin, ethion, fenpropathrin, lambda-cyhalothrin, malathion, profenofos และ propargite และเป็นสารที่มีค่า MRLs 4 ชนิด ได้แก่ cypermethrin, profenofos, malathion และ ethion โดยมีค่ากำหนดเป็น 0.3, 0.1, 7 และ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

มีการตรวจพบสารที่ไม่มีค่า MRLs 6 ชนิด ได้แก่ chlorpyrifos, propargite, fenpropathrin, bifenthrin, chlorothalonil และ lambda-cyhalothrin ถึงแม้ว่าจะพบการตกค้างของสารที่มีค่ากำหนดหรือไม่มีค่ากำหนด หรือตรวจพบการตกค้างสูงเกินค่าที่กฎหมายกำหนดไว้ แต่เมื่อนำตัวอย่างส้มไม่ล้างน้ำปอกเปลือกแล้วนำไปวิเคราะห์เฉพาะส่วนเนื้อ ไม่พบการตกค้างของสารทุกชนิด ปริมาณการตกค้างลดลงคิดเป็น 100% และเมื่อพิจารณาสารตกค้างทั้ง 10 ชนิด ได้แก่ chlorpyrifos, cypermethrin, propargite, profenofos, malathion, fenpropathrin, bifenthrin, chlorothalonil, lambda-cyhalothrin และ ethion พบว่าสารทุกตัวเป็น non systemic pesticide⁽¹⁶⁾ คือเป็นสารที่ไม่ดูดซึมผ่านผิวของผักหรือผลไม้ ดังนั้นการปอกเปลือกส้มสามารถลดชนิดและปริมาณสารตกค้างได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ยังมีสารบางชนิดที่ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟแมสสเปกโตรเมตรี และเป็นสารชนิด systemic pesticide⁽¹⁷⁾ และยังมีผลไม้บางชนิดที่สามารถรับประทานได้ทั้งเปลือก⁽¹⁸⁾

จากการศึกษาผลของการลดปริมาณการตกค้างของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในผักไม่ล้างก่อนต้ม พบการตกค้างของสาร 5 ชนิด ในผัก 4 ชนิด เมื่อนำผักไม่ล้างไปผ่านกระบวนการต้มแล้ว พบว่าทั้งชนิดและปริมาณ

การตกค้างของสารลดลงเป็น 4 ชนิด ในผัก 3 ชนิด ชนิดและปริมาณของสารที่ลดลงนั้นขึ้นอยู่กับสมบัติทางเคมีของสารที่ตกค้าง โดยทั่วไปสารกำจัดศัตรูพืชสามารถสลายตัวได้เองตามสภาพแวดล้อมที่ระยะเวลาประมาณ 24 ชั่วโมงถึง 1 สัปดาห์⁽¹⁹⁾ และสามารถสลายตัวได้ด้วยความร้อนจากแสงแดด หรือในอุณหภูมิที่สูงขึ้น เช่น สาร chlorpyrifos ดังนั้นเมื่อนำผักที่พบการตกค้างไปต้มผ่านความร้อนในน้ำเดือด สาร chlorpyrifos⁽²⁰⁾ สามารถสลายตัวได้ปริมาณการตกค้างจึงลดลง จากการศึกษาดังกล่าว ตรวจไม่พบการตกค้างในผัก 4 ชนิด ได้แก่ บวบเหลี่ยม มะเขือเปราะ ผักบุ้ง และเห็ดรวม ในการศึกษาการลดปริมาณสารตกค้างโดยการต้มผักครั้งนี้ใช้ระยะเวลาในการต้มผัก 7 นาที ซึ่งผักจะสุกที่ระยะเวลาในการต้มตั้งแต่ 5-10 นาที ขึ้นอยู่กับชนิดของผัก เพื่อควบคุมเวลาในการต้มผักให้เท่ากันในทุกชนิด ดังนั้นจึงใช้ระยะเวลาในการต้มผักเฉลี่ยเป็น 7 นาที มีการตรวจพบสารที่มีค่ากำหนดแต่ไม่เกินค่า MRLs มี 2 ชนิด คือ สาร profenofos ในถั่วฝักยาว และ diazinon ในพืชตระกูลกะหล่ำ ซึ่งตามการจัดกลุ่มสินค้าเกษตร: พืชของสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์จัดบรอกโคลีอยู่ในพืชตระกูลกะหล่ำ ตรวจพบสารที่ไม่มีค่ากำหนด 4 ชนิด ได้แก่ สาร chlorpyrifos ในบรอกโคลี, สาร prothiophos และ cypermethrin ในคะน้า และสาร chlorpyrifos ในถั่วฝักยาว และตรวจพบสารไม่มีค่ากำหนดตามคณะกรรมการมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ (Codex)⁽²¹⁾ มี 2 ชนิด คือ สาร prothiophos ในคะน้า และ chlorpyrifos ในถั่วฝักยาว เพื่อเพิ่มความเชื่อมั่นให้กับผู้บริโภค ผักทั้งชนิดผักสดและผักต้ม เช่น ในกรณีพบสาร prothiophos ในผักคะน้า เท่ากับ 0.14 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และเมื่อนำไปต้ม ปริมาณ prothiophos ลดลงเป็น 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งไม่มีค่ากำหนดตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข และไม่มีค่ากำหนดตาม Codex สาร prothiophos มีความเป็นพิษ (Toxicity) ต่ำในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม⁽²²⁾ และสามารถสลายตัวได้เร็ว ไม่มีค่า Acceptable Daily Intake (ADI) และไม่เป็นสารชนิด carcinogenic⁽²³⁾ และ mutagenic ถึงแม้พบการตกค้างในผักสดและผักต้มนั้น ผักบางชนิดรับประทานสด บางชนิดต้องนำไปต้มก่อนรับประทาน และบางชนิดรับประทานทั้งสดและต้ม การศึกษาดังกล่าวเป็นผักที่ไม่ผ่านกระบวนการล้าง ดังนั้นถ้านำผักไปล้างทำความสะอาดก่อนต้มเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการลดสารตกค้างได้ดียิ่งขึ้น วิธีล้างผักนอกจากล้างผ่านน้ำไหลแล้ว ยังมีอีกหลายวิธี เช่น การล้างผักผลไม้ด้วยน้ำเกลือ การล้างด้วยน้ำส้มสายชู การแช่ในน้ำด่างทับทิม และการล้างด้วยน้ำปูนใส ขึ้นอยู่กับความสะดวกในการเลือกวิธีของผู้บริโภค

จากการศึกษาการลดปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่กล่าวมาข้างต้น พบว่าผักผลไม้ที่ตรวจพบการตกค้างยังไม่มีค่า MRLs ซึ่งผู้บริโภคควรได้บริโภคผักผลไม้ที่มีมาตรฐานรองรับ เพื่อสุขภาพอนามัยที่ดี และผู้ผลิตควรผลิตสินค้าเกษตรออกมาจำหน่ายเป็นผักผลไม้ที่ปลอดสารพิษ และหน่วยงานของภาครัฐควรให้การสนับสนุนในการผลิตสินค้าเกษตรที่ปลอดสารพิษอย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้ผู้บริโภคควรรับประทานผักผลไม้แบบหมุนเวียน ไม่รับประทานผักผลไม้ชนิดเดิมติดต่อกันเป็นเวลานานจะช่วยลดการสะสมสารพิษที่เข้าสู่ร่างกายได้

สรุป

จากการศึกษาการลดปริมาณสารเคมีกำจัดศัตรูพืชตกค้างในตัวอย่างผักและผลไม้ พบว่าการปกปิดเลือกส้มสามารถลดชนิดและปริมาณสารกำจัดศัตรูพืชที่ตกค้างในส้มได้อย่างมีประสิทธิภาพ การล้างน้ำส้มสามารถลดชนิดและปริมาณการตกค้างได้แต่ยังคงพบปริมาณการตกค้างอยู่ เมื่อประเมินค่าความปลอดภัยของปริมาณสารที่ตกค้างพบว่ายังปลอดภัยต่อผู้บริโภค ดังนั้นผู้บริโภคสามารถค้นส้มได้ทั้งเปลือกแต่ควรผ่านกระบวนการล้างตามวิธีข้างต้น นอกจากนั้น การศึกษาการลดปริมาณการตกค้างในผัก พบว่ามีผักที่ตรวจไม่พบการตกค้างและสามารถรับประทานได้โดยไม่ต้องต้ม ได้แก่ บวบ ผักบุ้ง มะเขือเปราะ และเห็ด แต่ยังคงพบการตกค้างในผักคะน้า ถั่วฝักยาว และพริก หลังจากนำผักไปต้มเนื่องจากคุณสมบัติทางเคมีของสาร ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค ควรรับประทานผักแบบหมุนเวียนหลากหลายชนิด ไม่รับประทานผักชนิดเดิมเป็นระยะเวลาติดต่อกันนานเพื่อลดการสะสมของสารตกค้างที่จะเข้าสู่ร่างกายได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นายธณิศวรร ไซยมงคล นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ ที่ช่วยในขั้นตอนการสกัดตัวอย่าง นางสาวจิตผกา สันต์ตรบ หัวหน้าโครงการประเมินความเสี่ยงการได้รับสัมผัสสารเคมีและสารปนเปื้อนที่คนไทยได้รับจากการบริโภค ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างผักสำหรับทำวิจัย เจ้าหน้าที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ทั้ง 8 แห่ง ที่เป็นตัวแทนของแต่ละภาคในการเก็บตัวอย่างผักและตัวอย่างส้ม เจ้าหน้าที่สถาบันค้นคว้าและวิจัยผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เป็นผู้เตรียมตัวอย่างผักก่อนนำมาวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. กินผักผลไม้อย่างไร ให้ปลอดภัย. นิตยสาร Health & Cuisine 2550; 7(83): 58-9.
2. อีรวุฒิ ปัญญา. 20 สูตรล้างพิษจากธรรมชาติ (ไม่ต้องสวน ไม่ต้องเจ็บตัว). กรุงเทพฯ: Happy Book; 2557.
3. Suntudrob J, Jongmevasna W, Payanan T, Srikote R, Wittayanan W. Monitoring of pesticide residues in domestic vegetables in Thailand during 2015. Asia Pac J Sci Technol (APST) 2018; 23(4): 1-8.
4. กนกพร อธิสุข, ยุติ เลิศเรืองเดช, จิตผกา สันต์ตรบ, วิชาดา จงมีวาสนา, ทองสุข ปายะนันท์, เฉลิมพร ควรหา, และคนอื่น ๆ. สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่คนไทยได้รับจากการบริโภคอาหาร พ.ศ. 2542-2546. ว ุกรรมวิทย พ 2551; 50(3): 151-62.
5. Liang Y, Wang W, Shen Y, Liu Y, Liu XJ. Effect of home preparation on organophosphorus pesticide residues in raw cucumber. Food Chem 2012; 133(3): 636-40.
6. สีนาศ สุนทรสุข. การลดสารตกค้างในผักผลไม้. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. [ออนไลน์]. 2562; [สืบค้น 3 ก.ย. 2563]; [3 หน้า]. เข้าถึงได้: URL: <https://pharmacy.mahidol.ac.th/th/knowledge/article/452/สารตกค้าง-การกำจัด>.
7. สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร. รายงานสรุปผลการดำเนินโครงการบูรณาการอาหารปลอดภัย (Food Safety) ประจำปีงบประมาณ 2560. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2561.
8. สุปราณี แจ่มบำรุง, และคณะบรรณาธิการ. ปริมาณสารอาหารอ้างอิงที่ควรได้รับประจำวันสำหรับคนไทย พ.ศ. 2563. กรุงเทพฯ: สำนักโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข; 2563
9. AOAC Official Method 2007.01: pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate. In: Official methods of analysis. 19th ed. Guithersburg, MD: AOAC International; 2012.
10. สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. เอกสารเผยแพร่โครงการ Food Safety: วิจัยลดปริมาณสารพิษในผักผลไม้. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 3 ก.ย. 2563]; [2 หน้า]. เข้าถึงได้: URL: <http://bqsf.dmsc.moph.go.th/bqsfWeb/index.php/publish>.
11. มาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 9045-2559: การจัดกลุ่มสินค้าเกษตร: พืช. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 133 ตอนพิเศษ 264 ง (วันที่ 18 พฤศจิกายน 2559).
12. ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. 3rd ed. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2017.
13. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เลขที่ 387 (พ.ศ. 2560) เรื่องอาหารที่มีสารพิษตกค้าง. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 134 ตอนพิเศษ 228 ง (วันที่ 18 กันยายน 2560).

14. ทองสุข ปายะนันท์, จิตผกา สันต์ตรบ, วิชาดา จงมีวาสนา, รัตยากร ศรีโคตร, วีรวุฒิ วิทยนันท์. การศึกษาสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผลส้ม. ว กรมวิทย พ 2558; 57(4): 391-400.
15. Profenofos in freshwater and marine water. Toxicant default guideline values for protecting aquatic ecosystems. [online]. 2000; [cited 2020 Sep 3]; [3 screens]. Available from: URL: <https://www.waterquality.gov.au/anz-guidelines/guideline-values/default/water-quality-toxicants/toxicants/profenofos-2000>.
16. Roberts TR, Hutson DH, editors. Metabolic pathways of agrochemicals: insecticides and fungicides. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry; 1999.
17. Nollet LML, Rathore HS, editors. Handbook of pesticides: methods of pesticide residues analysis. New York: Taylor & Francis; 2010.
18. กองบรรณาธิการนานมีบุ๊คส์. กินผักผลไม้ต้านโรค. กรุงเทพฯ: นานมีบุ๊คส์พับลิเคชั่นส์; 2556.
19. สุทธิรักษ์ ผลเจริญ. สารเคมีตกค้างทางการเกษตร (ตอนที่ 1). [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 3 ก.ค. 2563]; [3 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <http://www.chumphon2.mju.ac.th/km/?p=471>.
20. Hossain MS, Fakhruddin ANM, Chowdhury MAZ, Alan MK. Degradation of chlorpyrifos, an organophosphorus insecticide in aqueous solution with gamma irradiation and natural sunlight. J Environ Chem Eng 2013; 1(3): 270-4.
21. Agenda Item 6. In: Joint FAO/WHO food standards programme. 48th session of Codex Committee on Pesticide Residues. Chongqing, China. 25-30 April 2016. [online]. 2016; [cited 2020 Sep 3]; [29 screens]. Available from: URL: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/codex_ccpr_48_agenda-item-06.pdf.
22. Ueyama I, Takase I. Fate of prothiofos (O-2, 4-dichlorophenyl O-ethyl S-propyl phosphorodithioate) in rats. Pestic Biochem Physiol 1980; 14(1): 98-110.
23. Food Safety Commission of Japan (FSCJ). Risk assessment report - prothiofos (pesticides). [online]. 2018; [cited 2020 Sep 3]; [5 screens]. Available from: URL: <https://www.fsc.go.jp/fsciis/attachedFile/download?retrievalId=kya20130612178&fileId=211>.

Minimizing Pesticide Residues in Fruit and Vegetables

Rattiyakorn Srikote and Wischada Jongmeewasna

Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Sciences Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT The contamination of pesticide residues has been a problem that can affect to human health. This research was aimed to study the results of the process to reduce pesticide residues in fruit, the study was performed with citrus, and it was treated by washing and peeling. Whereas, in vegetables represented by broccoli, chinese broccoli, loofah, yard-long bean, eggplant, chilli, water spinach and mushroom, the residues were decreased by boiling. The analysis of pesticide residues before and after reduction approaches was performed by AOAC official method 2007.01. The scope of this study included 53 pesticide residues; 21 organochlorine compounds (OCs), 24 organophosphorus compounds (OPs) and 8 synthetic pyrethroids (SPs). The analysis was done by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS/MS), and it provided limit of detection (LOD) at 0.01 mg/kg and limit of quantification (LOQ) at 0.03 mg/kg. The results indicated that the pesticide residues in washed and peeled citrus were reduced by 14-96% and 100%, respectively, and for the boiled vegetables, they were decreased by 29-100%. There for, these approaches were efficiently able to lessen the risk that the consumers will receive the residues into their body.

Keywords: Pesticide residues, Fruit and vegetable, Minimizing pesticide residues

การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ค่าความแรงยา Pegfilgrastim โดยวิธี Cell Proliferation

สมปอง ทรัพย์สุทธิภรณ์ จิรเดช ปัจฉิม สายวรุฬ จตุรจิตตินันท์ และสุภาพร ภูมิอมร
สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ยา Pegfilgrastim เป็น growth factor ใช้กระตุ้นการเพิ่มจำนวนเม็ดเลือดขาว ปัจจุบันไม่มีวิธีมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ความแรงของยาในตำรายาสากล จึงพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยการกระตุ้นเซลล์ adapted M-NSF-60 ด้วยยาเจือจางที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม ส่งผลให้มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และวัดปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้นโดยใช้สาร luminescence วิเคราะห์ผลเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานด้วยโปรแกรม parallel line analysis ทำให้ทราบค่าความแรงของยาได้ เมื่อนำวิธีที่ได้ไปทดสอบความถูกต้องของวิธี ผลการศึกษาพบว่ายา Pegfilgrastim สามารถกระตุ้นให้เซลล์ adapted M-NSF-60 เกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน และเมื่อทดสอบความแม่นยำ พบว่ามีค่า %recovery อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดระหว่าง 80-125% ความเที่ยงของวิธีให้ค่า %GCV ของการทำซ้ำและต่างวันวิเคราะห์เท่ากับ 9.70 และ 9.65 มีความเป็นเส้นตรงและช่วงของทดสอบที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 50-200% ได้กราฟเป็นเส้นตรงตลอดช่วงมีค่า $r^2 = 0.997$ ส่วนความคงทนของวิธีทำโดยเปลี่ยน passage number ของเซลล์ และเวลาในการบ่ม พบว่ามีค่า %GCV <25% และไม่มี ความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากข้อมูลทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความเหมาะสมในการนำมาใช้ในการควบคุมคุณภาพยา Pegfilgrastim 3 ยี่ห้อ ที่นำมาใช้ในการศึกษาสำหรับยาอื่น ๆ ต้องตรวจสอบวิธีก่อนนำไปใช้

คำสำคัญ : Pegfilgrastim, ความแรง, Cell proliferation, ทดสอบความถูกต้องของวิธี, การพัฒนาวิธี

Corresponding author E-mail: sompong.s@dmasc.mail.go.th

Received: 21 February 2020

Revised: 19 October 2020

Accepted: 18 February 2021

บทนำ

Human granulocyte colony stimulation factor (G-CSF) เป็น glycoprotein ที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างและปลดปล่อยเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล (neutrophil) ออกจากไขกระดูก (bone marrow) Pegfilgrastim เป็นยาที่มีการรวมโปรตีน recombinant human G-CSF (r-metHuG-CSF), Filgrastim กับโมเลกุลของ polyethylene glycol (PEG) ขนาด 20 กิโลดาลตัน โดยโมเลกุลของ PEGylated G-CSF ถูกทำให้เสถียรด้วย two disulphide bridges โมเลกุลมีขนาด 38,000 ดาลตัน ขณะที่ Filgrastim มีขนาดประมาณ 18,800 ดาลตัน ยา Pegfilgrastim ออกฤทธิ์ภายในร่างกายได้นานกว่า Filgrastim เนื่องจากมีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่า จึงถูกขับออกทางไตได้น้อยกว่า^(1, 2, 3, 4) ซึ่งยา Pegfilgrastim และ Filgrastim มีกลไกการออกฤทธิ์เหมือนกัน คือ เพิ่มจำนวนนิวโทรฟิล มีข้อบ่งใช้ในการรักษา คือ ใช้เพื่อลดระยะเวลาการเกิดภาวะนิวโทรฟิลในเลือดต่ำ (Neutropenia) ลดอุบัติการณ์ของการเกิด febrile neutropenia และลดอุบัติการณ์ของการติดเชื้อจากการเกิด febrile neutropenia ในผู้ป่วยที่ได้รับยาเคมีบำบัดเพื่อรักษาโรคมะเร็ง (ยกเว้น chronic myeloid leukemia และ myelodysplastic syndromes)^(1, 2, 3, 4)

ปัจจุบันมีการผลิตยาชีววัตถุคล้ายคลึง (biosimilars) ของยา Pegfilgrastim ในหลายประเทศรวมทั้งประเทศไทย เนื่องจากยาชีววัตถุต้นแบบ (originator หรือ innovator drug) ครบระยะเวลาของสิทธิบัตรแล้ว ในปัจจุบันยาชีววัตถุคล้ายคลึงนำมาใช้เรียกเฉพาะกับผลิตภัณฑ์ชีววัตถุประเภทโปรตีนที่ได้มาจากกระบวนการเทคโนโลยีชีวภาพเท่านั้น เพราะเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้สูงและสามารถตรวจสอบคุณลักษณะได้เป็นอย่างดี ตามหลักการแล้วประโยชน์ที่ได้จากการผลิตยากลุ่มนี้คือ ทำให้ลดต้นทุนการผลิตได้มาก ราคาจะถูกลงเมื่อเทียบกับยาต้นแบบ ทำให้มีการเข้าถึงยาได้มากขึ้น^(5, 6, 7) การควบคุมคุณภาพของยาชีววัตถุคล้ายคลึงจะทำการศึกษาเปรียบเทียบ (comparability study) กับยาชีววัตถุต้นแบบ หรือสารมาตรฐานอ้างอิง (reference product) โดยประเมินทั้งด้านคุณภาพ (quality), non-clinical และ clinical^(8, 9, 10, 11) ซึ่งยาชีววัตถุคล้ายคลึงจะมีความคล้ายคลึงในแง่คุณภาพ ความปลอดภัย และประสิทธิภาพกับยาชีววัตถุต้นแบบ สำหรับการศึกษาคือการศึกษาด้านคุณภาพ ควรเปรียบเทียบยาชีววัตถุคล้ายคลึงกับสารมาตรฐานอ้างอิงโดยการศึกษาเปรียบเทียบแบบ head-to-head ด้วยวิธีวิเคราะห์เดียวกัน โดยวิธีทางชีวภาพ (biological), เคมีกายภาพ (physicochemical) และภูมิคุ้มกันวิทยา (immunological) ส่วนการศึกษาด้าน non-clinic และ clinic จะเปรียบเทียบยาชีววัตถุคล้ายคลึงกับสารมาตรฐานอ้างอิงโดยตรง เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพและความปลอดภัย ซึ่งสารมาตรฐานอ้างอิงที่ใช้ควรเป็นรุ่นการผลิตเดียวกันตลอดการศึกษาคือการศึกษาคือการทดสอบทางชีวภาพที่สำคัญเพื่อยืนยันคุณภาพของยาชีววัตถุเหล่านี้ คือ การตรวจสอบความแรงของผลิตภัณฑ์เพื่อบ่งบอกว่ายา biosimilars นี้มีความสามารถในการรักษาได้หรือไม่ ซึ่งวิธีทดสอบความแรงของยา biosimilars โดยส่วนใหญ่จะวัดโดยวิธีในหลอดทดลอง (in vitro bioassay) ซึ่งที่นิยมมี 2 วิธี คือ receptor binding assays และ cell-based functional assays หรือ cell proliferation assay⁽¹³⁾ เนื่องจากปัจจุบันยังไม่มีวิธีมาตรฐานสำหรับทดสอบความแรงของยา Pegfilgrastim ในประเทศ คณะผู้วิจัยจึงพัฒนาวิธีขึ้น โดยดัดแปลงจากวิธีวิเคราะห์ค่าความแรงของยา Filgrastim ใน U.S. pharmacopeia⁽¹⁴⁾ คือ วิธี cell proliferation assay โดยจะวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ตอบสนองต่อ G-CSF โดยทำการทดสอบตัวอย่างยาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานอ้างอิง ในขั้นตอนการพัฒนาวิธีจะต้องหาปริมาณเซลล์ ระดับความเข้มข้นของยาที่เหมาะสม และวิธีการอ่านผลการทดสอบ ซึ่งสามารถวัดค่า luminescence หรือ colorimetric หรือ fluorescence ขึ้นอยู่กับสารตั้งต้น (substrate) ที่ใช้เป็นชนิดใด^(15, 16) จากนั้นคำนวณผลที่ได้โดยใช้โปรแกรม parallel-line analysis และรายงานผลเป็นค่า %relative potency⁽¹²⁾ หลังจากที่ได้สภาวะที่เหมาะสมแล้ว จะทดสอบความถูกต้องของวิธีในพารามิเตอร์ต่าง ๆ ได้แก่ ความจำเพาะ ความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ ความแม่นยำ และความเที่ยง และความคงทนของวิธี⁽¹⁷⁾ เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการหาความแรงของยา Pegfilgrastim ของประเทศต่อไป

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างและสารมาตรฐาน

สารมาตรฐาน Pegfilgrastim USP reference standard ความเข้มข้น 1,000 ng/ml (lot no. F0M527) จาก U.S. Pharmacopeia ส่วนตัวอย่างยา Pegfilgrastim จากบริษัท (ยี่ห้อ) ประกอบด้วย ยี่ห้อ A ขนาด 6 mg/0.6 ml ยี่ห้อ B ขนาด 6 mg/0.6 ml และยี่ห้อ C ขนาด 6 mg/0.6 ml ยารุ่นเดียวกันจำนวน 6 ขวดต่อยี่ห้อ

เซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์ Mouse *Mus musculus* myelogenous leukemia, M-NSF-60 (ATCC® CRL-1838™) ที่ตอบสนองต่อ interleukin 3 (IL-3) และ G-CSF และปรับสภาพเซลล์ให้มีความไวสำหรับการทดสอบ โดยการกระตุ้นเซลล์ด้วย G-CSF ความเข้มข้น 1 ng/ml

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (Microplate luminometer) รุ่น Orion L ของ Titertex Berthold ประเทศเยอรมนี กล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์ท (Inverted microscope) รุ่น CK2 ของ Olympus ประเทศญี่ปุ่น ตู้ชีววิทย (Biological Safety Cabinet) ตู้เพาะเชื้อแบบใช้ CO₂ (CO₂ Incubator) อุณหภูมิ 37 ± 1 °C รุ่น Galaxy 170R ของ New Brunswick ประเทศเยอรมนี ไมโครเพลทสีขาวกันแบน 96 หลุม มีกันเพลทใส ผลิตภัณฑ์ของ Corning ประเทศสหรัฐอเมริกา

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเซลล์

RPMI medium 1640 (Cat. No. A10491-01, Gibco) ผลิตภัณฑ์ของ Thermo Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา Heat-inactivated Fetal Bovine Serum (Cat. No. 26140-079, Gibco) ผลิตภัณฑ์ของ Thermo Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา 2-Mercaptoethanol (Cat. No. 21985-023, Gibco) ผลิตภัณฑ์ของ Thermo Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Cat. No. G7572) ผลิตภัณฑ์ของ Promega ประเทศสหรัฐอเมริกา

การตรวจสอบความแรงโดยวิธี Cell proliferation

การตรวจสอบความแรงของยา Pegfilgrastim ใช้วิธี cell proliferation โดยอาศัยความสามารถของเซลล์ M-NSF-60 ที่สามารถแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนเมื่อถูกกระตุ้นด้วยยา Pegfilgrastim ซึ่งอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ในการทดสอบ (assay medium) และสภาวะในการทดสอบเป็นไปตามตำราสากลสำหรับการวิเคราะห์ค่าความแรงยา Filgrastim⁽¹⁴⁾ โดยกระตุ้นเซลล์ adapted M-NSF-60 จำนวน 5×10^3 cells/50 µl/หลุม ในเพลท 96 หลุม ด้วยตัวอย่างยาและสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.5 ng/ml จากนั้นเจือจางเป็น two folds serial dilution (จำนวน 8 dilutions) แล้วดูดใส่ในเพลทที่มีเซลล์ปริมาตร 50 µl/หลุม ความเข้มข้นสุดท้ายของตัวอย่างมีค่าเท่ากับ 0.001953 - 0.25 ng/ml ซึ่งมีความเป็นเส้นตรงช่วงการวิเคราะห์ นำเพลทไปบ่มที่ 37°C ในสภาวะที่มี CO₂ 5% เป็นเวลา 29 ชั่วโมง โดยมีสารมาตรฐาน Pegfilgrastim ที่ความเข้มข้น 10 ng/ml เป็น positive control และ assay medium เป็น negative control เมื่อครบเวลาวัด cell proliferation โดยใช้ชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูป CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega, USA) โดยเติม CellTiter-Glo solution ปริมาตร 100 µl/หลุม แล้วนำไปวัดค่า luminescence ด้วยเครื่อง Microplate luminometer รุ่น Orion L (Titertex Berthold, Germany) วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Bioassay Assist โดยใช้ parallel-line

model รายงานผลเป็นค่า %relative potency คำนวณค่าเฉลี่ยเรขาคณิต (Geometric Mean, GM), ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเรขาคณิต (Geometric Standard Deviation, GSD) และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%Geometric Coefficient of Variation, %GCV)

การทดสอบความถูกต้องของวิธี

ทำการทดสอบความจำเพาะ ความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ ความแม่นยำ ความเที่ยง และความคงทนของวิธี

ความจำเพาะ (Specificity) โดยการกระตุ้นเซลล์ adapted M-NSF-60 ด้วยสารมาตรฐาน ยา Pegfilgrastim ยี่ห้อต่างๆ และ formulation buffer ของยา Pegfilgrastim แต่ละยี่ห้อ ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ ทำการวิเคราะห์ต่างวัน โดยมีเกณฑ์การพิจารณา คือ เฉพาะสารมาตรฐานและตัวอย่างยาเท่านั้นที่สามารถกระตุ้นเซลล์ adapted M-NSF-60 ให้มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน ส่วน formulation buffer ของยาไม่สามารถกระตุ้นให้เซลล์แบ่งตัวเพิ่มจำนวนจึงจะถือว่าวิธีมีความจำเพาะ

ความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (Linearity and range) ตรวจวิเคราะห์ค่าความแรง Pegfilgrastim USP reference standard ที่เตรียมให้มีค่าความเข้มข้นคิดเป็น 50% (0.25 ng/ml), 75% (0.375 ng/ml), 100% (0.5 ng/ml), 150% (0.75 ng/ml) และ 200% (1 ng/ml) ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ เป็นอิสระต่อกัน วิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ Coefficient of determination; r^2) และ %GCV โดยมีเกณฑ์ยอมรับ $r^2 > 0.990$ และ %GCV น้อยกว่า 25% เกณฑ์การยอมรับได้มาจากการทดสอบจากการทำ pre-validation ของวิธีการทดสอบ^(18, 19)

ความแม่นยำ (Accuracy) ตรวจสอบค่าร้อยละการคืนกลับ (%recovery) ของค่าความแรงของ Pegfilgrastim USP reference standard ที่เตรียมให้มีความเข้มข้นคิดเป็น 50% (0.25 ng/ml), 100% (0.5 ng/ml) และ 200% (1 ng/ml) ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ ที่เป็นอิสระต่อกัน คำนวณ %recovery ดังนี้

$\%recovery = (\text{ค่าเฉลี่ยของ \%relative potency ที่วัดได้} / \%relative potency \text{ ที่ทราบค่า}) \times 100$
โดยเกณฑ์ยอมรับ %recovery เท่ากับ 80-125%

ความเที่ยง (Precision) ตรวจสอบใน 2 หัวข้อ ได้แก่ การทำซ้ำในวันเดียวกัน (Repeatability) ทดสอบความเที่ยงโดยวิเคราะห์ค่าความแรงของยา Pegfilgrastim ยี่ห้อ A รุ่นการผลิตเดียวกันจำนวน 6 ตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์ในวันและเวลาเดียวกัน โดยผู้วิเคราะห์คนเดียว วิเคราะห์หา %GCV และการทำซ้ำต่างวัน (Intermediate precision) โดยวิเคราะห์ค่าความแรงของยา Pegfilgrastim ยี่ห้อ A รุ่นการผลิตเดียวกันจำนวน 3 ซ้ำ ทำการวิเคราะห์ต่างวันกัน โดยผู้วิเคราะห์ 2 คน วิเคราะห์หา %GCV โดยมีเกณฑ์ยอมรับ %GCV น้อยกว่า 25% เกณฑ์การยอมรับได้มาจากการทดสอบจากการทำ pre-validation ของวิธีการทดสอบ^(18, 19)

ความคงทน (Robustness) โดยการเปลี่ยนแปลงสภาวะของการทดสอบที่อาจส่งผลต่อการวิเคราะห์คือ เปลี่ยน passage number ของเซลล์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ค่าความแรงยา โดยใช้ passage number 12, 16 และ 19 ในการทดสอบ นอกจากนี้ได้ทำการเปลี่ยนแปลงเวลาที่ใช้ในการบ่ม (incubate) โดยใช้ที่ 27 ชั่วโมง และที่ 29 ชั่วโมง และนำผลการวิเคราะห์มาคำนวณค่า %GCV โดยมีเกณฑ์ยอมรับ %GCV น้อยกว่า 25% เกณฑ์การยอมรับได้มาจากการทำ pre-validation ของวิธีการทดสอบ^(18, 19)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์และแสดงโดยสถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ GM GSD และ %GCV โดยใช้สูตรคำนวณต่อไปนี้

$$GM = \sqrt[n]{y_1 \times y_2 \times y_3 \dots y_N} = \exp \left[\frac{\ln(y_1) + \dots + \ln(y_N)}{n} \right]$$

$$GSD = \exp^{(SD(\ln(y_1), \ln(y_2), \ln(y_3), \dots, \ln(y_N)))}$$

$$\%GCV = \sqrt{\exp^{(\ln(GSD))^2} - 1} \times 100$$

ผล

การทดสอบความถูกต้องของวิธี

ความจำเพาะของวิธี โดยการกระตุ้น adapt M-NSF-60 cell lines ด้วยยา Pegfilgrastim ยี่ห้อต่างๆ และ formulation buffer ของยา Pegfilgrastim แต่ละยี่ห้อ ทำการทดสอบ 3 ครั้ง ต่างวันกัน พบว่ามีเฉพาะตัวอย่างยา Pegfilgrastim ยี่ห้อ A, B และ C สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ตามระดับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นได้ โดยมีค่าเฉลี่ยของ %relative potency เท่ากับ 115.3%, 108.1% และ 102.8% ตามลำดับ ในขณะที่ formulation buffer ของยาทุกยี่ห้อไม่สามารถกระตุ้นให้เกิด cell proliferation ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความจำเพาะของวิธี cell proliferation ในการวิเคราะห์ความแรงของยา Pegfilgrastim และ formulation buffer โดยทดสอบต่างวัน

ยี่ห้อ	ครั้งที่	%relative potency	formulation Buffer
A	1	101.2	- *
	2	123.1	-
	3	122.9	-
	GM	115.26	
	GSD	1.12	
	%GCV	11.30	
B	1	111.4	-
	2	123.0	-
	3	98.7	-
	GM	108.06	
	GSD	1.16	
	%GCV	14.78	
C	1	103.5	-
	2	113.9	-
	3	92.1	-
	GM	102.78	
	GSD	1.11	
	%GCV	10.67	

*เซลล์ไม่เกิดการเพิ่มจำนวน

ความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ โดยวิเคราะห์ค่าความแรง Pegfilgrastim reference standard ที่เตรียมให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 50% (0.25 ng/ml), 75% (0.375 ng/ml), 100% (0.5 ng/ml), 150% (0.75 ng/ml) และ 200% (1 ng/ml) ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ เป็นอิสระต่อกัน พบว่าผลการทดสอบแปรผันตามระดับความเข้มข้นเมื่อนำค่า expected potency และค่า found GM relative potency มาสร้างกราฟและคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ พบว่าได้กราฟที่เป็นเส้นตรงตลอดช่วงความเข้มข้น 50 - 200% และมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ Coefficient of determination; r^2) เท่ากับ 0.9967 ซึ่งผ่านเกณฑ์ที่กำหนด ($r^2 \geq 0.990$) แสดงให้เห็นว่า range ที่ทำการทดสอบมีความเหมาะสมจากการคำนวณค่า linear regression ได้ค่า r^2 เท่ากับ 0.9967 และได้ค่า F-test ที่คำนวณได้มีค่ามากกว่า F-test จากตาราง (critical value for the F-test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($\alpha = 0.05$) แสดงว่า กราฟเป็นเส้นตรงตลอดช่วงที่วิเคราะห์ และพบว่าค่าความแรงแปรผันตรงต่อระดับความเข้มข้น และค่า %GCV ของความแม่นยำของการทำซ้ำเท่ากับ 3.33, 4.73, 13.09, 15.20 และ 14.05 ตามลำดับ มี %recovery เท่ากับ 91.6%, 101.6%, 96.0%, 108.3% และ 106.5% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ของวิธี cell proliferation ในการทดสอบความแรงของ Pegfilgrastim USP reference standard

expected relative potency (%)	ครั้งที่	found relative potency (%)	GM	%GCV	%recovery
50	1	45.1	45.8	3.33	91.6
	2	44.8			
	3	47.6			
75	1	78.5	76.2	4.73	101.6
	2	78.2			
	3	72.2			
100	1	107.9	96.0	13.09	96.0
	2	83.4			
	3	98.2			
150	1	167.3	162.4	15.20	108.3
	2	137.8			
	3	185.6			
200	1	249.2	212.9	14.05	106.5
	2	190.9			
	3	202.7			

ความแม่นยำของวิธี แสดงด้วยค่า %recovery โดยในตัวอย่างที่เตรียมให้มีค่าความแรงของ Pegfilgrastim USP reference standard ที่ expected relative potency เท่ากับ 50%, 100% และ 200% พบว่าตัวอย่างที่ expected relative potency ที่ 50% สามารถตรวจค่าความแรงได้ค่า GM เท่ากับ 45.8% และ %recovery เท่ากับ 91.6% ขณะที่ตัวอย่างที่ expected relative potency ที่ 100% สามารถตรวจได้ค่า GM เท่ากับ 96.0% และ %recovery เท่ากับ 96.0% และเมื่อตัวอย่างที่ expected relative potency เป็น 200% สามารถตรวจค่าความแรงได้ค่า GM เท่ากับ 212.9 และ %recovery เท่ากับ 106.5% รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ความแม่นยำของวิธี cell proliferation ในการทดสอบความแรงของ Pegfilgrastim USP reference standard

expected relative potency (%)	ครั้งที่	found relative potency (%)	GM	%recovery
50	1	45.1	45.8	91.6
	2	44.8		
	3	47.6		
100	1	107.9	96.0	96.0
	2	83.4		
	3	98.2		
200	1	249.2	212.9	106.5
	2	190.9		
	3	202.7		

ความเที่ยงของวิธี ในหัวข้อ repeatability เมื่อทำการวิเคราะห์ค่าความแรงของยา Pegfilgrastim ยี่ห้อ A รุ่นการผลิตเดียวกันจำนวน 6 ตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์ในวันและเวลาเดียวกัน โดยผู้วิเคราะห์คนเดียว พบว่า %relative potency อยู่ในช่วงค่า 89.2 – 120.4%, $GM \pm GSD$ เท่ากับ $102.06 \pm 1.10\%$ และ %GCV เท่ากับ 9.70 ดังแสดงในตารางที่ 4 สำหรับการศึกษา intermediate precision ของผู้วิเคราะห์คนที่ 1 พบว่า %relative potency มีค่าอยู่ในช่วง 97.0 – 117.2% $GM \pm GSD$ เท่ากับ $104.33 \pm 1.11\%$ และ %GCV เท่ากับ 10.20 ผู้วิเคราะห์คนที่ 2 พบ %relative potency อยู่ในช่วง 88.2 – 97.2% $GM \pm GSD$ เท่ากับ $92.73 \pm 1.05\%$ และ %GCV เท่ากับ 4.87 ดังแสดงในตารางที่ 5

ความความคงทนของวิธี โดยการเปลี่ยนแปลงสภาวะของการทดสอบที่อาจส่งผลต่อการวิเคราะห์ คือ เปลี่ยน passage number ของเซลล์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ค่าความแรงยา A ได้ค่า %GCV เท่ากับ 4.97 นอกจากนี้ ได้ทำการเปลี่ยนแปลง incubation time จากเดิม 29 เป็น 27 ชั่วโมง ผลการทดสอบได้ค่า %GCV เท่ากับ 10.96 และ 11.12 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 6 และตารางที่ 7 และเมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่าง incubation time 27 และ 29 ชั่วโมง โดยใช้สถิติ t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances พบว่าไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยค่า t-Stat (1.56) ที่คำนวณได้มีค่าน้อยกว่าค่า t Critical one-tail (2.13)

ตารางที่ 4 ความเที่ยงของวิธี cell proliferation ในการทดสอบความแรงของยา Pegfilgrastim ยี่ห้อ A โดย การทดสอบในวันและเวลาเดียวกัน โดยผู้วิเคราะห์คนเดียว

ครั้งที่	%relative potency
1	100.2
2	89.2
3	104.1
4	120.4
5	101.4
6	99.5
GM	102.06
GSD	1.10
%GCV	9.70

ตารางที่ 5 ความเที่ยงของวิธี cell proliferation ในการทดสอบความแรงของยา Pegfilgrastim ยี่ห้อ A โดยการทดสอบต่างวัน โดยผู้วิเคราะห์สองคน

ครั้งที่	%relative potency	
	ผู้วิเคราะห์คนที่ 1	ผู้วิเคราะห์คนที่ 2
1	117.2	97.2
2	99.9	93.0
3	97.0	88.2
GM	104.33	92.73
GSD	1.11	1.05
%GCV	10.20	4.87

ตารางที่ 6 ความคงทนของวิธี cell proliferation ในการทดสอบความแรงของยา Pegfilgrastim ยี่ห้อ A เมื่อ เปลี่ยน passage number ของเซลล์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

Cell passage number	%relative potency	GM	GSD	%GCV
12	107.8	101.82	1.05	4.97
16	98.5			
19	99.4			

ตารางที่ 7 ความคงทนของวิธี cell proliferation ในการทดสอบความแรงของยา Pegfilgrastim ยี่ห้อ A เมื่อเปลี่ยนเวลาที่ใช้ใน incubate ที่ 37 °C จาก 29 ชั่วโมง เป็น 27 ชั่วโมง

Incubation time (ชั่วโมง)	%relative potency	GM	GSD	%GCV
29	95.3	90.98	1.12	10.96
	80.3			
	98.4			
27	98.3	104.79	1.12	11.12
	98.3			
	119.1			

วิจารณ์

ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธี พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะของวิธี โดยพบว่าเฉพาะตัวอย่างยา Pegfilgrastim ที่นำมาใช้เป็นตัวแทนในการทดสอบมีผลกระตุ้นให้จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น ขณะที่ formulation buffer ของยาแต่ละชนิดไม่สามารถกระตุ้นได้ แสดงให้เห็นว่าวิธีมีความจำเพาะและ formulation buffer ไม่มีผลต่อการทดสอบ นอกจากนี้การทดสอบความถูกต้องของวิธีในพารามิเตอร์อื่นๆ ได้แก่ ความเที่ยงของวิธีทั้งแบบทำซ้ำในวันเดียวกัน ทำซ้ำต่างวันกัน และความแม่นยำของวิธี พบว่าผ่านเกณฑ์ในทุกพารามิเตอร์ การทดสอบความเป็นเส้นตรงพบว่ากราฟเป็นเส้นตรงตลอดช่วงค่าร้อยละความเข้มข้น 50 – 200% และมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจเท่ากับ 0.9967 ความคงทนของวิธีสามารถใช้เซลล์ที่ passage 4 ถึง 20 และ incubation time ที่ 27–29 ชั่วโมง โดยผลการทดสอบไม่มีความแตกต่างกันจากผลการทดสอบ โดยทั่วไปการควบคุมคุณภาพของยา Pegfilgrastim จะตรวจสอบทั้งด้าน physicochemical และ biological activity ของยา⁽²⁰⁾ ซึ่งการตรวจสอบความแรงของยา Pegfilgrastim จะใช้วิธี cell proliferation assay โดยจะวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ของ adapted M-NSF-60 cells หลังกระตุ้นด้วย Pegfilgrastim ซึ่งห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งจะใช้วิธีการทดสอบ ชนิดของเซลล์ที่ใช้วิธีการอ่านผลการทดสอบแตกต่างกันไป ส่งผลให้ผลการวิเคราะห์มีความแตกต่างกัน^(21, 22, 23) นอกจากนี้ยังมีวิธีการทดสอบความแรงด้วยวิธีอื่น ๆ ได้แก่ วิธี receptor binding assay โดยใช้เครื่อง flow cytometer ในการวัดปริมาณ Pegfilgrastim ที่จับกับ G-CSF receptor และวิธีการวัด binding kinetic โดยวิธี Surface Plasmon Resonance (SPR)⁽²³⁾ จากการศึกษาโดย Biotherapeutics Group of NIBSC ซึ่งเป็นผู้ผลิตสารมาตรฐานของ WHO ได้จัดเตรียมสารมาตรฐานและส่งให้ห้องปฏิบัติการต่างๆ จำนวน 24 ห้องปฏิบัติการทุกห้องปฏิบัติการใช้วิธี cell proliferation assay จำนวน 13 ห้องปฏิบัติการใช้ M-NSF-60 cell line ซึ่งเป็นเซลล์ชนิดเดียวกับที่ใช้ในการศึกษานี้มีจำนวน 2 ห้องปฏิบัติการ ที่ใช้วิธีการอ่านค่า luminescence เหมือนที่ใช้ในการศึกษานี้ จากสรุปผลการทดสอบพบว่าห้องปฏิบัติการที่ใช้เซลล์และวิธีการอ่านผลการทดสอบเหมือนการศึกษานี้มีค่า %GCV น้อยกว่า 25% และมีค่า %GCV ต่ำเมื่อเทียบกับห้องปฏิบัติการที่ใช้เซลล์และวิธีการอ่านผลที่ต่างไป เช่น ใช้การอ่านค่าโดย colorimetric (MTT) นอกจากนี้วิธีการอ่านค่า luminescence ระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบสั้นกว่าเมื่อเทียบกับวิธี colorimetric⁽²⁴⁾ สิ่งที่ต้องคำนึงถึงในการทดสอบด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ คือ เซลล์ที่ใช้ในการทดสอบควรมีสภาพของเซลล์ดี ไม่มีการปนเปื้อนแบคทีเรีย เชื้อราและไม่โครพลาสมา ควรใช้เซลล์ที่ผ่านการกระตุ้นด้วย G-CSF เพื่อให้เซลล์มีความไวต่อการกระตุ้นให้เพิ่มจำนวนด้วยยา Pegfilgrastim ควรใช้เซลล์ passage ที่ 4–20 ในการทดสอบ จากผลการศึกษาทั้งหมดนี้เห็นได้ว่าวิธีนี้สามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์ความแรงของยาได้ทั้ง 3 ยี่ห้อ ที่ใช้ในการศึกษา แต่จะนำวิธีนี้ไปพิสูจน์ทดลองใช้กับยี่ห้ออื่นภายหลัง

สรุป

การทดสอบความแรงของยา Pegfilgrastim โดยวิธี cell proliferation ที่พัฒนาขึ้น เมื่อทดสอบความถูกต้องของวิธี พบว่าวิธีการทดสอบมีความจำเพาะ ความแม่นยำ ความเที่ยง และความคงทนของวิธี โดยมีค่า %relative potency อยู่ในช่วง 80-125% ซึ่งสามารถนำวิธีนี้ไปใช้เป็นการควบคุมคุณภาพยา Pegfilgrastim 3 ยี่ห้อ ที่นำมาใช้ในการศึกษา สำหรับยี่ห้ออื่นๆ ต้องตรวจสอบวิธีก่อนนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

1. Molineux G. The design and development of pegfilgrastim (PEG-rmetHuG-CSF, Neulasta). *Curr Pharm Des* 2004; 10(11): 1235-44.
2. Yang BB, Kido A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of pegfilgrastim. *Clin Pharmacokinet* 2011; 50(5): 295-306.
3. Molineux G. Pegfilgrastim: using pegylation technology to improve neutropenia support in cancer patients. *Anticancer Drugs* 2003; 14(4): 259-64.
4. Curran MP, Goa KL. Pegfilgrastim. *Drugs* 2002; 62(8): 1207-13.
5. Knezevic I, Griffiths E. Biosimilars – global issues, national solutions. *Biologicals* 2011; 39(5): 252-5.
6. Knezevic I. Evaluation of similar biotherapeutic products (SBPs): scientific principles and their implementation. *Biologicals* 2011; 39(5): 256-61.
7. Roger SD. Biosimilars: current status and future directions. *Expert Opin Biol Ther* 2010; 10(7): 1011-8.
8. European Medicines Agency. Guideline on similar biological medicinal products. [online]. 2005; [cited 2018 Jul 19]; [7 screens]. Available from: URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-first-version_en.pdf.
9. European Medicines Agency. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues. [online]. 2006; [cited 2018 Jul 19]; [8 screens]. Available from: URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-containing-biotechnology-derived-proteins-active_en.pdf.
10. European Medicines Agency. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues. [online]. 2006; [cited 2018 Jul 19]; [8 screens]. Available from: URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-containing-biotechnology-derived-proteins-active_en-1.pdf.
11. Guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products (SBPs). In: WHO expert committee on biological standardization. Geneva, 19-23 Oct 2009. [online]. 2010; [cited 2018 Jul 19]; [34 screens]. Available from: URL: https://www.who.int/biologicals/areas/biological_therapeutics/BIOTHERAPEUTICS_FOR_WEB_22APRIL2010.pdf.

12. Thorpe R, Wadhwa M. Intended use of reference products & WHO international standards/reference reagents in the development of similar biological products (biosimilars). *Biologicals* 2011; 39(5): 262-5.
13. Annex 2: guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products (SBPs). In: WHO expert committee on biological standardization, sixtieth report. (WHO technical report series, no. 977). Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2013. p. 51-89.
14. U.S. Pharmacopeia National Formulary. USP 42 NF 37, Vol. 1: Rockville, MD.: The United States Pharmacopeial Convention; 2019. p. 1844-1845.
15. Wadhwa M, Bird C, Dilger P, Mire-Sluis T, Thorpe R. Quantitative biological assays. In: Balkwill FR, editor. *Cytokine cell biology: a practical approach*. 3rd ed. New York: Oxford University Press; 2000. p. 207-238.
16. Weinstein Y, Ihle JN, Lavu S, Reddy EP. Truncation of the c-myb gene by a retroviral integration in an interleukin 3-dependent myeloid leukemia cell line. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1986; 83(14): 5010-4.
17. European Medicines Agency. ICH topic Q2 (R1) validation of analytical procedures: text and methodology. (CPMP/ICH/381/95). [online]. 2006; [cited 2018 Jul 19]; [15 screens]. Available from: URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf.
18. ASEAN guidelines for validation of analytical procedures for vaccines. [online]. 2018; [cited 2018 Jul 19]; [19 screens]. Available from: URL: <https://asean.org/wp-content/uploads/2018/01/25PPWG-ANNEX-7-iii-Final-revision-of-analytical-method-validation-for-vaccinesdocx.pdf>.
19. Schofield TL. Assay development. In: Chow SC, editor. *Encyclopedia of biopharmaceutical statistics*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker; 2003. p. 55-62.
20. Sorgel F, Lerch H, Lauber T. Physiochemical and biologic comparability of a biosimilar granulocyte colony-stimulation factor with its reference product. *BioDrugs* 2010; 24(6): 347-57.
21. Wadhwa M, Bird C, Hamill M, Health AB, Matejtschuk P, Thorpe R, et al. The 2nd international standard for human granulocyte colony stimulating factor. *J Immunol Methods* 2011; 367(1-2): 63-9.
22. Brokx S, Scrocchi L, Shah N, Dowd J. A demonstration of analytical similarity comparing a proposed biosimilar pegfilgrastim and reference pegfilgrastim. *Biologicals* 2017; 48: 28-38.
23. Tiwari K, Wavdhane M, Haque S, Govender T, Kruger HG, Mishra MK, et al. A sensitive WST-8-based bioassay for PEGylated granulocyte colony stimulating factor using the NFS-60 cell line. *Pharm Biol* 2015; 53(6): 849-54.
24. Wadhwa M, Bird C, Dougall T, Rigsby P, Bristow A, Thorpe R, et al. Establishment of the first international standard for PEGylated granulocyte colony stimulating factor (PEG-G-CSF): report of an international collaborative study. *J Immunol Methods* 2015; 416: 17-28.

Development of Pegfilgrastim Potency Testing by Cell Proliferation

**Sompong Sapsutthipas Jiradej Patchim Saiwarul Jadoonkittinan
and Supaporn Phumiamorn**

Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Pegfilgrastim is a growth factor that stimulates the growth of white blood cells. At present, there is no standard method for determining the potency of this drug in any international pharmacopoeia. Therefore, a cell proliferation assay was developed by stimulating the adapted M-NSF-60 with diluted drugs at a suitable concentration. The increasing number of cells was measured by using luminescence substrate. The results were analyzed using a parallel line analysis program to determine the drug potency. After the method had been validated, the results showed that pegfilgrastim could stimulate the adapted M-NSF-60 multiplication. For the accuracy, the %recovery within the acceptance criteria from 80% to 125%. The precision of the method, the %GCV of repeatability and intermediate precision were 9.70 and 9.65, respectively, with a linearity and appropriate range between 50–200%. The linearity and range exhibited the r^2 value of 0.997. The robustness of the method was tested by modifying the passage numbers of cells and the incubation time., the %GCV was <25% and there was no significant difference at the 95% confidence level. All data show that the newly developed method is suitable for use as a method for determining the potency of pegfilgrastim 3 brands used in this study. For other brands of drugs must verify the method before applying.

Keywords : Pegfilgrastim, Potency, Cell proliferation, Method validation, Method development

การเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ จากเลือดสายสะดือด้วยอาหารเพาะเลี้ยง ที่ใช้ซีรัมจากเลือดสายสะดือ

ศุภรัตน์ วิจิตรเวียงรัตน์¹ ศศิประภา ทองบพิตร¹ สุภักดี จุลวิจิตรพงษ์¹ เพียงใจ วิชัยดิษฐ² ภัสรา หากุหลาบ² และ
ทัศนีย์ เพิ่มไทย¹

¹หน่วยวิจัยและพัฒนาเซลล์ต้นกำเนิดเพื่อการรักษาทางการแพทย์ ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราช
พยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล บางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700

²งานการพยาบาลสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา ฝ่ายการพยาบาล ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
มหาวิทยาลัยมหิดล บางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700

บทคัดย่อ ในปัจจุบัน การเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากเลือดสายสะดือ ทำได้โดยเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีซีรัมจาก
ลูกวัวชนิดพิเศษสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนเท่านั้น การใช้ซีรัมเชิงพาณิชย์จากมนุษย์มีรายงานถึงความสำเร็จได้น้อย
อย่างไรก็ตามจากการวิจัยก่อนหน้านี้ได้กล่าวถึงความสำเร็จในการใช้ซีรัมเลือดสายสะดือมนุษย์มาใช้สร้างสายพันธุ์และเพาะเลี้ยง
เซลล์ต้นกำเนิดจากน้ำคร่ำได้สำเร็จ ทำให้เกิดสมมติฐานว่าซีรัมเลือดสายสะดือมนุษย์อาจนำมาใช้ทดแทนซีรัมจากลูกวัวได้ การ
ศึกษานี้นำซีรัมเลือดสายสะดือมนุษย์ที่ผลิตขึ้น มาใช้เติมในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือจำนวน 49 ตัวอย่าง
เปรียบเทียบกับอาหารที่มีซีรัมจากลูกวัว ผลการศึกษาพบว่าซีรัมเลือดสายสะดือมนุษย์สามารถนำมาสร้างสายพันธุ์และเพาะเลี้ยง
เซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือได้ โดยเซลล์ที่ได้มีรูปร่างและลักษณะเฉพาะของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ไม่แตกต่างกัน มี
การแสดงออกของ CD29, CD73, CD90 และ CD105 ไม่พบการแสดงออกของ CD34 และ CD45 นอกจากนี้ยังสามารถ
เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ไขมันและเซลล์กระดูกได้ โดยเซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากลูกวัวมีการเจริญเติบโตเร็วกว่า
เซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงในซีรัมเลือดสายสะดือมนุษย์ จากผลการศึกษาสรุปได้ว่า ซีรัมเลือดสายสะดือมนุษย์สามารถใช้แทน
ซีรัมจากลูกวัวสำหรับสร้างและเพาะเลี้ยงสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากเลือดสายสะดือได้

คำสำคัญ: เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากเลือดสายสะดือ, ซีรัมจากลูกวัวชนิดพิเศษสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน,
ซีรัมเลือดสายสะดือมนุษย์

Corresponding author E-mail: stemcells_siriraj@yahoo.com

Received: 13 March 2020

Revised: 20 September 2020

Accepted: 23 February 2021

บทนำ

เซลล์ต้นกำเนิดเป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติพิเศษที่แตกต่างจากเซลล์ร่างกายทั่วไป 2 ประการ คือ สามารถแบ่งตัวได้อย่างรวดเร็ว โดยเซลล์ที่ได้ยังคงคุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด และสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ชนิดอื่นได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม จากคุณสมบัติเหล่านี้ทำให้เซลล์ต้นกำเนิดเป็นความหวังที่จะนำไปปลูกถ่ายให้แก่ผู้ป่วยเพื่อการรักษาโรคในปัจจุบันที่ยังทำการรักษาได้ไม่หายขาด เช่น โรคอัลไซเมอร์ โรคพาร์คินสัน โรคเบาหวาน และการบาดเจ็บของไขสันหลัง^(1, 2, 3, 4, 5) โดยโรคที่ทางแพทยสภาได้ออกข้อกำหนดให้สามารถปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดให้แก่คนไข้เพื่อทำการรักษาโรคได้ คือ โรคทางโลหิตวิทยา เช่น โรคกระดูกไขกระดูกพรุน และโรคธาลัสซีเมีย ส่วนการรักษาในโรคอื่น ๆ ถือว่ายังอยู่ในขอบข่ายงานวิจัย ด้วยเหตุนี้จึงทำให้การศึกษาด้านเซลล์ต้นกำเนิดได้รับความสนใจในวงกว้างอย่างรวดเร็ว

ในปี ค.ศ.1988 ได้มีการปลูกถ่ายเลือดสายสะดือของพี่สาวที่มีความเข้ากันของระบบภูมิคุ้มกันกับน้องชายที่เป็นโรค Fanconi anemia ได้สำเร็จ และยังคงใช้ชีวิตได้ตามปกติจนถึงปัจจุบัน^(6, 7) จากรายงานฉบับนี้ทำให้มีผู้สนใจศึกษาเกี่ยวกับเลือดสายสะดือเป็นจำนวนมาก และได้มีกลุ่มผู้จัดตั้งธนาคารเลือดสายสะดือขึ้นในหลายประเทศ ซึ่งมีการค้นพบเซลล์ต้นกำเนิดอยู่ 3 ชนิดด้วยกัน คือ เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด (hematopoietic stem cell) เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ (mesenchymal stem cell) และ endothelial progenitor cell^(8, 9, 10, 11) ข้อดีของเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือคือ สามารถฟื้นฟูระบบของเซลล์เม็ดเลือด ง่ายได้ง่าย และเมื่อนำไปปลูกถ่ายให้แก่ผู้ป่วยแล้วไม่พบปัญหาเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันเมื่อทำการเปรียบเทียบกับเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก^(8, 12) โดยมีรายงานว่าสามารถนำเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือไปปลูกถ่ายในผู้ป่วยได้เป็นผลสำเร็จและอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยในช่วงเวลา 3 ปี ใกล้เคียงกับผู้ป่วยที่ได้รับเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก⁽¹³⁾ อย่างไรก็ตามเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือยังมีข้อจำกัดด้านปริมาณเซลล์ที่ได้^(14, 15) ซึ่งเมื่อนำไปปลูกถ่ายในผู้ป่วยเด็กที่มีน้ำหนักน้อยจะได้ผลดีกว่าในผู้ป่วยเด็กที่มีน้ำหนักมากกว่า เนื่องจากจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดที่ใช้ปลูกถ่ายต้องมีความเหมาะสมกับน้ำหนักตัวของผู้ได้รับการปลูกถ่าย⁽⁷⁾ จึงเป็นเหตุให้ต้องมีการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนก่อนนำไปใช้ในการปลูกถ่าย

ในปัจจุบันได้มีการนำเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือมาเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนและเมื่อนำเซลล์ที่ได้ไปตรวจสอบคุณสมบัติด้วยโปรตีนจำเพาะ พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนจำเพาะของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ คือ CD29, CD44, CD73, CD90 และ CD105 และยังสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆ ได้ เช่น เซลล์ไขมัน, เซลล์กระดูก และเซลล์กระดูกอ่อน^(9, 12, 15) โดยปกติในขั้นตอนการแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดยังจำเป็นต้องใช้แหล่งโปรตีนจากซีรัมสัตว์ที่มีจำหน่ายเชิงพาณิชย์โดยเฉพาะซีรัมจากลูกวัว (fetal bovine serum: FBS) เติมนในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้ประสิทธิภาพการแบ่งตัวของเซลล์ต้นกำเนิดไม่ดี^(16, 17, 18) และอาจเกิดการปนเปื้อนเชื้อไวรัส (virus transmission) บางชนิดจากสัตว์สู่คนได้^(19, 20, 21) และตามที่เซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือของมนุษย์อยู่ในระบบการไหลเวียนของเลือด ซึ่งจะได้รับโปรตีนจากซีรัมของมนุษย์ในกระแสเลือด จากรายงานก่อนหน้านี้แสดงถึงความสำเร็จของการใช้ซีรัมจากเลือดสายสะดือมาใช้สร้างสายพันธุ์และเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดชนิดต่างๆ เช่น เซลล์ต้นกำเนิดจากน้ำคร่ำ, จาก Wharton's jelly, จากผนังมดลูกชั้นใน และจากเยื่อผนังมดลูกชั้นใน^(17, 18, 22, 23) โดยสายพันธุ์ที่ได้มีลักษณะและรูปร่างไม่แตกต่างจากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากลูกวัว การแสดงออกของโปรตีนจำเพาะบนผิวเซลล์ และความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นร่างกายจำเพาะก็ไม่แตกต่างกัน แต่เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากเลือดสายสะดือมีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากลูกวัว ดังนั้นถ้าทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกได้จากเลือดสายสะดือมนุษย์ด้วยซีรัมจากเลือดสายสะดือเอง อาจทำให้เซลล์ต้นกำเนิดสามารถแบ่งตัวได้ดีกว่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีซีรัมจากลูกวัวและเป็นผลดีต่อการนำมาใช้รักษาผู้ป่วยในอนาคต

วัสดุและวิธีการ

การเก็บเลือดสายสะดือ

ทำการเก็บเลือดสายสะดือของทารกแรกคลอดจากห้องคลอดหรือห้องผ่าตัดของโรงพยาบาลศิริราชจำนวน 49 ตัวอย่าง ปริมาณตัวอย่างละ 50–100 มิลลิลิตร โดยหญิงตั้งครรภ์ที่ยินยอมเข้าร่วมโครงการต้องผ่านการตรวจร่างกายตามระเบียบการฝากครรภ์ และแสดงความยินยอมลงนามในเอกสารที่ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน ตามหมายเลข Si025/2012 ซึ่งตัวอย่างเลือดต้องมีผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการว่าปลอดเชื้อ Syphilis, Hepatitis B, Hepatitis C และ HIV type I/II โดยการเก็บเลือดสายสะดือนั้นจะทำการเก็บในถุงเก็บเลือดปลอดเชื้อของสภาอากาศไทย ขนาดบรรจุ 500 มิลลิลิตร ที่มีส่วนผสมของสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดชนิด Heparin ในความเข้มข้น Heparin 0.1 มิลลิกรัมต่อเลือด 1 มิลลิลิตร และนำส่งห้องปฏิบัติการภายใน 6 ชั่วโมง หลังจากการเก็บเลือดสายสะดือ

การแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือ

นำเลือดสายสะดือที่ได้มาปั่นที่ 1,800x g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส (Heraeus Labofuge 400R centrifuge, Thermo Scientific, USA) เมื่อครบเวลาให้เก็บส่วนของ buffy coat มาผสมกับ phosphate buffered saline ที่มีส่วนผสมของ 2 mM Ethylenediaminetetraacetic acid (PBS/EDTA; Sigma-Aldrich, USA) ในอัตราส่วน buffy coat 1 มิลลิลิตรต่อสารละลาย PBS/EDTA 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ว overlay ลงบนสารละลาย ficoll (Ficoll-Paque Plus; GE Healthcare, Sweden) ในอัตราส่วนของสาร ficoll 3 มิลลิลิตร ต่อ buffy coat ที่ผสมด้วย PBS/EDTA 7 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ 1,000x g นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส แล้วจึงเก็บส่วนของ mononuclear cells ใส่หลอดทดลองใหม่ ล้างด้วย PBS/EDTA 3 ครั้ง โดยในแต่ละครั้งต้องนำไปปั่นที่ 400x g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง เมื่อทำครบ 3 ครั้งแล้ว ให้เก็บตะกอนเซลล์แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม เลี้ยงในภาชนะเพาะเลี้ยงที่มีการเคลือบด้วย 10 ng/ml fibronectin ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีส่วนประกอบของ Dulbecco's modified Eagle's Medium ชนิด low glucose (DMEM-LG; Gibco, Invitrogen, USA), 2 mM L-glutamine (Gibco), 100 U/ml penicillin/streptomycin (Gibco), 4 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF; Millipore, Billerica, USA) และ 10% ES-FBS (Sigma-Aldrich, Merck, Germany) หรือ hUCS ที่ได้แยกตามวิธีการของ Phermthai T⁽²³⁾ โดยนำไปเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 3 วัน จนกระทั่งเซลล์มีความหนาแน่นประมาณร้อยละ 80 ของพื้นที่ผิวภาชนะเพาะเลี้ยง จึงทำการ subculture ด้วย 0.25% trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich) และนำเซลล์ลงเลี้ยงในภาชนะที่ไม่มีการเคลือบด้วย fibronectin สู่ passage ต่อไป

การตรวจสอบความสามารถในการเพิ่มจำนวนเซลล์ (population doubling time; PDT)

นับเซลล์ด้วย hemocytometer ภายหลังจากการ subculture ในทุก passage และคำนวณหาระยะเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์ ตามสูตร

$$PDT = t \times \log 2 / (\log NH - \log NI)$$

NI คือ จำนวนเซลล์เริ่มต้น

NH คือ จำนวนเซลล์เมื่อทำการเก็บ

t คือ ระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ (วัน)

ซึ่งจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงแต่ละชนิดจะถูกนำมาคำนวณหาค่า PDT ทั้งก่อนและหลังการเก็บรักษาโดยการแช่แข็ง

การตรวจสอบโปรตีนจำเพาะบนผิวเซลล์ด้วยเทคนิค flow cytometry

นำเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือ passage ที่ 4 จากการเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนในอาหารแต่ละชนิดมาตรวจสอบคุณสมบัติจำเพาะ ด้วยวิธี flow cytometry โดยการย้อมด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ ได้แก่ CD29, CD73, CD90 และ CD105 (eBioscience, San Diego, USA) และแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือด ได้แก่ CD34 และ CD45 (Becton Dickinson, USA) บ่ม 15 นาที ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง ก่อนล้างด้วย PBS 1 ครั้ง ตรึงเซลล์ด้วย 1% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) ก่อนนำไปวัดด้วยเครื่อง FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson) และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CELL Quest (Becton Dickinson)

การแช่แข็งเก็บเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือ (cryopreservation)

ทำการแช่แข็งเก็บเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือในน้ำยาแช่แข็ง (freezing medium) 1 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย DMEM-LG, 7.5% dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich) และ 40% ES-FBS หรือ hUCS แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นาน 1 วัน ก่อนนำไปเก็บรักษาเซลล์ในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 เดือน เมื่อครบกำหนดให้นำมาละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และใส่ลงในอาหารที่มีส่วนประกอบของ DMEM-LG และ 10% ES-FBS หรือ hUCS ในปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ก่อนนำไปปั่นและนำตะกอนเซลล์ที่ตกลงเพาะเลี้ยงในอาหาร 2 ชนิด โดยตรวจสอบร้อยละการรอดชีวิต (%cell viability) ด้วยการย้อมด้วย trypan blue (Sigma-Aldrich) ซึ่งเซลล์ที่ไม่ติดสี คือ เซลล์เป็น ส่วนเซลล์ที่ติดสีน้ำเงิน คือ เซลล์ตาย และนำจำนวนเซลล์ที่ได้มาคำนวณตามสูตร

$$\% \text{cell viability} = (\text{จำนวนเซลล์เป็น} / \text{จำนวนเซลล์เป็น} + \text{จำนวนเซลล์ตาย}) \times 100$$

การตรวจสอบความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ร่างกาย (differentiation)

1. การเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดให้พัฒนาไปเป็นเซลล์ไขมัน

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดที่ความหนาแน่น 1×10^3 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิด จนกระทั่งได้ความหนาแน่นประมาณร้อยละ 50 ของพื้นที่ผิวภาชนะเพาะเลี้ยง จากนั้นเปลี่ยนเป็นน้ำยาเหนี่ยวนำสำหรับเซลล์ไขมันซึ่งประกอบด้วย DMEM-LG (Gibco), 10% ES-FBS, 1 μM dexamethasone, 5 μM insulin, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine และ 60 μM indomethacin (Sigma-Aldrich) เป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยทำการเปลี่ยนน้ำยา 2 ครั้งต่อสัปดาห์ หลังจากนั้นตรึงเซลล์ด้วย 10% formalin (Sigma-Aldrich) และทำการย้อมสีด้วย Oil Red O (Sigma-Aldrich) เพื่อตรวจสอบความสามารถในการสร้างเม็ดไขมันของเซลล์ โดยจะย้อมติดสีแดงบนเม็ดไขมัน

2. การเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดให้พัฒนาไปเป็นเซลล์กระดูก

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดที่ความหนาแน่น 1×10^3 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิด จนกระทั่งได้ความหนาแน่นประมาณร้อยละ 50-70 ของพื้นที่ผิวภาชนะเพาะเลี้ยง จากนั้นเปลี่ยนเป็นน้ำยาเหนี่ยวนำสำหรับเซลล์กระดูกซึ่งประกอบด้วย DMEM-LG (Gibco), 10% ES-FBS, 0.1 μM dexamethasone, 10 mM glycerol-2-phosphate disodium salt hydrate และ 50 μM ascorbic acid (Sigma-Aldrich) เป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยทำการเปลี่ยนน้ำยา 2 ครั้งต่อสัปดาห์ หลังจากนั้นตรึงเซลล์ด้วย 10% neutral buffered formalin และทำการย้อมสีด้วย Alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich) เพื่อตรวจสอบความสามารถของเซลล์ในการสร้างเอนไซม์ ซึ่งจะติดสีน้ำตาลดำบนเซลล์

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (Statistical analysis)

ข้อมูลทุกค่านำเสนอในรูปค่าเฉลี่ย (mean) $\pm$ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) และใช้ Student's t test ในการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่า PDT ในแต่ละ passage เพื่อวิเคราะห์ความสามารถในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือในอาหารเพาะเลี้ยงทั้ง 2 ชนิด โดยวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5 (GraphPad, USA) ซึ่งค่า p ที่น้อยกว่า 0.05 หรือที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผล

การเก็บเลือดสายสะดือ

จากการเก็บเลือดสายสะดือของทารกแรกคลอดทั้งหมด 49 ตัวอย่าง พบว่าอายุครรภ์ของมารดาตั้งครรภ์ปกติที่เข้าร่วมโครงการมีอายุครรภ์อยู่ระหว่าง 35-40 สัปดาห์ คิดเป็นค่าเฉลี่ย 38.3 ± 1.3 สัปดาห์ โดยมีค่ามัธยฐาน 39 สัปดาห์ ส่วนปริมาณของเลือดสายสะดือที่เก็บได้อยู่ระหว่าง 22-134 มิลลิลิตร คิดเป็นค่าเฉลี่ย 60.3 ± 26 มิลลิลิตร ซึ่งมีค่ามัธยฐาน 56 มิลลิลิตร

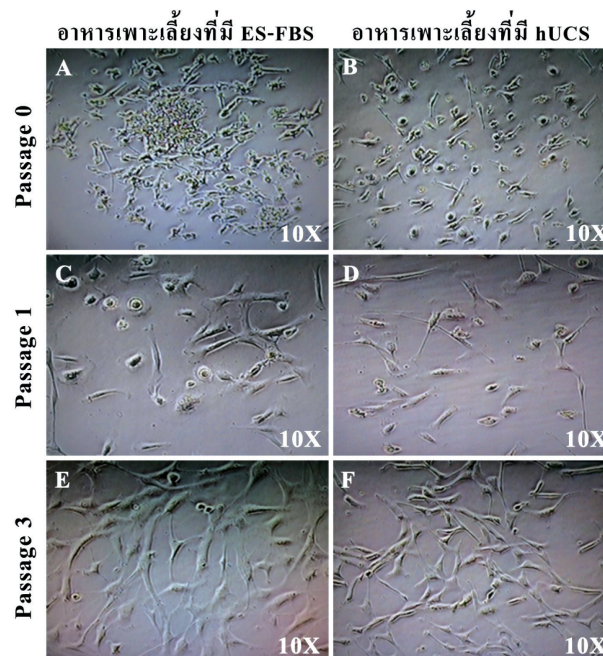
การแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือ

ภายหลัง 3 วันแรก ของการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยงแต่ละชนิด พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือที่แยกได้มีลักษณะการกระจายตัวบนพื้นภาชนะเลี้ยงเซลล์แตกต่างกัน โดยเซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากลูกวัวจะอยู่กันเป็นโคโลนีเป็นส่วนใหญ่ เซลล์ที่ได้มีลักษณะคล้ายไฟโบร بلاสต์ พบเซลล์มีลักษณะกลมคล้ายเซลล์เม็ดเลือดปะปนอยู่ และกระจายทั่วพื้นภาชนะ ส่วนเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากเลือดสายสะดือนั้น เซลล์ส่วนใหญ่จะอยู่แบบกระจายทั่วพื้นภาชนะ ไม่เป็นโคโลนี ซึ่งเซลล์ที่พบมีรูปร่างลักษณะคล้ายไฟโบร بلاสต์อยู่ปะปนกับเซลล์กลม และพบว่าขนาดของเซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากเลือดสายสะดือมีขนาดเล็กกว่าเซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากลูกวัว ดังแสดงในภาพที่ 1A และ 1B ซึ่งในการแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือนี้นี้ไม่สามารถทำได้สำเร็จในทุกตัวอย่าง โดยได้แสดงผลร้อยละความสำเร็จของการแยกและเพาะเลี้ยงทั้งหมด 49 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ร้อยละความสำเร็จของการแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือในซีรัมจากลูกวัว (ES-FBS) และซีรัมจากเลือดสายสะดือ (hUCS) ในแต่ละ passage จำนวน 49 ตัวอย่าง

passage	ซีรัมจากลูกวัว		ซีรัมจากเลือดสายสะดือ	
	จำนวนตัวอย่าง	ร้อยละความสำเร็จ	จำนวนตัวอย่าง	ร้อยละความสำเร็จ
0	49	100	49	100
1	21	42.86	20	40.82
2	6	12.24	6	12.24
3	3	6.12	5	10.2
4	2	4.08	3	6.12
5-10	2	4.08	2	4.08

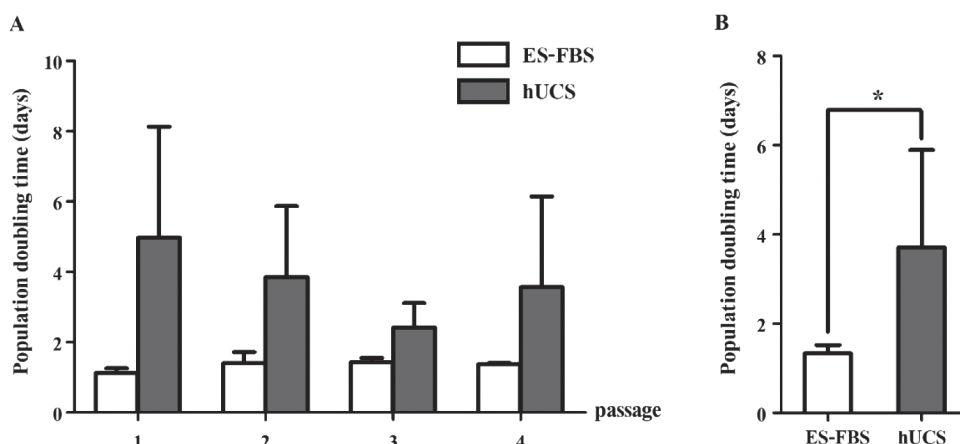
ระหว่างการเพาะเลี้ยงสังเกตได้ว่า เซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีซีรัมแต่ละชนิด ในช่วงระยะ passage 0-1 มีเซลล์รูปร่างหลายแบบปะปนกัน ดังแสดงในภาพที่ 1C และ 1D แต่เมื่อเพาะเลี้ยงต่อเนื่องจนถึง passage 2-3 พบว่าเซลล์ที่ได้มีเพียงลักษณะเดียว (homogeneous) คล้ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ดังแสดงในภาพที่ 1E และ 1F



ภาพที่ 1 ลักษณะรูปร่างของเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีซีรัมจากลูกวัว (ES-FBS) และในอาหารที่มีซีรัมจากเลือดสายสะดือ (hUCS) โดยจะเห็นว่าใน 3 วันแรกของการเพาะเลี้ยง พบเซลล์อยู่กันเป็นโคโลนีในอาหารที่มีซีรัมจากลูกวัว (A) และอยู่กันแบบกระจายตัวในอาหารที่มีซีรัมจากเลือดสายสะดือ (B) เมื่อทำการเพาะเลี้ยง passage 1 พบว่าเซลล์มีการปะปนกันหลายรูปแบบ คือ มีแบบคล้ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์และมีแบบเป็นเม็ดกลมๆ ในอาหารเพาะเลี้ยงทั้ง 2 ชนิด (C, D) และเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไปจนถึง passage 3 จะพบว่าเซลล์ที่มีลักษณะเม็ดกลมจะหมดไป เหลือเพียงเฉพาะเซลล์ที่มีรูปร่างคล้ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์เท่านั้น ทั้งในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีซีรัมจากลูกวัวและซีรัมจากเลือดสายสะดือ (E, F) (ภาพกำลังขยาย 100 เท่า)

ผลการศึกษาพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อเนื่องจนถึง passage ที่ 4 เซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากลูกวัวเหลือเพียง 2 สายพันธุ์ และเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากเลือดสายสะดือเหลือเพียง 3 สายพันธุ์ โดยความสำเร็จของการแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์อยู่ที่ร้อยละ 4.08 และ 6.12 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 สำหรับการตรวจสอบความสามารถในการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยวิธีการคำนวณค่า PDT ของเซลล์ที่ passage 1-4 พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากลูกวัวมีศักยภาพในการแบ่งตัวที่สูง คือ มีค่า PDT ที่ต่ำกว่าเซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากเลือดสายสะดือ ดังแสดงในภาพที่ 2A และเมื่อคำนวณค่าเฉลี่ยของ PDT ในทุก passage ของเซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากลูกวัวมีค่าเท่ากับ 1.33 ± 0.19 วัน (อยู่ระหว่าง 1.03-1.63 วัน) ในขณะที่เซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากเลือดสายสะดือมีค่าเท่ากับ 3.71 ± 2.18 วัน (อยู่ระหว่าง 1.37-7.19 วัน) จะเห็นได้ว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากลูกวัวมีความสามารถในการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้สูงกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากเลือดสายสะดืออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ดังแสดงในภาพที่ 2B โดยในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ พบว่ามีเซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากเลือดสายสะดือ 1 สายพันธุ์ที่ไม่สามารถเลี้ยงต่อได้ เนื่องจากเซลล์มีสถานะเข้าสู่ senescence ที่ passage 4 จึงจำเป็นต้องคัดออกจาก การทดลอง



ภาพที่ 2 ผลของระยะเวลาการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (PDT) ของเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากลูกวัว (ES-FBS, n = 2) และในซีรัมจากเลือดสายสะดือ (hUCS, n=3) โดยแสดงค่าเป็น mean $\pm$ SD ของแต่ละ passage (A) และ ของ passage 1-4 (B)

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

การตรวจสอบโปรตีนจำเพาะบนผิวเซลล์ด้วยเทคนิค flow cytometry

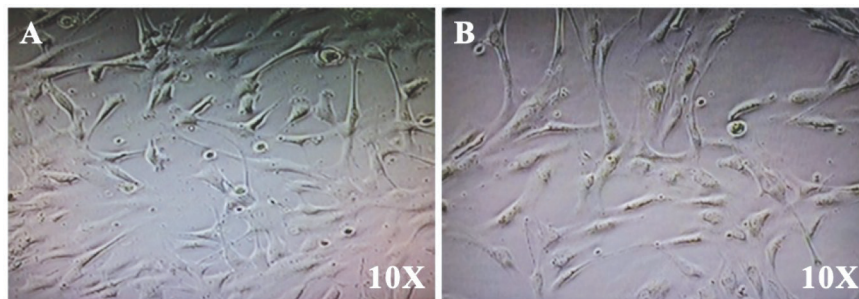
นำเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือ passage ที่ 4 มาตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนจำเพาะบนผิวเซลล์ โดยย้อมด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนบนผิวเซลล์และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค flow cytometry พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือที่เพาะเลี้ยงทั้งในซีรัมจากลูกวัวและซีรัมจากเลือดสายสะดือมีการแสดงออกของโปรตีนจำเพาะต่อเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ ได้แก่ CD29, CD73, CD90 และ CD105 และไม่มีการแสดงออกหรือแสดงออกในระดับที่ต่ำของโปรตีนจำเพาะต่อเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือด ได้แก่ CD34 และ CD45 อย่างไรก็ตามพบว่ามีเซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากเลือดสายสะดือ 1 สายพันธุ์ ที่มีการแสดงออกของ CD90 ในระดับที่ต่ำ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การแสดงออกของโปรตีนจำเพาะบนผิวเซลล์ของเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากลูกวัว (ES-FBS, n=2) และในซีรัมจากเลือดสายสะดือ (hUCS, n=2) โดยแสดงค่าเป็น mean $\pm$ SD

โปรตีนจำเพาะบนผิวเซลล์	ซีรัมจากลูกวัว (%)	ซีรัมจากเลือดสายสะดือ (%)
CD29	94.46 $\pm$ 6.95	94.36 $\pm$ 2.42
CD34	4.27 $\pm$ 4.36	5.68 $\pm$ 7.5
CD45	0.92 $\pm$ 0.91	0.63 $\pm$ 0.01
CD73	99.47 $\pm$ 0.42	96.46 $\pm$ 0.76
CD90	99.85 $\pm$ 0.11	50.88 $\pm$ 67.76
CD105	99.83 $\pm$ 0.18	99.27 $\pm$ 0.89

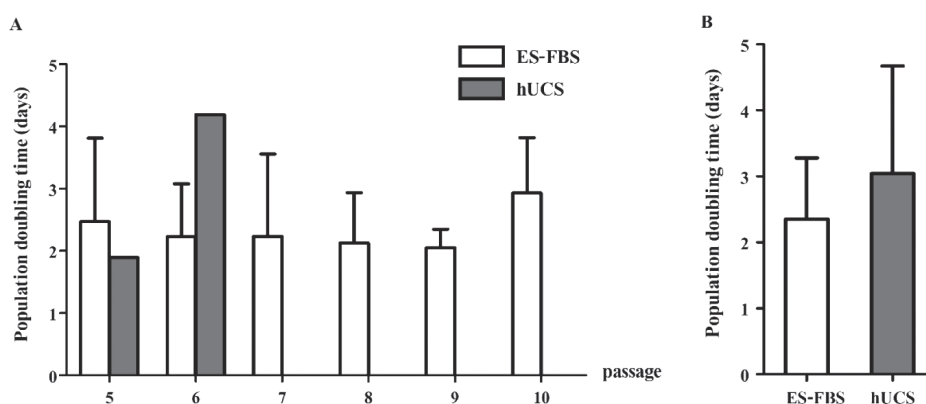
การตรวจสอบร้อยละการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตของเซลล์ภายหลังจากการแช่แข็ง

ภายหลังจากการแช่แข็งเก็บเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือในน้ำยาที่มีซีรัมจากลูกวัว ($n=2$) และซีรัมจากเลือดสายสะดือ ($n=2$) เป็นเวลา 2 เดือน เมื่อครบเวลาแล้วจึงนำมาละลาย และนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี trypan blue เพื่อคำนวณร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีซีรัมจากลูกวัวและซีรัมจากเลือดสายสะดือ ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่าเซลล์ต้นกำเนิดที่แช่แข็งในซีรัมจากลูกวัวมีการรอดชีวิตอยู่ที่ร้อยละ 95.4 ± 2 ส่วนเซลล์ที่แช่แข็งในซีรัมจากเลือดสายสะดือมีการรอดชีวิตอยู่ที่ร้อยละ 94.5 ± 0.6 ภายหลังจากการนำเซลล์ต้นกำเนิดลงเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงแต่ละชนิด พบว่าเซลล์ยังคงลักษณะไฟโบรบลาสต์ ดังแสดงในภาพที่ 3 เมื่อเทียบกับเซลล์ก่อนการเก็บแช่แข็ง



ภาพที่ 3 ลักษณะรูปร่างของเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือภายหลังจากการเก็บแบบแช่แข็ง และเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีซีรัมจากลูกวัว (ES-FBS) (A) และซีรัมจากเลือดสายสะดือ (hUCS) (B) ที่ passage 5 (ภาพกำลังขยาย 100 เท่า)

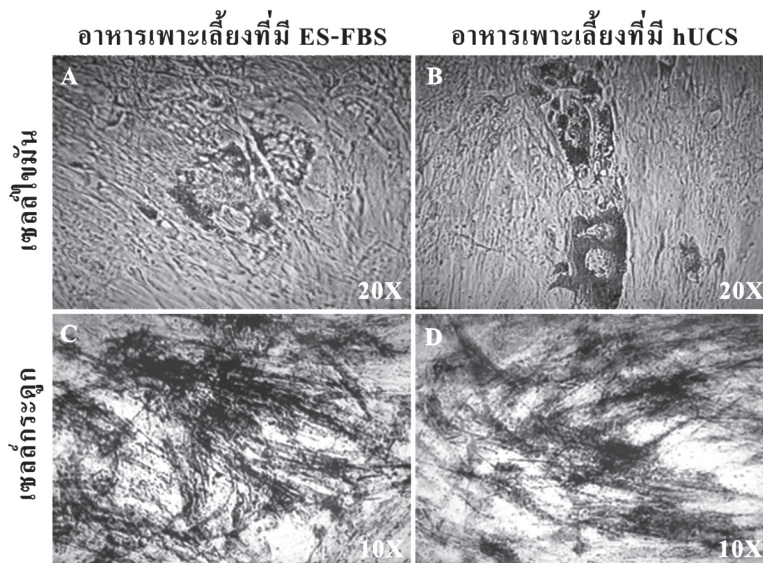
สำหรับการตรวจสอบความสามารถในการเพิ่มจำนวนเซลล์ พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากลูกวัวสามารถเพาะเลี้ยงได้ถึง passage 10 แต่เซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากเลือดสายสะดือเพียง 1 สายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ถึงแค่ passage 7 และเซลล์จะเข้าสู่สภาวะ senescence ส่วนอีก 1 สายพันธุ์ เซลล์เข้าสู่ senescence ตั้งแต่ passage 5 จึงจำเป็นต้องคัดสายพันธุ์นี้ออกจากการทดสอบ ซึ่งเมื่อคำนวณค่าเฉลี่ยของ PDT ในทุก passage (passage 5-10) ของเซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากลูกวัวมีค่าเท่ากับ 2.34 ± 0.79 วัน (อยู่ระหว่าง 1.30-3.56 วัน, $n=2$) ในขณะที่เซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากเลือดสายสะดือที่ passage 5-6 มีค่าเฉลี่ยของ PDT เท่ากับ 3.04 ± 1.68 วัน (อยู่ระหว่าง 1.89-4.19 วัน, $n=1$) ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ผลของระยะเวลาการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (PDT) ของเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากลูกวัว (ES-FBS, $n = 2$) และซีรัมจากเลือดสายสะดือ (hUCS, $n=1$) โดยแสดงค่าเป็น mean $\pm$ SD ของแต่ละ passage (A) และของ passage 5-6 (B)

การตรวจสอบความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ร่างกาย (differentiation)

ผลการศึกษา พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากลูกวัวและซีรัมจากเลือดสายสะดือสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ไขมันและเซลล์กระดูกได้ โดยการตรวจสอบด้วยการย้อม Oil Red O และ alkaline phosphatase ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 5 พบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารทั้ง 2 ชนิด สามารถสร้างเม็ดไขมันได้ โดยพบการติดสีแดงของ Oil Red O บนเม็ดไขมันที่อยู่ภายในเซลล์ ดังแสดงในภาพที่ 5A และ 5B และสามารถเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูกได้ โดยพบการติดสีน้ำตาลดำของ alkaline phosphatase ดังแสดงในภาพที่ 5C และ 5D



ภาพที่ 5 ผลของเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีซีรัมจากลูกวัว (ES-FBS) และในอาหารที่มีซีรัมจากเลือดสายสะดือ (hUCS) การเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ไขมัน พบการติดสี Oil Red O ในเซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงทั้ง 2 ชนิด (A, B) (ภาพกำลังขยาย 200 เท่า) และการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูก พบการติดสีของ alkaline phosphatase ในเซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงทั้ง 2 ชนิด (C, D) (ภาพกำลังขยาย 100 เท่า)

วิจารณ์

การศึกษานี้ ได้ทำการแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือทั้งหมด 49 ตัวอย่าง โดยนำแต่ละตัวอย่างมาแบ่งเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้ซีรัมต่างชนิดกัน 2 ชนิด คือ ซีรัมจากลูกวัว (ES-FBS) และซีรัมจากเลือดสายสะดือ (hUCS) ทำการเปรียบเทียบลักษณะการเกาะพื้นผิวภาชนะเพาะเลี้ยง ลักษณะรูปร่างของเซลล์ อัตราความสำเร็จในการสร้างเป็นสายพันธุ์ อัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ และการแสดงออกถึงคุณสมบัติจำเพาะของเซลล์ต้นกำเนิด โดยตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนจำเพาะชนิดต่าง ๆ ของเซลล์ต้นกำเนิด และความสามารถในการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ร่างกาย

ผลการศึกษา พบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือต้องขยายการศึกษาถึง 49 ตัวอย่าง เนื่องจากใน 10 ตัวอย่างแรก เมื่อใช้ซีรัมทั้ง 2 ชนิด ไม่สามารถแยกเก็บเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอย่างได้เลย แม้เซลล์ที่แยกได้จะสามารถลงเกาะพื้นผิวและเพาะเลี้ยงได้ แต่เพาะเลี้ยงต่อได้ไม่นานกว่า 15 วัน ใน passage 0 และไม่สามารถทำการ subculture เพื่อเลี้ยงต่อใน passage ที่ 1 ซึ่งคล้ายคลึงกับผลการทดลองที่มีรายงานไว้โดย Musina และคณะ⁽²⁴⁾ ที่พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์จากเลือดสายสะดือเพาะเลี้ยงได้ยากและมีโอกาสเพิ่มจำนวนได้ยาก แต่เนื่องจาก

มีรายงานผลงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Shetty และคณะ⁽²⁵⁾ ที่แสดงให้เห็นว่าเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ในเลือดสายสะดือสามารถเพาะเลี้ยงได้ด้วยซีรัมจากเลือดสายสะดือและสามารถเพาะเลี้ยงได้ถึง passage ที่ 3 คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการทดลองต่อโดยเพิ่มจำนวนตัวอย่างขึ้นจนถึง 49 ตัวอย่าง ซึ่งทำให้ประสบความสำเร็จในการแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือและแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้จนถึง passage 2 จำนวน 10 ตัวอย่าง

สำหรับการศึกษาลักษณะการเกาะพื้นผิวภาชนะและรูปร่างของเซลล์ต้นกำเนิด พบว่าหลังการปล่อยให้เซลล์เกาะบนพื้นภาชนะภายใน 3 วัน ใน passage 0 เซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีซีรัมแต่ละชนิดนี้ให้ผลลักษณะการเกาะบนพื้นภาชนะและการกระจายตัวของเซลล์ต่างกัน โดยเซลล์ต้นกำเนิดที่เลี้ยงในซีรัมจากลูกวัวอยู่กันเป็นกลุ่มคล้ายโคโลนีเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (colony-forming unit fibroblast) ข้อสันนิษฐานนี้สอดคล้องกับหลายการศึกษาที่ผ่านมา^(12, 24) ซึ่งรายงานการพบโคโลนีของเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากลูกวัวว่าสามารถตรวจพบได้ตั้งแต่วันที่ 4-19 ของการเพาะเลี้ยง ในขณะที่เซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีซีรัมจากเลือดสายสะดือมีการเกาะพื้นภาชนะในแบบกระจายตัวทั่วภาชนะเพาะเลี้ยง โดยไม่พบการสร้างเป็นโคโลนี แต่มีความหนาแน่นของเซลล์มากกว่าเซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากลูกวัว ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Shetty และคณะ⁽²⁵⁾ ที่ได้รายงานว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือไม่มีการสร้างโคโลนี แต่หากนับถึงปริมาณของเซลล์ต้นกำเนิดเมื่อเทียบกับการใช้ซีรัมจากลูกวัวแล้วพบว่าจำนวนเซลล์ที่ได้ไม่ต่างกัน ซึ่งผลดังกล่าวก็เป็นไปในแนวเดียวกับในการศึกษานี้ นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังสันนิษฐานเพิ่มเติมในเรื่องของการ migration ว่าในซีรัมจากเลือดสายสะดือที่นอกจากมี growth factor จำนวนมากที่ช่วยในการแบ่งตัวของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์แล้ว ยังมี cytokine ที่เหมาะสมกับการกระตุ้นการ migration หรือการเคลื่อนที่ของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ด้วย ซึ่งอาจทำให้เซลล์กระจายตัวได้ดีกว่าเซลล์ต้นกำเนิดที่เลี้ยงในซีรัมจากลูกวัว^(26, 27) อย่างไรก็ตามประเด็นข้อสันนิษฐานนี้ควรได้รับการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป ส่วนลักษณะรูปร่างของเซลล์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงในซีรัมจากลูกวัวและในซีรัมจากเลือดสายสะดือพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน โดยรูปร่างลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดเป็นแบบเซลล์ไฟโบรบลาสต์ขนาดเล็กและสามารถเพิ่มจำนวนได้ แต่ไม่ติดกัน นอกจากนี้พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีซีรัมแต่ละชนิดให้ผลใกล้เคียงกัน ในความสำเร็จของการคัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือพบว่าที่ passage 2 เซลล์ที่เพาะเลี้ยงทั้งในอาหารที่มีซีรัมจากลูกวัวและในซีรัมจากเลือดสายสะดือสามารถสร้างได้ 6 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 49 ตัวอย่าง คิดเป็นอัตราความสำเร็จร้อยละ 12.24 ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Musina และคณะ⁽²⁴⁾ ที่รายงานว่า การคัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือทำได้ยาก นอกจากนี้ยังมีรายงานที่ได้แสดงถึงปริมาณของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ต่อปริมาณเซลล์ของ mononuclear cells ที่แยกได้จากเลือดสายสะดือเป็น 0.05-2.8 cells ต่อ 10^6 เท่านั้น^(28, 29, 30) จึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้การสร้างสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือทำได้ยาก มีรายงานของ Yang และคณะ (2004), Shetty และคณะ (2010) และ Sibov และคณะ (2012)^(31, 32, 33) ว่าการสร้างสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือมีอัตราความสำเร็จเพียงร้อยละ 6 ถึงร้อยละ 20 และพบว่ามี 3 ปัจจัยที่ส่งผลต่อความสำเร็จในการแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือ 1) เลือดสายสะดือจากอายุครรภ์มารดาไม่ควรเกิน 37 สัปดาห์ 2) เลือดสายสะดือที่เก็บได้ต้องมีปริมาณมากกว่า 80 มิลลิลิตร และ 3) ระยะเวลาที่เก็บถึงกระบวนการแยกต้องไม่เกิน 6 ชั่วโมง⁽³³⁾ นอกจากนี้ปัจจัยที่ได้กล่าวมาแล้วยังมีอีกหนึ่งปัจจัยที่อาจส่งผลต่อความสำเร็จในการแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือ คือ ปริมาณของ mononuclear cells ที่แยกได้ควรมีมากกว่า 1.28×10^5 cells ซึ่งพบความสำเร็จมากกว่าร้อยละ 70⁽³⁴⁾

อย่างไรก็ตาม พบว่าการเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีซีรัมต่างกันนี้มีความแตกต่างกัน โดยพบว่าอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือในอาหารที่ใช้ซีรัมจากลูกวัวนั้น สามารถแบ่งตัวได้ดีกว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือในอาหารที่มีซีรัมจากเลือดสายสะดือ โดยพบว่าค่าเฉลี่ยของอัตราการแบ่งตัวแตกต่างกันถึง 2.38 วัน จากผลการทดลองที่แสดงความแตกต่างกันนี้

สันนิษฐานว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือ แม้จะมีคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์อยู่จริง แต่มีความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดค่อนข้างต่ำ ดังเห็นได้จากความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนที่ไม่ดีนัก ทำให้จำเป็นต้องมีการใช้สารกระตุ้นการเจริญเติบโต⁽³⁵⁾ ดังนั้นการใช้เซลล์จากลูกวัวซึ่งมีที่มาจากซีรัมตัวอ่อนอายุ 3 เดือน ในครรภ์แม่วัว⁽³⁶⁾ ซึ่งเป็นระยะที่มีโปรตีนกระตุ้นการเจริญเติบโตที่สูงเต็มที่⁽³⁷⁾ ในขณะที่ซีรัมจากเลือดสายสะดือที่ทำการเก็บในโครงการวิจัยนี้ถือเป็นซีรัมจากเด็กแรกเกิดที่อายุครรภ์ของมารดา 37-40 สัปดาห์ หรือ 9-10 เดือน ซึ่งแม้จะอุดมไปด้วยสารกระตุ้นการเจริญเติบโตจำนวนมาก แต่ยังประกอบด้วยโปรตีนยับยั้งการเจริญเติบโตที่ช่วยสมดุลของแม่และเด็กที่ครบกำหนดคลอด⁽³⁷⁾ อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือเจริญได้ดีกว่าเมื่อมีซีรัมจากลูกวัว

ในด้านคุณสมบัติเฉพาะของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ โดยพิจารณาจากการแสดงออกของโปรตีนจำเพาะและการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ร่างกาย ผลการศึกษา แสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในซีรัมทั้ง 2 ชนิด สามารถแสดงคุณสมบัติเฉพาะของเซลล์ต้นกำเนิดได้ไม่แตกต่างกัน โดยพบว่ามี การแสดงออกของโปรตีนจำเพาะของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ CD29, CD73, CD90 และ CD105 และไม่แสดงโปรตีนจำเพาะของเซลล์เม็ดเลือด CD34 และ CD45 และการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ร่างกาย พบว่าเซลล์จากทั้ง 2 กลุ่มสามารถแสดงคุณสมบัติดังกล่าวได้เช่นเดียวกัน

สรุป

จากการเพาะเลี้ยงและสร้างสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสายสะดือในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีซีรัมจากลูกวัว และซีรัมจากเลือดสายสะดือเป็นส่วนประกอบ สรุปได้ว่า เซลล์ต้นกำเนิดจากอาหารเพาะเลี้ยงทั้ง 2 ชนิด มีคุณสมบัติเฉพาะของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ไม่ต่างกัน และมีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ร่างกายได้ไม่แตกต่างกัน ซีรัมเลือดสายสะดือมนุษย์จึงสามารถใช้แทนซีรัมจากลูกวัวสำหรับสร้างและเพาะเลี้ยงสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากเลือดสายสะดือได้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

เอกสารอ้างอิง

1. Yao P, Zhou L, Zhu L, Zhou B, Yu Q. Mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for neurodegenerative diseases. *Eur Neurol* 2020; 83: 235-41.
2. Nishida F, Zappa Villar MF, Zanuzzi CN, Sisti MS, Camiña AE, Reggiani PC, et al. Intracerebroventricular delivery of human umbilical cord mesenchymal stem cells as a promising therapy for repairing the spinal cord injury induced by Kainic acid. *Stem Cell Rev Rep* 2020; 16(1): 167-80.
3. Jin MC, Medress ZA, Azad TD, Doullames VM, Veeravagu A. Stem cell therapies for acute spinal cord injury in humans: a review. *Neurosurg Focus* 2019; 46(3): E10. (11 pages).
4. Zang L, Hao H, Liu J, Li Y, Han W, Mu Y. Mesenchymal stem cell therapy in type 2 diabetes mellitus. *Diabetol Metab Syndr* 2017; 9: 36. (11 pages).
5. Hu J, Wang Y, Gong H, Yu C, Guo C, Wang F, et al. Long term effect and safety of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on type 2 diabetes. *Exp Ther Med* 2016; 12(3): 1857-66.

6. Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989; 321(17): 1174-8.
7. Broxmeyer HE. Insights into the biology of cord blood stem/progenitor cells. *Cell Prolif* 2011; 44(Suppl 1): 55-9.
8. Broxmeyer HE. Cord blood hematopoietic stem cell transplantation. In: *StemBook*. [online]. 2010; [cited 2020 Nov 9]: [13 screens]. Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK44751/>
9. Phuc PV, Ngoc VB, Lam DH, Tam NT, Viet PQ, Ngoc PK. Isolation of three important types of stem cells from the same samples of banked umbilical cord blood. *Cell Tissue Bank* 2012; 13(2): 341-51.
10. Vu N, Bui A, Trinh V, Phi L, Phan N, Pham P. A comparison of umbilical cord blood-derived endothelial progenitor cell transplantation and mononuclear cell transplantation for the treatment of acute hindlimb ischemia in a murine model. *Biomed Res Ther* 2014; 1(1): 9-20.
11. Kim SW, Jin HL, Kang SM, Kim S, Yoo KJ, Jang Y, et al. Therapeutic effects of late outgrowth endothelial progenitor cells or mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood on infarct repair. *Int J Cardiol* 2016; 203: 498-507.
12. Zhang X, Hirai M, Cantero S, Ciubotariu R, Dobrila L, Hirsh A, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood: reevaluation of critical factors for successful isolation and high ability to proliferate and differentiate to chondrocytes as compared to mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem* 2011; 112(4): 1206-18.
13. Dalle JH, Duval M, Moghrabi A, Wagner E, Vachon MF, Barrette S, et al. Results of an unrelated transplant search strategy using partially HLA-mismatched cord blood as an immediate alternative to HLA-matched bone marrow. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33(6): 605-11.
14. Shim JS, Cho B, Kim M, Park GS, Shin JC, Hwang HK, et al. Early apoptosis in CD34+ cells as a potential heterogeneity in quality of cryopreserved umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2006; 135(2): 210-3.
15. Fujii S, Miura Y, Iwasa M, Yoshioka S, Fujishiro A, Sugino N, et al. Isolation of mesenchymal stromal/stem cells from cryopreserved umbilical cord blood cells. *J Clin Exp Hematop* 2017; 57(1): 1-8.
16. Ben Azouna N, Jenhani F, Regaya Z, Berraeis L, Ben Othman T, Ducrocq E, et al. Phenotypical and functional characteristics of mesenchymal stem cells from bone marrow: comparison of culture using different media supplemented with human platelet lysate or fetal bovine serum. *Stem Cell Res Ther* 2012; 3(1): 6. (14 pages).
17. Julavijitphong S, Wichitwiengrat S, Tirawanchai N, Ruangvutilert P, Vantanasiri C, Phermthai T. A xeno-free culture method that enhances Wharton's jelly mesenchymal stromal cell culture efficiency over traditional animal serum-supplemented cultures. *Cytotherapy* 2013; 16(5): 683-91.

18. Phermthai T, Tungprasertpol K, Julavijitphong S, Pokathikorn P, Thongbopit S, Wichitwiengrat S. Successful derivation of xeno-free mesenchymal stem cell lines from endometrium of infertile women. *Reprod Biol* 2016; 16(4): 261-8.
19. Selvaggi TA, Walker RE, Fleisher TA. Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virus-infected patients given syngeneic lymphocyte infusions. *Blood* 1997; 89(3): 776-9.
20. Tuschong L, Soenen SL, Blaese RM, Candotti F, Muul LM. Immune response to fetal calf serum by two adenosine deaminase-deficient patients after T cell gene therapy. *Hum Gene Ther* 2002; 13(13): 1605-10.
21. Ma HY, Yao L, Yu YQ, Li L, Ma L, Wei WJ, et al. An effective and safe supplement for stem cells expansion ex vivo: cord blood serum. *Cell Transplant* 2012; 21(5): 857-69.
22. Phermthai T, Odglun Y, Chuenwattana P, Julavijitphong S, Titapant V, Vantanasiri C. Successful derivation and characteristics of xeno-free mesenchymal stem cell lines from human amniotic fluid generated under allogenic cord blood serum supplementation. *Tissue Eng Regen Med* 2011; 8: 216-23.
23. Phermthai T, Thongbopit S, Pokathikorn P, Wichitwiengrat S, Julavijitphong S, Tirawanchai N. Carcinogenicity, efficiency and biosafety analysis in xeno-free human amniotic stem cells for regenerative medical therapies. *Cytotherapy* 2017; 19(8): 990-1001.
24. Musina RA, Bekchanova ES, Belyavskii AV, Grinenko TS, Sukhikh GT. Umbilical cord blood mesenchymal stem cells. *Bull Exp Biol Med* 2007; 143(1): 127-31.
25. Shetty P, Bharucha K, Tanavde V. Human umbilical cord blood serum can replace fetal bovine serum in the culture of mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int* 2007; 31(3): 293-8.
26. Huang L, Critser PJ, Grimes BR, Yoder MC. Human umbilical cord blood plasma can replace fetal bovine serum for in vitro expansion of functional human endothelial colony-forming cells. *Cytotherapy* 2011; 13(6): 712-21.
27. Romanov YA, Vtorushina VV, Dugina TN, Romanov AY, Petrova NV. Human umbilical cord blood serum/plasma: cytokine profile and prospective application in regenerative medicine. *Bull Exp Biol Med* 2019; 168(1): 173-7.
28. Goodwin HS, Bicknese AR, Chien SN, Bogucki BD, Quinn CO, Wall DA. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001; 7(11): 581-8.
29. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 2001; 98(8): 2396-402.
30. Hunt CJ. Cryopreservation of human stem cells for clinical application: a review. *Transfus Med Hemother* 2011; 38(2): 107-23.
31. Yang SE, Ha CW, Jung M, Jin HJ, Lee M, Song H, et al. Mesenchymal stem/progenitor cells developed in cultures from UC blood. *Cytotherapy* 2004; 6(5): 476-86.

32. Shetty P, Cooper K, Viswanathan C. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potentials of cord matrix, cord blood, and bone marrow mesenchymal stem cells. *Asian J Transfus Sci* 2010; 4(1): 14-24.
 33. Sibov TT, Severino P, Marti LC, Pavon LF, Oliveira DM, Tobo PR, et al. Mesenchymal stem cells from umbilical cord blood: parameters for isolation, characterization and adipogenic differentiation. *Cytotechnology* 2012; 64(5): 511-21.
 34. Yoshioka S, Miura Y, Iwasa M, Fujishiro A, Yao H, Miura M, et al. Isolation of mesenchymal stromal/stem cells from small-volume umbilical cord blood units that do not qualify for the banking system. *Int J Hematol* 2015; 102(2): 218-29.
 35. Fan X, Liu T, Liu Y, Ma X, Cui Z. Optimization of primary culture condition for mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood with factorial design. *Biotechnol Prog* 2009; 25(2): 499-507.
 36. Jochems CE, van der Valk JB, Stafleu FR, Baumans V. The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? *Altern Lab Anim* 2002; 30(2): 219-27.
 37. Zheng X, Baker H, Hancock WS, Fawaz F, McCaman M, Pungor E, Jr. Proteomic analysis for the assessment of different lots of fetal bovine serum as a raw material for cell culture. Part IV. Application of proteomics to the manufacture of biological drugs. *Biotechnol Prog* 2006; 22(5): 1294-300.
-

Expansion of Cord Blood Mesenchymal Stem Cell Using Culture Medium Supplemented with Umbilical Cord Serum

Suparat Wichitwiengrat¹ Sasiprapa Thongbopit¹ Suphakde Julavijitphong¹

Piengchia Vichaidith² Pussara Hakularb² and Tatsanee Phermthai¹

¹*Stem Cell Research and Development Unit, Department of Obstetrics & Gynecology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Wanglang Road, Siriraj, Bangkoknoi, Bangkok 10700*

²*Obstetric and Gynecological Nursing Division, Department of Obstetrics & Gynecology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Wanglang Road, Siriraj, Bangkoknoi, Bangkok 10700, Thailand*

ABSTRACT Nowadays, the cultivation of cord blood mesenchymal stem cells (CBSC) can only propagated in a medium supplemented with embryonic stem cell grade fetal bovine serum (ES-FBS). By using a commercial human serum, the CBSC had been limited in cell propagation. Our previous study had showed a successful establishment of animal free-amniotic fluid stem cell (AFS), using human umbilical cord blood serum (hUCS). The current work is based on the idea of using hUCS for CBSC culture as a replacement of ES-FBS. With 49 cord blood samples for MSC isolation, every samples were cultured under the medium supplemented with hUCS comparable to supplementation with ES-FBS. The result demonstrated that CBSC lines generated under hUCS-medium showed similar morphology and specific MSC characteristics to the lines as from ES-FBS-medium. Both cell lines expressed CD29, CD73, CD90 and CD105 without expression of CD34 and CD45. Moreover, they can be differentiated into adipocyte and osteoblast. Nevertheless, the proliferation rate of CBSC derived in ES-FBS-medium was higher than the lines generated in hUCS-medium. The author concluded that hUCS can be used to replace ES-FBS in the medium for derivation and culture of CBSC lines.

Keywords: Cord blood mesenchymal stem cells, Embryonic stem cell grade fetal bovine serum, Human umbilical cord blood serum

พื้นที่เสี่ยงโรคไข้เลือดออก: วิเคราะห์ผลการสำรวจ กับดักไข่ยุงลายและข้อมูลผู้ป่วยโรคไข้เลือดออก ของประเทศไทยด้วยระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์

จิตติ จันทรแสง¹ จริยา คุรุบุตร¹ อัญญลักษณ์ มากกรีน¹ วรรณิศา สืบสอาด¹ เอกรัฐ เด่นชลชัย¹ สุวรรณภา นิลพนมชัย²
และอรรุญญากร จันทรแสง¹

¹สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ ถนนพหลโยธิน นนทบุรี 11000

²คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา 999 ถนนพุทธมณฑลสาย 4 นครปฐม 73170

บทคัดย่อ โรคไข้เลือดออกยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุข โดยมีการควบคุมยุงลายเป็นมาตรการที่สำคัญ ข้อมูลประชากรและการแพร่กระจายของยุงลายเป็นข้อมูลสำคัญสำหรับควบคุมโรค มีการใช้วิธีการสำรวจลูกน้ำยุงลายจากการนับจำนวนภาชนะซึ่งน้ำที่พบหรือไม่พบลูกน้ำแล้วคำนวณค่าดัชนีลูกน้ำยุงลายเพื่อวางแผนควบคุมโรค แต่เนื่องด้วยค่าดัชนีลูกน้ำยุงลายมีความสัมพันธ์ต่ำกับโรคไข้เลือดออก ในขณะที่ระยะไข่มีความสัมพันธ์กับระยะตัวเต็มวัยซึ่งเป็นระยะในการแพร่เชื้อไวรัส งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาข้อมูลประชากรยุงลายด้วยกับดักไข่ยุงลายระหว่างช่วงเดือนก่อนฤดูการระบาดของโรค เก็บข้อมูลเป็นเวลา 7 ปีในแต่ละปีสำรวจโดยใช้กับดักไข่ยุงลายจำนวน 5,120 อัน วางในพื้นที่ 128 อำเภอ ของ 32 จังหวัด ใน 4 ภาค และนำข้อมูลผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกของแต่ละจังหวัดมาวิเคราะห์ด้วยระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์และสถิติ พบว่าประชากรของยุงลายจากค่าเฉลี่ยไข่ต่อกับดักไข่ยุงลาย และร้อยละกับดักที่พบไข่ยุงลายมีค่าสูงสุดที่ภาคใต้ และรองลงมาคือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือ ตามลำดับ และมีความแตกต่างกันตามแต่ละจังหวัด ประชากรยุงลายและผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการประมาณค่าเชิงพื้นที่ประชากรยุงลายของทั้งประเทศด้วยระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์วิธี Ordinary Kriging โดยใช้ข้อมูลทุกตำแหน่งที่สำรวจ ทำให้สามารถประมาณค่าประชากรยุงลายทุกพื้นที่ในทุกจังหวัดของประเทศ จากผลการวิจัยที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการหาพื้นที่เสี่ยงและวางแผนการควบคุมโรคไข้เลือดออกได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: โรคไข้เลือดออก, ยุงลาย, ประชากร, กับดักไข่ยุงลาย, ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์

Corresponding author E-mail: chitti.c@dmsc.mail.go.th

Received: 5 February 2021

Revised: 18 February 2021

Accepted: 11 March 2021

บทนำ

โรคไข้เลือดออกยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขของประเทศไทยและประเทศในแถบเอเชียอาคเนย์ และกลุ่มประเทศแปซิฟิกตะวันตก คิดเป็น 75% ของจำนวนผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกทั่วโลก⁽¹⁾ ประเทศไทยพบการระบาดของโรคไข้เลือดออกครั้งแรกตั้งแต่ปี 2501 มีจำนวนผู้ป่วย 2,158 ราย และสำหรับปี 2560-2563 มีรายงานผู้ป่วยจำนวน 31,843, 55,076, 87,866 และ 50,042 ราย ตามลำดับ สำหรับผลกระทบทางด้านเศรษฐกิจ มีรายงานการระบาดของโรคไข้เลือดออกของประเทศไทยปี 2552 ส่งผลกระทบก่อให้เกิดความเสียหายต่อภาคเศรษฐกิจประมาณ 6,190 ล้านบาท⁽²⁾ โรคไข้เลือดออกมีแนวโน้มจะเป็นปัญหาโดยมีการระบาดและมีจำนวนผู้ป่วยจำนวนมาก การระบาดของโรคไข้เลือดออกมีความแตกต่างกันในแต่ละภาค⁽³⁾ ถึงแม้ในปัจจุบันจะมีวัคซีนในการป้องกันโรคไข้เลือดออกแต่วัคซีนก็ยังมีปัญหาด้านความปลอดภัยและประสิทธิภาพ รวมถึงมีราคาที่สูง การดำเนินงานควบคุมป้องกันโรคไข้เลือดออกจำเป็นต้องจัดตั้งสายพหุของโรค การทราบข้อมูลประชากรและการแพร่กระจายของยุงลายเป็นข้อมูลสำคัญสำหรับควบคุมวิธีการสำรวจลูกน้ำยุงลายที่ใช้ในปัจจุบัน เป็นการสำรวจที่ออกแบบมาสำหรับการควบคุมกำจัดแหล่งเพาะพันธุ์ โดยการสำรวจวิธีนี้ต้องอาศัยคณะผู้สำรวจที่มีความซื่อสัตย์ มีความรู้เกี่ยวกับแหล่งเพาะพันธุ์ของยุงลาย และมีความละเอียดรอบคอบที่ต้องเข้าไปสำรวจในแต่ละบ้าน เพื่อค้นหาภาชนะที่พบและไม่พบลูกน้ำยุงลายแล้วบันทึกในแบบสำรวจ จากนั้นคำนวณค่าดัชนีลูกน้ำยุงลาย⁽⁴⁾ การสำรวจวิธีนี้ไม่นำจำนวนลูกน้ำและตัวมดที่แตกต่างกันในแต่ละชนิดภาชนะมาวิเคราะห์ ดังนั้นค่าดัชนีลูกน้ำยุงลายนี้จึงมีความสัมพันธ์ต่ำกับโรคไข้เลือดออก⁽⁵⁾ มีรายงานการใช้กับดักไข่ยุงลายสำหรับการสำรวจ ระยะไข่มีความสัมพันธ์กับระยะตัวเต็มวัยของยุงลายซึ่งเป็นระยะในการแพร่เชื้อไวรัส ดังนั้นข้อมูลจากกับดักไข่ยุงลายจึงมีความสัมพันธ์กับโรคไข้เลือดออกมากกว่าค่าดัชนีลูกน้ำยุงลาย ประกอบกับวิธีการสำรวจด้วยกับดักไข่ยุงลายไม่ต้องใช้กำลังคนจำนวนมาก และสามารถตรวจสอบผลการปฏิบัติงานได้โดยสะดวกจากการนับจำนวนไข่ที่พบ มีการนำกับดักไข่ยุงลายมาใช้ในการหาข้อมูลประชากรและการแพร่กระจายของยุงลายสำหรับการควบคุมในหลายประเทศ เช่น ประเทศมาเลเซีย⁽⁶⁾ และประเทศบราซิล⁽⁷⁾ ปัจจุบันมีความก้าวหน้าทางด้านเทคโนโลยีระบบภูมิสารสนเทศ (Geographic Information System, GIS) ที่เป็นระบบคอมพิวเตอร์ที่สามารถจัดเก็บ รวบรวม วิเคราะห์และแสดงผลข้อมูลเชิงพื้นที่ และได้มีการนำมาประยุกต์ใช้กับการวิจัยด้านการสำรวจประชากรของยุงลายในประเทศ^(8,9) งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาหาระดับประชากรยุงลายจากกับดักไข่ยุงลายของภาคและประเทศ หาค่าความสัมพันธ์ระหว่างประชากรยุงลายและผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกของประเทศไทย และการประมาณค่าเชิงพื้นที่ประชากรยุงลายของประเทศไทยจากข้อมูลทุกตำแหน่งที่สำรวจด้วยระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์และสถิติ เพื่อใช้สำหรับการหาพื้นที่เสี่ยงและวางแผนการควบคุมโรคไข้เลือดออก

วัสดุและวิธีการ

จากข้อมูลโรคไข้เลือดออกที่มีการระบาดทั่วทุกจังหวัดของประเทศไทย⁽³⁾ จึงได้ทำการคัดเลือกจังหวัดให้กระจายตัวครอบคลุมแต่ละภาค โดยคัดเลือกภาคละ 8 จังหวัด ในแต่ละจังหวัดสำรวจ 4 อำเภอ ประกอบด้วยอำเภอเมืองและอำเภอรอบนอก 3 อำเภอ ทำการเก็บค่าตำแหน่งพิกัดที่สำรวจด้วย GPS ใช้กับดักไข่ยุงลายในแต่ละอำเภอ 40 อัน ได้มาจากการคำนวณขนาดตัวอย่างจาก จิตติ และคณะ (2540)⁽¹⁰⁾ ดังนั้นในแต่ละปีสำรวจใช้กับดักไข่ยุงลาย 160 อัน ในแต่ละจังหวัด ใช้ 1,280 อัน ในแต่ละภาค และใช้ 5,120 อัน ของทั้งประเทศ ใช้วิธีสำรวจยุงลายตามวิธีมาตรฐานด้วยกับดักไข่ โดยวาง 1 กับดักไข่ยุงลายต่อ 1 หลังคาเรือน กับดักไข่ยุงลายมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 นิ้ว ใส่กระดาษกรองขนาด 2 × 11 นิ้ว ใส่ไม้ไผ่หนึ่ง วางกับดักไข่ยุงลายให้ยุงลายมาวางไข่วางไว้ 3 วัน แล้วเก็บกับดักไข่ยุงลาย โดยความร่วมมือของอาสาสมัครสาธารณสุขประจำหมู่บ้านในพื้นที่ เจ้าหน้าที่จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข มารับกับดักไข่ยุงลาย และนำกระดาษกรองที่ได้มานับจำนวนไข่ยุงลาย แล้วคำนวณหาค่าเฉลี่ยใช้ต่อกับดักไข่ยุงลาย และ

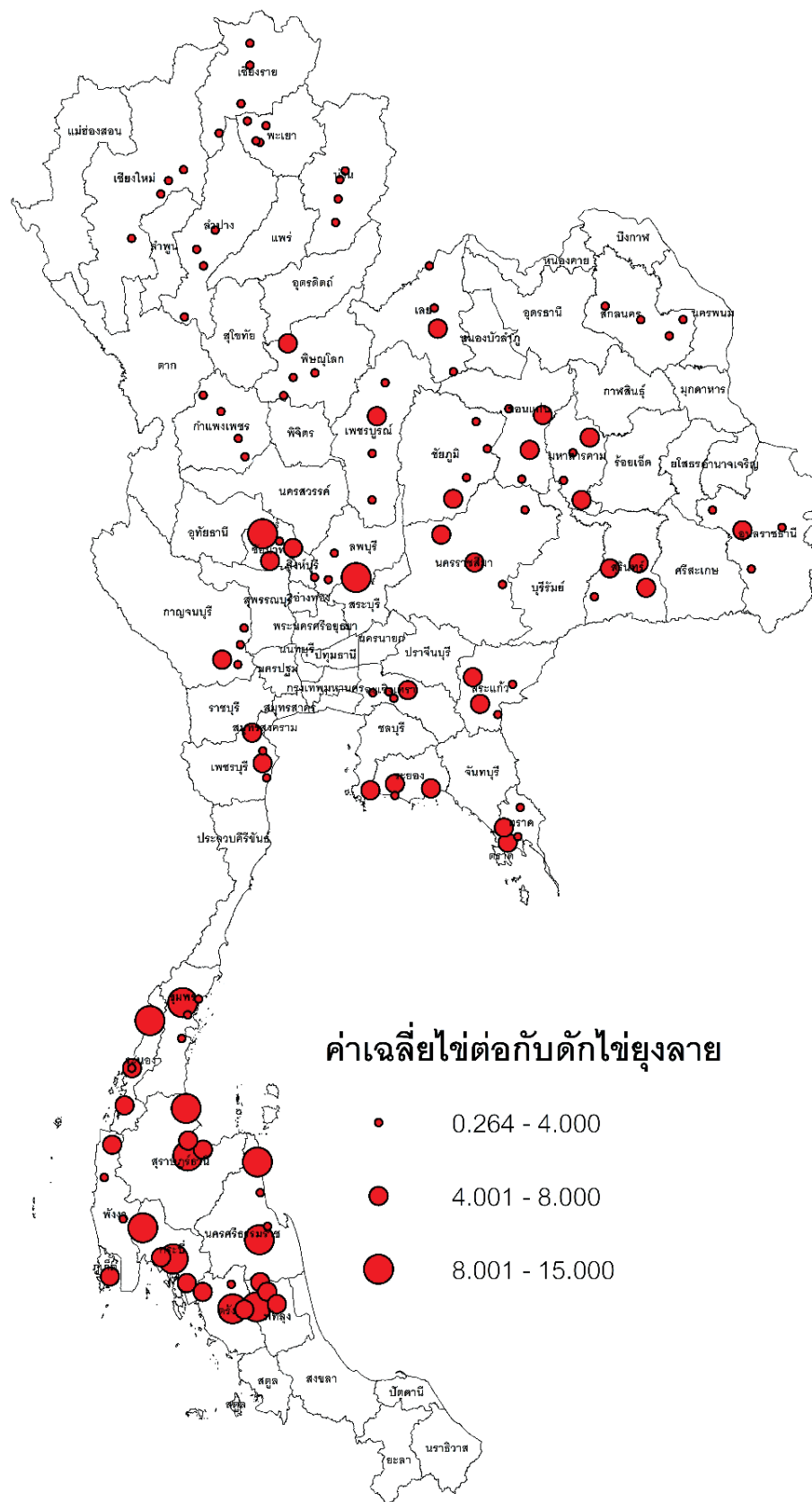
ร้อยละกับดักไข่ที่พบไข่ยุงลาย ดำเนินการสำรวจปีละ 1 ครั้ง ทั้ง 4 ภาค ช่วงเดือนมกราคมถึงพฤษภาคมของปี 2555 ถึง 2560 และ 2562 พร้อมเก็บข้อมูลผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกของแต่ละจังหวัด ของเดือนที่สำรวจ ของเดือนที่สำรวจถัดไป 1 เดือน และตลอดปีจากสำนักระบาดวิทยา⁽¹¹⁾ จากข้อมูลการสำรวจเป็นข้อมูลประเภทการนับ มีความแปรปรวนมากกว่าค่าเฉลี่ย⁽¹²⁾ เพื่อให้เข้ากับเงื่อนไขการทดสอบทางสถิติ จึงทำการแปลงข้อมูลด้วย log ฐาน 10 (n+1) แล้วจึงเปรียบเทียบความแตกต่างของตัวแปรด้วยสถิติ F-test และ Duncan multiple range test การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ประชากรยุงลายกับผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรด้วยสถิติ Spearman correlation test โดยใช้โปรแกรม SPSS⁽¹³⁾ สำหรับค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. ของแต่ละตัวแปรที่นำเสนอคำนวณจากข้อมูลที่ไม่ได้แปลงค่า การวิเคราะห์เชิงพื้นที่ด้วยระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ วิธีการประมาณค่าเชิงพื้นที่ประชากรยุงลายของทั้งประเทศ⁽¹⁴⁾ จากข้อมูลทุกตำแหน่งที่สำรวจจากกับดักไข่ยุงลาย

ผล

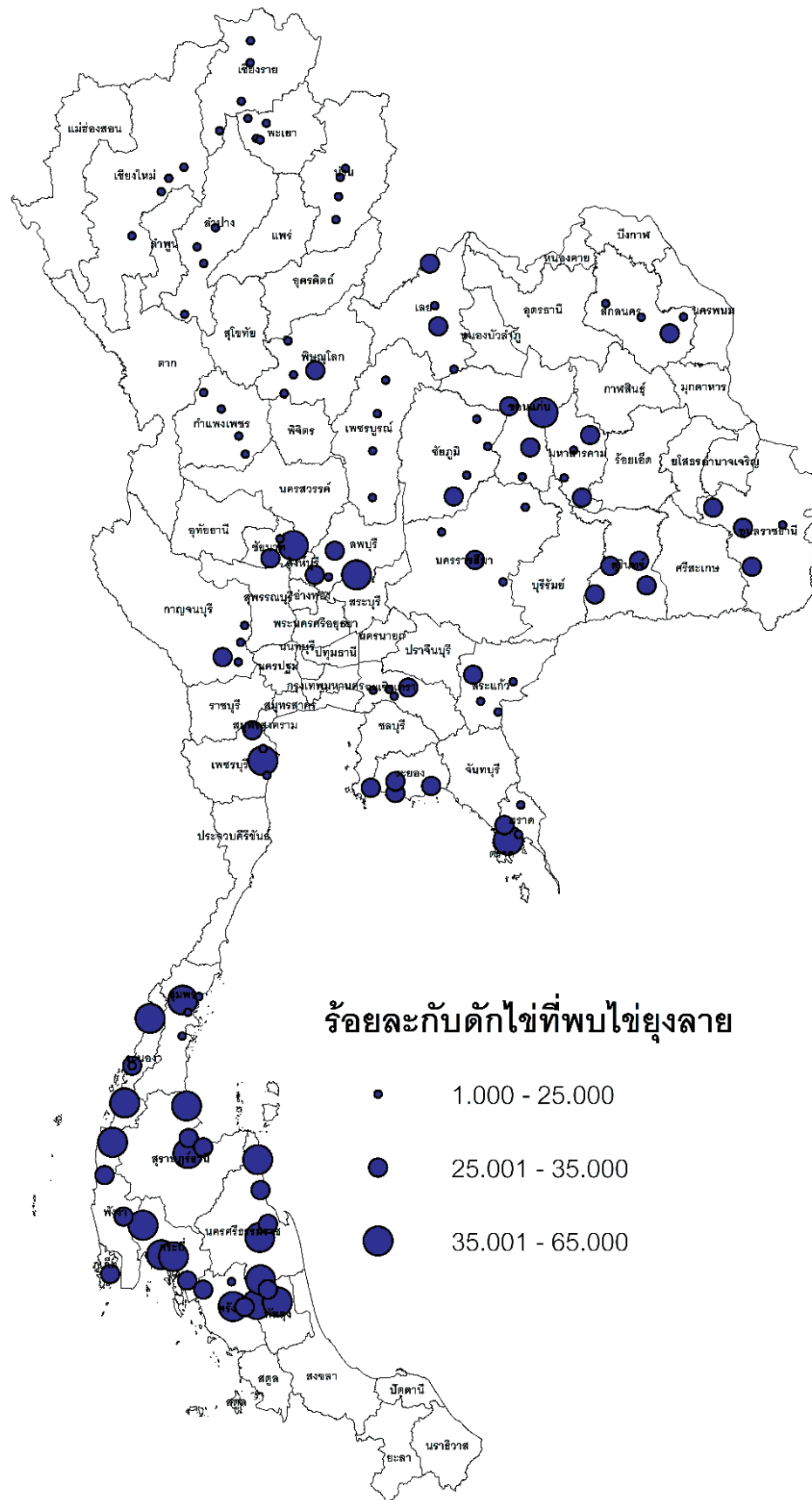
จากการสำรวจประชากรยุงลายด้วยกับดักไข่ยุงลาย ทำการสำรวจ 128 อำเภอ ใน 32 จังหวัด ทั้ง 4 ภาค ของประเทศสำรวจปีละ 1 ครั้ง รวม 7 ครั้งของปี 2555-2560 และ 2562 ประชากรของยุงลายจากค่าเฉลี่ยไข่ต่อกับดักไข่ยุงลาย อยู่ในช่วง 0.264-13.567 ค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. เท่ากับ 4.101 ± 2.670 มีค่าสูงสุดที่ภาคใต้ และรองลงมาคือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือ ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 1 สำหรับค่าร้อยละกับดักไข่ที่พบไข่ยุงลายอยู่ในช่วง 1.667-65.808 ค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. เท่ากับ 24.7451 ± 11.772 มีค่าสูงสุดที่ภาคใต้ และรองลงมาคือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือ ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 2 ที่ภาคกลาง จังหวัดที่สำรวจประชากรยุงลาย คือ สระแก้ว ตราด ระยอง ฉะเชิงเทรา เพชรบุรี กาญจนบุรี และชัยนาท การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยไข่ต่อกับดักไข่ยุงลาย มีค่าอยู่ในช่วง 0.110-12.730 ค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. เท่ากับ 4.532 ± 3.059 มีความแตกต่างทางด้านสถิติตามจังหวัด ($F = 1.370$, F-test และ $p < 0.05$, Duncan-test) การเปรียบเทียบร้อยละกับดักไข่ที่พบไข่ยุงลายมีค่าอยู่ในช่วง 3.160-54.780 ค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. เท่ากับ 27.191 ± 11.347 มีความแตกต่างทางด้านสถิติตามจังหวัด ($F = 1.405$, F-test และ $p < 0.05$, Duncan-test) การเปรียบเทียบผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรในเดือนที่สำรวจ มีค่าอยู่ในช่วง 0.110-76.120 ค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. เท่ากับ 13.069 ± 15.422 ไม่มีความแตกต่างทางด้านสถิติตามจังหวัด ($F = 1.080$, F-test และ $p > 0.05$, Duncan-test) การเปรียบเทียบผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรถัดจากเดือนที่สำรวจ 1 เดือน มีค่าอยู่ในช่วง 0.110-59.430 ค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. เท่ากับ 14.463 ± 15.680 มีความแตกต่างทางด้านสถิติตามจังหวัด ($F = 1.825$, F-test และ $p < 0.05$, Duncan-test) การเปรียบเทียบผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรตลอดปีมีค่าอยู่ในช่วง 8.710-618.740 ค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. เท่ากับ 157.499 ± 145.554 มีความแตกต่างทางด้านสถิติตามจังหวัด ($F = 1.743$, F-test และ $p < 0.05$, Duncan-test) ดังแสดงในตารางที่ 1 ภาคเหนือจังหวัดที่สำรวจประชากรยุงลายคือ กำแพงเพชร ลำปาง เชียงใหม่ เชียงราย พะเยา น่าน พิชณุโลก และเพชรบูรณ์ การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยไข่ต่อกับดักไข่ยุงลาย มีค่าอยู่ในช่วง 0-6.850 ค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. เท่ากับ 1.976 ± 1.392 มีความแตกต่างทางด้านสถิติตามจังหวัด ($F = 5.182$, F-test และ $p < 0.05$, Duncan-test) การเปรียบเทียบร้อยละกับดักไข่ที่พบไข่ยุงลายมีค่าอยู่ในช่วง 0-33.200 ค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. เท่ากับ 12.759 ± 7.327 มีความแตกต่างทางด้านสถิติตามจังหวัด ($F = 4.750$, F-test และ $p < 0.05$, Duncan-test) การเปรียบเทียบผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรในเดือนที่สำรวจมีค่าอยู่ในช่วง 0-78.550 ค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. เท่ากับ 6.376 ± 15.760 ไม่มีความแตกต่างทางด้านสถิติตามจังหวัด ($F = 0.474$, F-test และ $p > 0.05$, Duncan-test) การเปรียบเทียบผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรถัดจากเดือนที่สำรวจ 1 เดือน มีค่าอยู่ในช่วง 0-189.590 ค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. เท่ากับ 14.496 ± 39.307 ไม่มีความแตกต่างทางด้านสถิติตามจังหวัด ($F = 0.241$, F-test และ $p > 0.05$, Duncan-test) การเปรียบเทียบผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรตลอดปีมีค่าอยู่ในช่วง 12.680-897.170 ค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. เท่ากับ 150.789 ± 191.357 มีความแตกต่างทางด้าน

สถิติตามจังหวัด ($F = 2.192$, F -test และ $p > 0.05$, Duncan-test) ดังแสดงในตารางที่ 2 ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จังหวัดที่สำรวจประชากรยุ้งลายคือ นครราชสีมา ชัยภูมิ ขอนแก่น เลย สกลนคร มหาสารคาม อุบลราชธานี และสุรินทร์ การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยไข่ออกกับดักไข่งลายมีค่าอยู่ในช่วง $0.40-9.41$ ค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. เท่ากับ 3.677 ± 2.199 ไม่มีความแตกต่างทางด้านสถิติตามจังหวัด ($F = 0.442$, F -test และ $p > 0.05$, Duncan-test) การเปรียบเทียบร้อยละกับดักไข่ออกกับไข่งลายมีค่าอยู่ในช่วง $3.820-53.130$ ค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. เท่ากับ 25.047 ± 11.884 ไม่มีความแตกต่างทางด้านสถิติตามจังหวัด ($F = 0.276$, F -test และ $p > 0.05$, Duncan-test) การเปรียบเทียบผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรในเดือนที่สำรวจมีค่าอยู่ในช่วง $0.090-29.650$ ค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. เท่ากับ 7.039 ± 7.565 ไม่มีความแตกต่างทางด้านสถิติตามจังหวัด ($F = 0.753$, F -test และ $p > 0.05$, Duncan-test) การเปรียบเทียบผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรถัดจากเดือนที่สำรวจ 1 เดือน มีค่าอยู่ในช่วง $0.220-49.170$ ค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. เท่ากับ 10.334 ± 11.514 ไม่มีความแตกต่างทางด้านสถิติตามจังหวัด ($F = 0.927$, F -test และ $p > 0.05$, Duncan-test) การเปรียบเทียบผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรตลอดปีมีค่าอยู่ในช่วง $6.770-440.700$ ค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. เท่ากับ 122.831 ± 106.872 มีความแตกต่างทางด้านสถิติตามจังหวัด ($F = 2.024$, F -test และ $p > 0.05$, Duncan-test) ดังแสดงในตารางที่ 3 ภาคใต้ จังหวัดที่สำรวจประชากรยุ้งลายคือ ชุมพร ระนอง พังงา กระบี่ ตรัง พัทลุง นครศรีธรรมราช และสุราษฎร์ธานี การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยไข่ออกกับดักไข่งลายมีค่าอยู่ในช่วง $0.660-18.380$ ค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. เท่ากับ 6.168 ± 3.995 ไม่มีความแตกต่างทางด้านสถิติตามจังหวัด ($F = 0.938$, F -test และ $p > 0.05$, Duncan-test) การเปรียบเทียบร้อยละกับดักไข่ออกกับไข่งลายมีค่าอยู่ในช่วง $5.000-66.250$ ค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. เท่ากับ 33.557 ± 14.898 มีความแตกต่างทางด้านสถิติตามจังหวัด ($F = 1.110$, F -test และ $p > 0.05$, Duncan-test) การเปรียบเทียบผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรในเดือนที่สำรวจมีค่าอยู่ในช่วง $1.400-45.630$ ค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. เท่ากับ 13.969 ± 10.673 ไม่มีความแตกต่างทางด้านสถิติตามจังหวัด ($F = 1.433$ F -test และ $p > 0.05$, Duncan-test) การเปรียบเทียบผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรถัดจากเดือนที่สำรวจ 1 เดือน มีค่าอยู่ในช่วง $0-34.070$ ค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. เท่ากับ 11.677 ± 7.655 ไม่มีความแตกต่างทางด้านสถิติตามจังหวัด ($F = 1.488$, F -test และ $p > 0.05$, Duncan-test) การเปรียบเทียบผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรตลอดปีมีค่าอยู่ในช่วง $15.910-463.650$ ค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. เท่ากับ 143.666 ± 102.594 มีความแตกต่างทางด้านสถิติตามจังหวัด ($F = 2.252$, F -test และ $p > 0.05$, Duncan-test) ดังแสดงในตารางที่ 4 จาก 4 ภาคสำรวจทั้งหมด 32 จังหวัด การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยไข่ออกกับดักไข่งลาย มีค่าอยู่ในช่วง $0-18.380$ ค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. เท่ากับ 4.088 ± 3.196 มีความแตกต่างทางด้านสถิติตามภาค ($F = 22.488$, F -test และ $p < 0.05$, Duncan-test) การเปรียบเทียบร้อยละกับดักไข่ออกกับไข่งลายมีค่าอยู่ในช่วง $0-66.250$ ค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. เท่ากับ 24.639 ± 13.844 มีความแตกต่างทางด้านสถิติตามภาค ($F = 30.675$, F -test และ $p < 0.05$, Duncan-test) การเปรียบเทียบผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรในเดือนที่สำรวจมีค่าอยู่ในช่วง $0-78.550$ ค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. เท่ากับ 10.113 ± 13.072 มีความแตกต่างทางด้านสถิติตามภาค ($F = 20.295$ F -test และ $p < 0.05$, Duncan-test) การเปรียบเทียบผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรถัดจากเดือนที่สำรวจ 1 เดือน มีค่าอยู่ในช่วง $0-189.530$ ค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. เท่ากับ 12.742 ± 22.184 มีความแตกต่างทางด้านสถิติตามภาค ($F = 10.864$, F -test และ $p < 0.05$, Duncan-test) การเปรียบเทียบผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรตลอดปีมีค่าอยู่ในช่วง $6.770-897.170$ ค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. เท่ากับ 143.696 ± 140.852 ไม่มีความแตกต่างทางด้านสถิติตามภาค ($F = 1.894$, F -test และ $p > 0.05$, Duncan-test) ดังแสดงในตารางที่ 5

การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ประชากรยุ้งลายกับผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากร พบว่าค่าเฉลี่ยไข่ออกกับดักไข่งลายมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับร้อยละกับดักไข่ออกกับไข่งลาย ($r = 0.893$, $p < 0.001$, Spearman-test) กับผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรเดือนที่สำรวจ ($r = 0.487$, $p > 0.001$, Spearman-test) กับผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรถัดจากเดือนที่สำรวจ 1 เดือน ($r = 0.409$, $p > 0.05$, Spearman-test) และกับผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรตลอดปี ($r = 0.142$, $p < 0.05$, Spearman-test) ดังแสดงในตารางที่ 6



ภาพที่ 1 แผนที่ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ ประชากรยุงลายจากค่าเฉลี่ยไข้ต่อกับดักไข่ยุงลาย ณ ตำแหน่งที่สำรวจ ใช้ข้อมูลปี 2555-2560 และ 2562 ของประเทศ



ภาพที่ 2 แผนที่ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ ประชากรยุ่งจากค่าเฉลี่ยร้อยละกับดักไข่ที่พบไข้อย่างง่าย ณ ตำแหน่งที่สำรวจใช้ข้อมูลปี 2555-2560 และ 2562 ของประเทศ

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยไข่ออกกับดักไข่อายุหลาย ร้อยละกับดักที่พบไข่อายุหลาย ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรเดือนที่สำรวจ ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรตลอดปีของปี 2555-2560 และ 2562 ที่ภาคกลาง ที่สำรวจ 1 เดือน และผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรตลอดปีของปี 2555-2560 และ 2562 ที่ภาคกลาง

ตัวแปร	จังหวัด						
	สระแก้ว	ตราด	ระยอง	ฉะเชิงเทรา	เพชรบุรี	กาญจนบุรี	ชัยนาท
ค่าเฉลี่ยไข่ออกกับดักไข่อายุหลาย	3.893กข	4.763กข	5.640กข	2.730ข	4.634กข	3.190กข	6.541ก
ร้อยละกับดักไข่ออกกับดักไข่อายุหลาย	23.213กข	28.912กข	29.901กข	18.873ข	26.209กข	24.331กข	36.834ก
ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรเดือนที่สำรวจ	11.557ก	21.439ก	21.538ก	15.556ก	11.378ก	5.587ก	7.185ก
ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรตลอดปี	17.363กขค	18.825กข	28.2973ก	17.242กขค	10.499กขค	7.056ขค	3.561ค
ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรตลอดปี	131.640กข	263.980กข	287.064ก	184.298กข	201.126กข	76.922ข	80.571ข

อักษรภาษาไทยที่ต่างกันตามแถว หมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05 โดยวิธี Duncan multiple range test

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยไข่ออกกับดักไข่อายุหลาย ร้อยละกับดักที่พบไข่อายุหลาย ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรเดือนที่สำรวจ ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรตลอดปีของปี 2555-2560 และ 2562 ที่ภาคเหนือ ที่สำรวจ 1 เดือน และผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรตลอดปีของปี 2555-2560 และ 2562 ที่ภาคเหนือ

ตัวแปร	จังหวัด						
	กำแพงเพชร	ลำปาง	เชียงใหม่	เชียงราย	พะเยา	น่าน	พิษณุโลก
ค่าเฉลี่ยไข่ออกกับดักไข่อายุหลาย	2.096กข	1.712ขค	2.135กข	1.060ค	1.220ขค	0.936ค	3.182ก
ร้อยละกับดักไข่ออกกับดักไข่อายุหลาย	14.956ก	13.295ก	13.045ก	6.630ข	10.369กข	6.360ข	17.551ก
ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรเดือนที่สำรวจ	3.270ก	6.553ก	12.881ก	9.832ก	1.918ก	2.602ก	3.809ก
ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรตลอดปี	6.823ก	18.670ก	28.461ก	24.511ก	6.402ก	7.171ก	5.816ก
ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรตลอดปี	88.741กข	131.169กข	298.682ก	303.662ก	53.249ข	99.274กข	84.793กข

อักษรภาษาไทยที่ต่างกันตามแถว หมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05 โดยวิธี Duncan multiple range test

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยไข่ออกกับตักไข่อายุหลาย ร้อยละกับตักที่พบไข่อายุหลาย ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรเดือนที่สำรวจ ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรตลอดปีของปี 2555-2560 และ 2562 ที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ตัวแปร	จังหวัด						
	นครราชสีมา	ชัยภูมิ	ขอนแก่น	เลย	สกลนคร	มหาสารคาม	อุบลราชธานี
ค่าเฉลี่ยไข่ออกกับตักไข่อายุหลาย	3.914ก	3.475ก	4.218ก	2.715ก	3.121ก	3.773ก	3.639ก
ร้อยละกับตักไข่ออกกับตักไข่อายุหลาย	21.032ก	25.738ก	29.267ก	22.821ก	22.718ก	24.638ก	27.128ก
ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรเดือนที่สำรวจ	8.286ก	7.603ก	4.453ก	8.205ก	4.015ก	4.859ก	9.699ก
ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรเดือนที่สำรวจ 1 เดือน	14.207ก	10.602ก	5.765ก	14.735ก	4.310ก	6.275ก	15.022ก
ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรตลอดปี	151.996ก	118.571ก	93.168กข	159.973ก	36.921ข	111.551ก	144.839ก

อักษรภาษาไทยที่ต่างกันตามแถว หมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05 โดยวิธี Duncan multiple range test

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยไข่ออกกับตักไข่อายุหลาย ร้อยละกับตักที่พบไข่อายุหลาย ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรเดือนที่สำรวจ ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรตลอดปีของปี 2555-2560 และ 2562 ที่ภาคใต้

ตัวแปร	จังหวัด						
	ชุมพร	ระนอง	พังงา	กระบี่	ตรัง	พัทลุง	นครศรีธรรมราช
ค่าเฉลี่ยไข่ออกกับตักไข่อายุหลาย	4.290ก	5.623ก	4.7185ก	8.265ก	6.025ก	5.833ก	7.291ก
ร้อยละกับตักไข่ออกกับตักไข่อายุหลาย	20.394ข	32.203กข	32.385กข	39.882ก	33.060กข	33.827กข	39.165ก
ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรเดือนที่สำรวจ	15.918ก	11.570ก	15.215ก	19.641ก	8.843ก	12.086ก	20.736ก
ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรเดือนที่สำรวจ 1 เดือน	11.884ก	8.933ก	9.583ก	12.285ก	7.704ก	16.755ก	18.261ก
ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรตลอดปี	122.925กขด	107.533กขด	177.317กข	239.963ก	84.502ด	155.604กข	181.198ก

อักษรภาษาไทยที่ต่างกันตามแถว หมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05 โดยวิธี Duncan multiple range test

ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ยไข้ต่อกับดักไข่ยุงลาย ร้อยละกับดักไข่ที่พบไข่ยุงลาย ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรเดือนที่สำรวจ ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรเดือนที่สำรวจ 1 เดือน และผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรตลอดปีของปี 2555-2560 และ 2562 ของ 4 ภาค

ตัวแปร	ภาคกลาง	ภาคใต้	ภาคเหนือ	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	ค่าเฉลี่ย
ค่าเฉลี่ยไข้ต่อกับดักไข่ยุงลาย	4.532ข	6.168ก	1.976ค	3.677ข	4.088
ร้อยละกับดักไข่ที่พบไข่ยุงลาย	27.191กข	33.557ก	12.76ค	25.047ข	24.639
ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรเดือนที่สำรวจ	13.069ก	13.97ก	6.376ค	7.040ข	10.114
ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรเดือนที่สำรวจ 1 เดือน	14.463กข	11.677ก	14.496ค	10.334ข	12.743
ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรตลอดปี	157.5ก	143.666ก	150.789ก	122.831ก	143.697

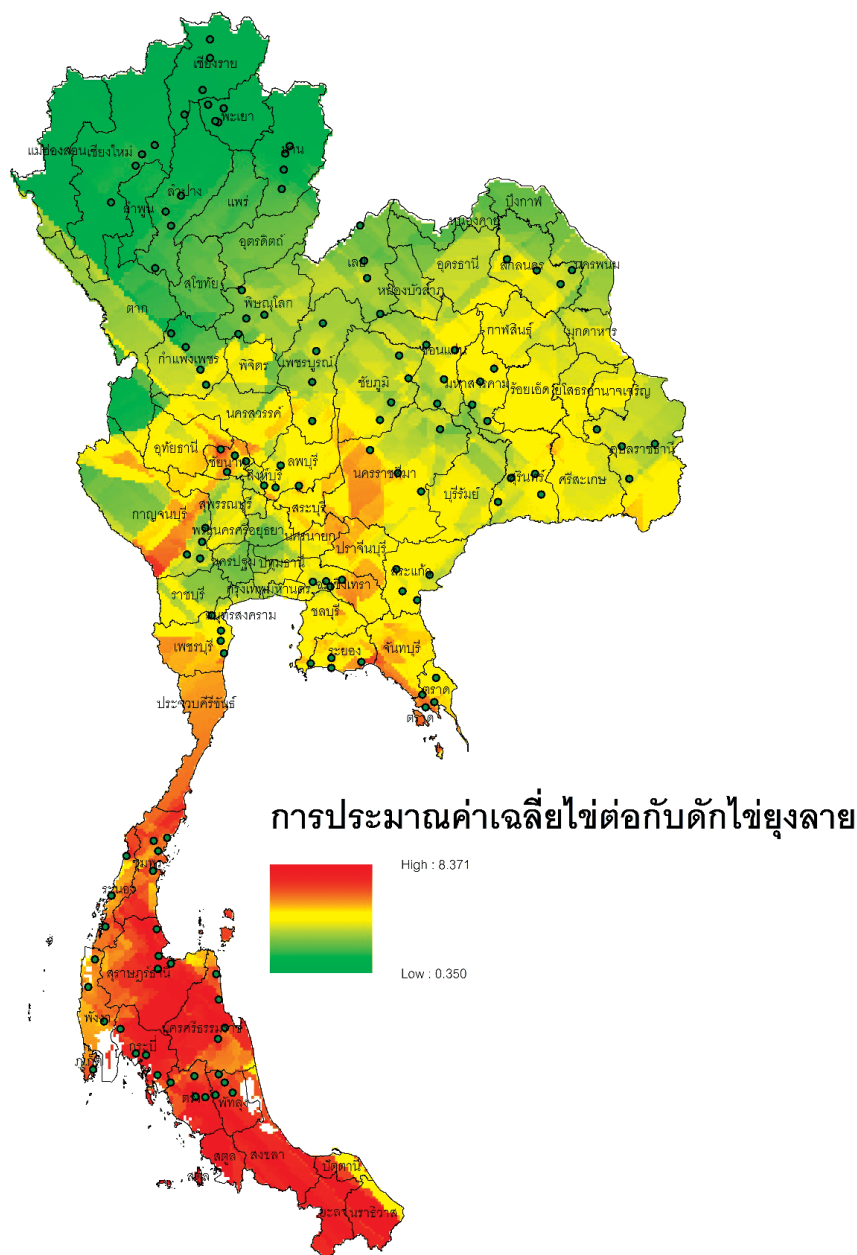
อักษรภาษาไทยที่ต่างกันตามแถว หมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05 โดยวิธี Duncan multiple range test

ตารางที่ 6 สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์วิธี Spearman ระหว่างค่าเฉลี่ยไข้ต่อกับดักไข่ยุงลาย ร้อยละกับดักไข่ที่พบไข่ยุงลาย ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรเดือนที่สำรวจ ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรเดือนที่สำรวจ 1 เดือน และผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรตลอดปีของ 4 ภาค

ตัวแปร	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5
X_1 = ค่าเฉลี่ยไข้ต่อกับดักไข่ยุงลาย		0.893**	0.487**	0.409*	0.142*
X_2 = ร้อยละกับดักไข่ที่พบไข่ยุงลาย			0.441**	0.377**	0.106
X_3 = ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรเดือนที่สำรวจ				0.893**	0.710**
X_4 = ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรเดือนที่สำรวจ 1 เดือน					0.702
X_5 = ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรตลอดปี					

*มีนัยสำคัญที่ 0.05, **มีนัยสำคัญที่ 0.01

การประมาณค่าเชิงพื้นที่ประชากรยุงลายของประเทศไทยจากข้อมูลทุกตำแหน่งที่สำรวจด้วยระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ ผลจากการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ประชากรยุงลายกับผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากร พบว่าค่าเฉลี่ยไข้ต่อกับดักไข่ยุงลายมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับร้อยละกับดักไข่ที่พบไข่ยุงลาย จึงได้นำเฉพาะค่าเฉลี่ยไข้ต่อกับดักไข่ยุงลายมาวิเคราะห์การประมาณค่าเชิงพื้นที่ประชากรยุงลายของประเทศไทยด้วยระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ ด้วยวิธี Ordinary Kriging ได้สมการพร้อมค่าตัวแปร ประกอบด้วย Regression function $Y = 0.326 \times + 2.525$, mean = 0.046, Root-Mean-Square = 2.582, Mean Standardized = 0.019, Root-Mean-Square Standardized = 1.012, Average Standard Error = 2.548 และได้ผลิตแผนที่ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ ดังแสดงในภาพที่ 3 มีค่าสูงสุดที่ภาคใต้ และรองลงมาคือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือ ตามลำดับจากแผนที่ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์นี้ทำให้ทราบข้อมูลการประมาณค่าประชากรยุงลายจากค่าเฉลี่ยไข้ต่อกับดักไข่ยุงลายทุกพื้นที่ในทุกจังหวัดของประเทศไทย



ภาพที่ 3 แผนที่ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ การประมาณค่าเชิงพื้นที่ประชากรยุงลายจากค่าเฉลี่ยไข้ต่อกับดักไข่ยุงลาย ใช้ข้อมูลปี 2555-2560 และ 2562 ของประเทศไทย

วิจารณ์

การเฝ้าระวังโรคไข้เลือดออกโดยใช้ข้อมูลผู้ป่วยในพื้นที่อย่างเดียวยังไม่เพียงพอ เนื่องจากมีผู้ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีแล้วไม่แสดงอาการ จะเป็นผู้นำเชื้อไวรัสเข้าไปในพื้นที่ และถ้ามียุงลายตัวเต็มวัยเพศเมียในพื้นที่ที่จะเพิ่มความเสี่ยงให้เกิดการระบาดของโรค โดยการแพร่เชื้อไวรัสเดงกีในพื้นที่ต้องมียุงลายตัวเต็มวัยเพศเมียไปกัดเลือดคนที่ติดเชื้อไวรัส และเพื่อนำมาสร้างไข่สำหรับการขยายพันธุ์ ขณะเดียวกันก็แพร่เชื้อไวรัสทำให้คนนั้นอาจเป็นโรคไข้เลือดออกแบบมีอาการและไม่มีอาการ เมื่อยุงลายได้กินเลือดจะสร้างไข่ เมื่อไข่พัฒนาเต็มที่ ยุงลายจะไปวางไข่ในภาชนะซึ่งน้ำสะอาดวางไข่ติดกับภาชนะเหนือระดับน้ำ จึงมีการพัฒนากับดักไข่ยุงลายและมีการใช้อย่างแพร่หลายเช่นที่ประเทศสิงคโปร์⁽¹⁵⁾ เนื่องจากการสำรวจนี้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ ไม่ต้องเข้าไปสำรวจบริเวณในบ้านเช่นชุมชนเขตเมืองจะพบปัญหาการเข้าบ้านสำรวจ เป็นวิธีที่สำรวจได้ครอบคลุมพื้นที่จำนวนมาก ใช้แรงงานน้อย ตรวจผลการสำรวจความถูกต้องของข้อมูลการสำรวจได้ง่ายจากการนับจำนวนไข่ อีกทั้งระยะไข่กับระยะตัวเต็มวัยเพศเมียมีความสัมพันธ์กัน ไข่ที่พบจำนวนมากสัมพันธ์กับยุงลายเพศเมียที่กินเลือดแล้วมีจำนวนมากในพื้นที่ ซึ่งจะสัมพันธ์กับความเสี่ยงการแพร่เชื้อไวรัสเดงกีทำให้เกิดโรคไข้เลือดออกในพื้นที่ การวิจัยครั้งนี้ได้หาระดับประชากรยุงลายจากกับดักไข่ยุงลาย ทำให้สามารถสำรวจยุงลายครอบคลุมทั้ง 4 ภาค ในช่วงเวลาเดียวกันคือ ช่วงมกราคมถึงพฤษภาคมเป็นช่วงก่อนฤดูการระบาดของโรคไข้เลือดออก นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ร่วมกับข้อมูลผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกด้วยวิธีระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์และสถิติแสดงให้เห็นว่ากับดักไข่ยุงลายสามารถตรวจจับประชากรของยุงลายในช่วงที่มีระดับค่อนข้างต่ำ⁽¹⁶⁾ โดยยุงลายเพศเมียพร้อมที่จะขยายพันธุ์มากขึ้นในฤดูฝนที่เป็นช่วงระบาดของโรคไข้เลือดออก การทราบข้อมูลยุงลายช่วงก่อนการระบาดของโรคจึงเป็นข้อมูลที่สำคัญสำหรับการควบคุมยุงลายพาหะนำโรคไข้เลือดออก จากผลการสำรวจสามารถใช้ในการจำแนกพื้นที่เสี่ยงจากประชากรของยุงลายมีมากน้อยตามพื้นที่ใดของจังหวัด นำไปใช้ในการวางแผนการควบคุมก่อนการระบาดของโรคนี้เป็นการควบคุมล่วงหน้าได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ความสัมพันธ์ระหว่างประชากรยุงลายและผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกของประเทศ ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นการใช้ข้อมูลระดับจังหวัดที่เก็บต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 7 ปี ทำให้ได้ข้อมูลจำนวนมากที่เพียงพอต่อการวิเคราะห์ทางสถิติจากวงจรการเกิดโรคไข้เลือดออก⁽¹⁷⁾ กรณีที่ยุงลายเพศเมียที่มีเชื้อไวรัสเดงกีไปกัดกินเลือดคนก็จะถ่ายทอดเชื้อไวรัสด้วยซึ่งจะมีระยะฟักตัวของเชื้อไวรัสในตัวคนประมาณ 5-8 วัน อาจจะป่วยเป็นโรคไข้เลือดออกแบบมีอาการหรือไม่มีอาการ ส่วนยุงเพศเมียใช้เวลา 3-5 ถึงจะไปวางไข่อีกครั้งหนึ่ง ซึ่งสนับสนุนผลจากงานวิจัยที่ว่าค่าเฉลี่ยไข่ยุงลายมีความสัมพันธ์กับผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกเดือนที่สำรวจ และอีกกรณีที่มีผู้ติดเชื้อไวรัสแบบที่ไม่มีอาการและไม่มีอาการของโรคเข้ามาในพื้นที่ ยุงลายเพศเมียไปกัดกินเลือดบุคคลนั้นก็ได้รับเชื้อไวรัส ระยะฟักตัวของเชื้อไวรัสในตัวยุงใช้เวลา 8-10 วัน และยุงเพศเมียใช้เวลา 3-5 วัน จะไปวางไข่ เมื่อยุงลายเพศเมียพร้อมที่จะแพร่เชื้อไวรัสเมื่อไปกัดกินเลือดครั้งที่ 2 ก็จะแพร่เชื้อให้อีกคน ซึ่งมีระยะฟักตัวของเชื้อไวรัสในคน 5-8 วัน อาจจะป่วยเป็นโรคไข้เลือดออกแบบมีอาการและไม่มีอาการ ซึ่งสนับสนุนผลงานวิจัยที่ว่าค่าเฉลี่ยไข่มีความสัมพันธ์กับข้อมูลผู้ป่วยไข้เลือดออกถัดจากเดือนที่สำรวจ 1 เดือน จากค่าเฉลี่ยไข่ยุงลายมีความสัมพันธ์กับผู้ป่วยตลอดปี และผู้ป่วยเดือนที่สำรวจมีความสัมพันธ์กับผู้ป่วยตลอดปี ดังนั้นจึงมีความสัมพันธ์ที่ต่อเนื่องกัน สนับสนุนว่าค่าเฉลี่ยไข่มีความสัมพันธ์กับผู้ป่วยตลอดทั้งปี จากผลการวิจัยแสดงถึงความสัมพันธ์ของประชากรของยุงลายและผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกเป็นไปในทางเดียวกัน หมายถึงว่าประชากรของยุงลายสูงโอกาสเกิดโรคไข้เลือดออกก็สูงด้วย เป็นข้อมูลที่มีความสำคัญใช้ในการเตือนภัยและวางแผนการควบคุมโรคไข้เลือดออกในพื้นที่ เช่น ถ้าพบว่าประชากรยุงเริ่มสูงขึ้นในพื้นที่ใดแสดงว่าเป็นพื้นที่เสี่ยงมีโอกาสจะเกิดโรคไข้เลือดออกสูงในพื้นที่นั้น เป็นข้อมูลสำคัญในการจัดการวางแผนการควบคุมยุงลายได้อย่างเหมาะสม

เทคนิคการประมาณค่าเชิงพื้นที่ที่มีการประยุกต์ใช้ในด้านกีฏวิทยา⁽¹⁸⁾ การวิจัยนี้เป็นการศึกษาครั้งแรกของประเทศที่นำเทคโนโลยีระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ มาทำการวิเคราะห์ระดับประเทศโดยใช้ข้อมูลประชากรของยุงลายจากกับดักไข่ที่มีการเก็บข้อมูลที่ต่อเนื่อง 7 ปี ที่มีการเก็บข้อมูลที่กระจายตัวครอบคลุมทุกภาคของประเทศถึง 128 อำเภอ

ใน 32 จังหวัด ทั้ง 4 ภาค ทำให้ได้แผนที่ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์การประมาณค่าของทั้งประเทศทำให้ทราบระดับประชากรของยุงในพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศเพื่อใช้สำหรับการวางแผนควบคุมโรคไข้เลือดออก อีกทั้งสามารถใช้เป็นต้นแบบในการการสำรวจระดับตำบล อำเภอ และจังหวัด ใช้การสำรวจยุงลายด้วยกับดักไข่ยุงลายและข้อมูลผู้ป่วย วิเคราะห์ด้วยระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์และสถิติ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการหาพื้นที่เสี่ยงและการควบคุมโรคไข้เลือดออกได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สรุป

จากการสำรวจประชากรยุงลายด้วยกับดักไข่ยุงลาย ทำการสำรวจ 128 อำเภอ ใน 32 จังหวัด ทั้ง 4 ภาค ของประเทศสำรวจช่วงเดือนมกราคมถึงพฤษภาคม ปีละ 1 ครั้ง รวม 7 ครั้ง ของปี 2555-2560 และ 2562 ผลการหา ระดับประชากรยุงลายจากกับดักไข่ยุงลายของภาคและประเทศ ประชากรของยุงลายจากค่าเฉลี่ยไข่ต่อกับดักไข่ยุงลาย และร้อยละกับดักไข่ที่พบไข่ยุงลายมีค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. เท่ากับ 4.101 ± 2.670 , 24.7451 ± 11.772 ค่าสูงสุดที่ภาคใต้และ รองลงมาคือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือ ตามลำดับ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยไข่ต่อกับดักไข่ยุงลาย ร้อยละกับดักไข่ที่พบไข่ยุงลาย ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากร ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากร ถัดจากเดือนที่สำรวจ 1 เดือน และผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรตลอดปี มีความแตกต่างของจังหวัด และตามภาค การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ประชากรยุงลายกับผู้ป่วยโรคไข้เลือดออก พบว่าค่าเฉลี่ยไข่ต่อกับดักไข่ยุงลาย มีความสัมพันธ์กับร้อยละกับดักไข่ที่พบไข่ยุงลาย ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากร ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรถัดจากเดือนที่สำรวจ 1 เดือน และผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกต่อแสนประชากรตลอดปี การประมาณค่าเชิงพื้นที่ประชากรยุงลายของประเทศจากข้อมูลทุกตำแหน่งที่สำรวจด้วยระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ของค่าเฉลี่ยไข่ต่อกับดักไข่ยุงลายด้วยวิธี Ordinary Kriging ได้สมการและแผนที่ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์มีค่าสูงสุดที่ภาคใต้ และรองลงมาคือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือ ตามลำดับ จากข้อมูลทั้งหมดสามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการหาพื้นที่เสี่ยงและวางแผนการควบคุมโรคไข้เลือดออกได้อย่างมีประสิทธิภาพ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขและกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สำหรับการสนับสนุนงบประมาณและบุคลากร ขอขอบคุณสำนักระบาดวิทยา สำหรับข้อมูลผู้ป่วยโรคไข้เลือดออก และขอขอบคุณอาสาสมัครสาธารณสุขประจำหมู่บ้านในพื้นที่สำรวจ สำหรับการช่วยงานภาคสนามอย่างดียิ่ง

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization Regional Office for South East Asia (SEARO). Situation update of dengue in the SEA Region, 2010. New Delhi, India: World Health Organization Regional Office for South-East Asia (SEARO); 2010.
2. Shepard DS, Undurraga EA, Halasa YA. Economic and disease burden of dengue in Southeast Asia. PloS Negl Trop Dis 2013; 7(2): e2055. (12 pages).
3. Limkittikul K, Brett J, L'Azou M. Epidemiological trends of dengue disease in Thailand (2000-2011): a systematic literature review. PloS Negl Trop Dis 2014; 8(11): e3241. (11 pages).

4. จิตติ จันทรแสง. การสำรวจยุงลายพาหะโรคไข้เลือดออกและการวิเคราะห์ด้านสถิติ. ใน: อุษาวดี ถาวร, และ คณะบรรณาธิการ. ชีววิทยา นิเวศวิทยา และการควบคุมยุงในประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 4. นนทบุรี: สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2553. หน้า 44-64.
5. จิตติ จันทรแสง, อรุณกร จันทรแสง, อุษาวดี ถาวร, ประคอง พันธุ์ไร. การแพร่กระจายของยุงลายในชนบท ช่วง พ.ศ. 2532-2534. ว กรมวิทย พ 2536; 35(2): 91-106.
6. Hasnan A, Dom NC, Rosly H, Tiong CS. Quantifying the distribution and abundance of *Aedes* mosquitoes in dengue risk areas in Shah Alam, Selangor. *Social Behav Sci* 2016; 234: 154-63.
7. Dibo MR, Chierotti AP, Ferrari MS, Mendonca AL, Chiaravalloti Neto F. Study of the relationship between *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* egg and adult densities, dengue fever and climate in Mirassol, state of São Paulo, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 2008; 103(6): 554-60.
8. จิตติ จันทรแสง. การประยุกต์ใช้ระบบสารสนเทศทางภูมิศาสตร์และการสำรวจข้อมูลระยะไกลเพื่อประเมินความเสี่ยงต่อไข้เลือดออกในประเทศไทย. [วิทยานิพนธ์]. ภาควิชาชีววิทยา, บัณฑิตวิทยาลัย. นครปฐม: มหาวิทยาลัยมหิดล; 2548.
9. Chansang C, Kittayapong P. Application of mosquito sampling count and geospatial methods to improve dengue vector surveillance. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 77(5): 897-902.
10. จิตติ จันทรแสง, อุษาวดี ถาวร, อรุณกร จันทรแสง, อภิวิทย์ ธวัชสิน, สุลล เป้าศรีวงษ์, ประคอง พันธุ์ไร. การสำรวจความชุกชุมของยุงลายแบบเลือกตัวอย่างเชิงสุ่มเพื่อการเฝ้าระวังโรคไข้เลือดออก. *วารสารวิชาการสาธารณสุข* 2540; 6(1): 82-90.
11. สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค. จำนวนผู้ป่วย-เสียชีวิตรายเดือน แยกรายจังหวัด, จำนวนและอัตราป่วย-ตาย ต่อแสนประชากร แยกรายจังหวัด. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 15 ม.ค. 2564]; [14 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <http://www.boe.moph.go.th/boedb/surdata/disease.php?dcontent=old&ds=262766>.
12. จิตติ จันทรแสง. การแปลงข้อมูลสำหรับวิเคราะห์ทางสถิติด้านชีววิทยา. ว กรมวิทย พ 2533; 32(1): 47-52.
13. Norusis, MJ. SPSS/PC+. Chicago: SPSS Inc.; 1988. p. 199-244.
14. จิตติ จันทรแสง และคณะ. เอกสารการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ ครั้งที่ 22 เรื่อง แผนที่ GIS เพื่อการประมาณค่าเชิงพื้นที่ของประเทศ จากผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์: กรณีศึกษาการตรวจไวรัสเดงกีและประชากรยุงลายพาหะนำโรคไข้เลือดออก. วันที่ 30 มิถุนายน - 2 กรกฎาคม 2557. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2557.
15. Ai-leen GT, Song RJ. The use of GIS in ovitrap monitoring for dengue control in Singapore. *Dengue Bull* 2000; 24: 110-6.
16. Focks DA. A review of entomological sampling methods and indicator for dengue vectors. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2003.
17. Hermann LL, Gupta SB, Manoff SB, Kalayanaroj S, Gibbons RV, Collier BAG. Advances in the understanding, management, and prevention of dengue. *J Clin Virol* 2015; 64: 153-9.
18. Focks DA, Brenner RJ, Chadee DD, Trospen JH. The use of spatial analysis in the control and risk assessment of vector-borne diseases. *American Entomol* 1999; 45(3): 173-83.

Dengue Risk Areas for Thailand from *Aedes* Ovitrap Survey and Dengue Cases Analysis with Geographic Information System

Chitti Chansang¹ Jariya Krutbut¹ Thanyapak Makruen¹ Wannisa Suebsaard¹
Ekarat Denchonchai¹ Suwannapa Ninphanomchai² and Uruiyakorn Chansang¹

¹National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000

²Faculty of Science, Mahidol University at Salaya, 999 Phuttamonthon 4 Road, Salaya, Nakhon Pathom 73170, Thailand

ABSTRACT Dengue fever is still the public health problem in Thailand. The population and distribution of *Aedes* mosquitoes are important information for disease control. The visual larval survey that calculated larval index based on containers with and without larvae is found not to relate directly to the disease. While the eggs stage that collected by *Aedes* ovitrap, is associated with adult stage which is the stage for viral transmission. This research used ovitraps for *Aedes* survey for 7 years by using 5,120 ovitraps in each year in 128 districts of 32 provinces in 4 geographical regions of Thailand. Data from *Aedes* ovitraps, dengue cases in each province were analyzed with Geographic Information System and statistics. The results showed that the average eggs per ovitrap and the percent positive ovitrap found the highest in the South followed by Central, Northeast and North parts respectively and these value varies by province. The relations between the *Aedes* egg data and dengue cases were statistically significant. In addition, Spatial estimation of the *Aedes* population in the entire country were analysis with the Geographic Information System in Ordinary Kriging method, using the data of all location surveys. The obtained results could be used to estimate the *Aedes* population in every province. These all results can be applied for risk areas and direct control of dengue in Thailand.

Keywords : Dengue, *Aedes* mosquito, Population, Ovitrap, Geographic Information System

กลุ่มของยีนที่มีการเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอเมทิลเลชัน ที่ผิวหนังและผิวหนังที่ไม่มีรอยโรคของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน เปรียบเทียบกับผิวหนังคนปกติโดยวิธี เมทิลเลชันไมโครอะเรย์

เกรียงศักดิ์ อุชุศาสตร์¹ ลัดดาวัลย์ เทียมสิงห์¹ พรรณทิพา พรตเจริญ² และจกกลณี วงศ์ปิยะบวร²

¹สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ ถนนพหลโยธิน 11000

²คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพระรามที่ 4 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

บทคัดย่อ โรคสะเก็ดเงินมีอุบัติการณ์ประมาณร้อยละ 1-3 ของประชากรโลก สาเหตุของการเกิดโรคนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด การเปลี่ยนแปลงแบบนอกเหนือยีน (epigenetics) มีความสำคัญต่อการเกิดโรคสะเก็ดเงิน คณะผู้วิจัยทำการศึกษาการเกิด ดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีน โดยใช้เทคนิคเมทิลเลชันไมโครอะเรย์ โดยศึกษาจากผิวหนังและผิวหนังที่ไม่มีรอยโรคของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน เปรียบเทียบกับผิวหนังปกติของคนปกติ โดยแบ่งกลุ่มละ 6 ตัวอย่าง พบยีนที่คาดว่าจะมีความสำคัญจำนวน 6 ยีน คือ ยีน *MSX1*, *TCP11*, *C16orf47*, *HOXB1*, *HTR3B* และ *TH* และคัดเลือกยีน *MSX1* ศึกษาภาวะดีเอ็นเอเมทิลเลชัน โดยวิธีเมทิลเลชันสเปซิฟิกไฟโรเมอร์ (MSP) ในผิวหนังและเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน เปรียบเทียบกับคนปกติ โดยพบว่าผิวหนังคนปกติเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันจำนวน 3 ตัวอย่าง จาก 4 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 75 ในขณะที่ผิวหนังไม่เกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันจากทั้ง 6 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 0 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอเมทิลเลชันโดยวิธีเมทิลเลชันไมโครอะเรย์ ที่ศึกษาเป็นแบบ high through-put และจากผลการศึกษาดังกล่าวทำให้สามารถคัดเลือกยีนที่สำคัญมาทำการศึกษาต่อ และ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าภาวะดีเอ็นเอเมทิลเลชันมีความสำคัญต่อพยาธิกำเนิดของโรคสะเก็ดเงิน

คำสำคัญ: โรคสะเก็ดเงิน, ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน, เมทิลเลชันไมโครอะเรย์, ยีนเอ็มเอสเอ็กซ์วัน

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

Received: 28 January 2021

Revised: 2 March 2021

Accepted: 11 March 2021

บทนำ

โรคสะเก็ดเงิน (psoriasis) เป็นโรคผิวหนังที่พบได้บ่อยประมาณร้อยละ 1-3 ของประชากรโลก⁽¹⁾ ความชุกของการเกิดโรคแตกต่างกันไปตามภูมิประเทศ เชื้อชาติ และสิ่งแวดล้อม ตัวอย่างเช่น อัตราความชุกในประเทศซามัว (Samoa) ต่ำสุดถึงร้อยละ 0 แต่ในพื้นที่ Arctic-Kasach'ye กลับพบสูงถึงร้อยละ 11.8⁽²⁾ ทางด้านเอเชียซึ่งมีประชากรเชื้อชาติต่างๆ จำนวนมาก พบว่าความชุกของโรคสะเก็ดเงินในประเทศอินเดียร้อยละ 0.5-1.5 ประเทศมาเลเซียร้อยละ 4.0-5.5 ประเทศญี่ปุ่นร้อยละ 1.18 และประเทศคูเวตร้อยละ 3.1⁽³⁾ เป็นต้น สำหรับประเทศไทยจากรายงานประจำปีของสถาบันโรคผิวหนัง กระทรวงสาธารณสุข เฉลี่ย 3,000 รายต่อปี ซึ่งคาดว่าจะมีจำนวนผู้ป่วยทั่วประเทศมากกว่านี้

โรคสะเก็ดเงินเป็นโรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกันต่อต้านตนเองที่เกี่ยวข้องกับเม็ดเลือดขาวชนิดทีลิมโฟไซท์ (T-lymphocyte mediated skin autoimmune disease)⁽⁴⁾ โดยผู้ป่วยมีพันธุกรรมที่มีแนวโน้มในการตอบสนองของภูมิคุ้มกันเป็นแบบ type 1 immune effector functions และปัจจุบันยังไม่ทราบสาเหตุที่แท้จริงของโรคและกลไกการเกิดโรคที่ชัดเจน พันธุกรรมเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีส่วนเกี่ยวข้องโดยมีรายงานการวิจัยที่พบว่าผู้ป่วยในวัยเด็กที่เป็นโรคสะเก็ดเงินมักมีประวัติทางครอบครัวมาก่อน มากถึงร้อยละ 71⁽⁵⁾ และการศึกษาหา susceptibility regions บนตำแหน่งต่างๆ ของโครโมโซมเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคสะเก็ดเงิน พบว่ามียีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค และการดำเนินของโรคสะเก็ดเงินคือ ยีนที่มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 1q21, 3q21, 4q, 7p, 8, 11, 16q, 17q, 20p และ 6p⁽⁶⁾ เป็นต้น

แนวทางการวิจัยของโรคนี้ นอกจากวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในยีนแล้ว ยังมีการศึกษาการควบคุมแบบนอกเหนือพันธุกรรม (epigenetics) ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงกลไกการทำงานของยีน โดยไม่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของสายดีเอ็นเอ (DNA) โดยเฉพาะการเกิดภาวะดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) ขึ้นภายในยีน เช่น ตัวอย่างการศึกษาที่แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของการเกิดมะเร็งกับการเปลี่ยนแปลงระดับดีเอ็นเอดีเมทิลเลชัน/ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA demethylation/methylation) ทั้งในส่วนยีนควบคุมการแสดงออกของมะเร็ง (oncogene) และยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene)^(7, 8, 9) นอกจากนี้การศึกษาด้านพันธุกรรมการเกิดภาวะดีเอ็นเอเมทิลเลชันกับการเกิดโรคสะเก็ดเงิน เช่น รายงานภาวะดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีน *SHP-1* ซึ่งทำหน้าที่เป็น negative regulatory signal gene ในเซลล์ผิวหนังของคนไข้โรคสะเก็ดเงิน (psoriasis) เป็นต้น⁽¹⁰⁾

ปัจจุบันมีการพัฒนาการตรวจหาดีเอ็นเอเมทิลเลชันโดยวิธีไมโครอะเรย์ ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไว แม่นยำ รวดเร็ว และสามารถตรวจหาเบื้องต้น (Screening) ของยีนทั้งหมดที่ควบคุมด้วยกระบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชัน โดยมีรายงานข้อมูลที่เกี่ยวข้องและเป็นประโยชน์ เช่น การศึกษาการเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอเมทิลเลชันใน HeLa cell line⁽¹¹⁾ ในเซลล์เม็ดเลือดขาว (Normal peripheral blood leukocytes) และชิ้นเนื้อของอวัยวะต่างๆ ของคนปกติ โดยพบว่าประมาณร้อยละ 4 ของยีนบนออโตโซม (autosomal gene) เกิดภาวะดีเอ็นเอเมทิลเลชันขึ้นในส่วนโปรโมเตอร์ (บริเวณที่มี CpG islands) ของเซลล์ปกติเหล่านี้ ซึ่งเป็นหลักฐานสำคัญว่ากระบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชันมีความสัมพันธ์กับกระบวนการ tissue-specific gene silencing ในเซลล์ปกติ⁽¹²⁾ และการศึกษาในชิ้นเนื้อของลูกอัณฑะ (testis) ชิ้นเนื้อสมอง (brain) และเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซท์ (Lymphocyte) ของคนปกติที่มีการแสดงออกของยีนมีความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะเมทิลเลชันทั้งที่เกิดในและนอกส่วนโปรโมเตอร์ของยีน⁽¹³⁾ เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบของการเกิดภาวะเมทิลเลชันในโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก (prostate cancer) โดยสามารถบอกถึงยีนที่ค้นพบใหม่ที่ถูกควบคุมโดยกระบวนการเมทิลเลชันประมาณ 25 ยีน ซึ่งน่าจะมีความสำคัญกับพยาธิกำเนิดของโรค⁽¹⁴⁾ ในมะเร็งปอดสามารถพบยีนใหม่ประมาณ 11 ยีน (*LHX2, LHX4, PAX7, HOXB13, LBX1, SIX2, HOXD3, DLX1, HOXD1, ONECUT2* and *PAX9*) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเกิดภาวะเมทิลเลชันในโรคมะเร็งเป็นทั้งแบบครอบคลุมทั้งหมด (global DNA methylation)⁽¹⁵⁾ อย่างไรก็ตามข้อมูลการตรวจโดยใช้วิธีนี้ในกลุ่มโรคภูมิคุ้มกันต้านตนเอง (autoimmune diseases) โดยเฉพาะโรคสะเก็ดเงินยังมีไม่มากนัก ดังนั้นการศึกษานี้

ผู้วิจัยจะสามารถค้นหายีนทั้งหมดที่เกิดภาวะดีเอ็นเอเมทิลเลชัน/ดีเอ็นเอดีเมทิลเลชันที่เกี่ยวข้องกับโรคสะเก็ดเงิน และใช้เป็นแหล่งข้อมูลของยีนในการศึกษาพยาธิกำเนิดของโรคต่อไป

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา (Evaluation samples)

ผู้ป่วยประชากรไทยที่เป็นโรคสะเก็ดเงิน (psoriasis) ที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และลงนามในใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย

เกณฑ์การเลือกผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน (psoriasis patient)

Inclusion criteria:

- ผู้หญิงหรือผู้ชายที่มีอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 18 ปี เชื้อชาติไทย หรือไทยจีน
- ผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคสะเก็ดเงินชนิด chronic plaque type โดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญทางผิวหนัง พร้อมทั้งได้รับการตรวจชิ้นเนื้อทางห้องปฏิบัติการเพื่อยืนยันผลการวินิจฉัย

Exclusion criteria:

- ผู้ป่วยที่ไม่สมัครใจที่ยินยอมเข้าร่วมงานวิจัย
- ผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินที่ได้รับยาทาเฉพาะที่ภายใน 2 สัปดาห์ หรือยารับประทานรักษาโรคสะเก็ดเงิน ภายใน 4 สัปดาห์ก่อนเข้าร่วมการวิจัย
- ผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องและผู้ป่วยที่ได้รับยากลุ่มคอร์ติโคสเตียรอยด์ (corticosteroid) รวมถึงยากดภูมิคุ้มกันอื่นๆ ขณะทำการศึกษา
- ผู้ป่วยที่มีภาวะ autoimmune diseases อื่นๆ
- ผู้ป่วยที่มีประวัติเป็นโรคมะเร็ง

เกณฑ์การเลือกกลุ่มควบคุม (healthy control)

Inclusion criteria:

- อาสาสมัครหญิงหรือชายที่มีอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 18 ปี เชื้อชาติไทย หรือไทยจีน
- อาสาสมัครที่มีสุขภาพดี

Exclusion criteria:

- มีประวัติครอบครัวเคยเป็นโรคสะเก็ดเงิน และอาสาสมัครมีประวัติเป็น autoimmune diseases อื่นๆ

ขั้นตอนการเก็บข้อมูล

1. ผู้ป่วยยินยอมเข้าร่วมการศึกษาโดยลงนามในใบยินยอม
2. บันทึกข้อมูลที่สำคัญทางคลินิกของผู้ป่วย
 - ข้อมูลพื้นฐานทั่วไป (demographic data)
 - ประเมินความรุนแรงของโรค โดยอาศัยจากอาการ ใช้ Psoriasis Area and Severity Index (PASI) score ซึ่งเป็น clinical score มาตรฐานในการประเมินความรุนแรงของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน

การเก็บตัวอย่างเลือดและการคัดแยกเซลล์เม็ดเลือดขาว

เก็บตัวอย่างเลือด 30 มิลลิลิตร ใน heparin tube นำมา

- ปั่นแยก peripheral blood mononuclear cell (PBMC) โดยใช้วิธี Ficoll-hypaque density gradient และใช้ immunomagnetic bead ที่จำเพาะในการแยก CD4+ T cell, CD8+ T cell และ B cell
- ปั่นแยก neutrophil โดยใช้วิธี polymorph-prep density gradient

การเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อ

ผู้ป่วยจะได้รับการตัดชิ้นเนื้อโดยวิธี punch biopsy บริเวณรอยโรค ผื่น (Involved skin) 1 ตำแหน่ง และผิวหนังปกติห่างจากรอยโรค 10 เซนติเมตร (ผิวหนังที่ไม่มีรอยโรค, Uninvolved skin) 1 ตำแหน่ง ซึ่งผู้วิจัยจะนำส่งตรวจพยาธิสภาพตามปกติ โดยการย้อม H&E และทำการตัดชิ้นเนื้อจาก paraffin section และแบ่งชิ้นเนื้อบางส่วนเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (°C) เพื่อเตรียม frozen section จากนั้นนำมาแยกเซลล์ชั้นหนังกำพร้าออกมาศึกษาโดยทำการแยกเซลล์ด้วยวิธี Laser capture microdissection (LCM)

ตัวอย่างที่ตรวจหาดีเอ็นเอเมทิลเลชันโดยวิธีเมทิลเลชันไมโครอะเรย์ (methylation microarray)

โดยใช้เซลล์หนังกำพร้าจากผู้ป่วยจำนวน 6 ราย โดยทำบริเวณผื่นโรคสะเก็ดเงิน (Involved skin) 6 ชิ้น (ตัวอย่าง), ผิวหนังที่ไม่มีรอยโรค (Uninvolved skin) 6 ชิ้น (ตัวอย่าง) และผิวหนังปกติ (Normal skin) 6 ชิ้น (ตัวอย่าง) จากคนปกติจำนวน 6 ราย รวมจำนวนทั้งสิ้น 18 ชิ้น (ตัวอย่าง) ทำการแยกเซลล์ด้วยวิธี Laser capture microdissection (LCM) นอกจากนั้นใช้เซลล์เพาะเลี้ยง (Cell line, HaCaT) 2 ตัวอย่าง PBMC ของคนปกติ 1 ตัวอย่าง PBMC ของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน 1 ตัวอย่าง และตัวควบคุมของอิลูมินา (Illumina control) 2 ตัวอย่าง (มาพร้อมกับชุด Illumina Infinium Human Methylation27 BeadChip) รวมจำนวนทั้งสิ้น 24 ตัวอย่าง การศึกษาครั้งนี้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รหัส 300/54

การเตรียมตัวอย่างโดยการวิธี Bisulfite treated-DNA⁽¹⁶⁾

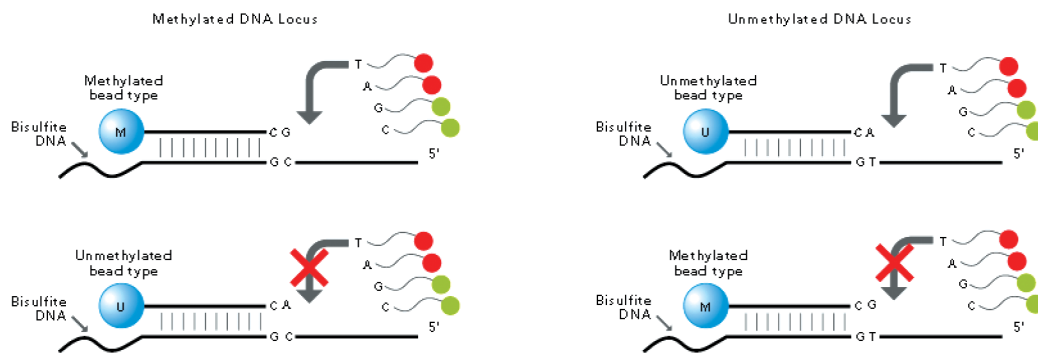
การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุด QIamp DNA Min Kit (Qiagen, Hilden, Germany) (ตาม Protocol) และตามด้วยการทำ Bisulfite treated-DNA⁽¹⁶⁾ โดยวิธีการย่อดังนี้ ใช้ดีเอ็นเอ 2 µg ในน้ำ 50 µl แล้วทำให้ดีเอ็นเอแยกสาย โดยใช้ 2 M NaOH นาน 10 นาที 37 °C จากนั้นเติม 30 µl ของ 10 mM hydroquinone และ 520 µl ของ 3 M sodium bisulfite (pH 5.0) นำตัวอย่างที่ได้ไปต้ม (incubated) ที่ 50 °C นาน 16-20 ชั่วโมง ตัวอย่างที่ได้ (Bisulfite-treated DNA) ถูกทำให้บริสุทธิ์มากขึ้น โดยใช้ Wizard DNA Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA) จากนั้นดีเอ็นเอจะถูกแยกออกมาโดยใช้น้ำที่อุณหภูมิ 95 °C จำนวน 50 µl หลังจากนั้นเติม 5.5 µl ของ 3 M NaOH ที่ไว้นาน 5 นาที ตกตะกอนด้วยเอทานอลและไกลโคเจน จากนั้นเติมน้ำจำนวน 20 µl Bisulfite-treated DNA จะถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

วิธีการ

วิธีเมทิลเลชันไมโครอะเรย์ (methylation microarray) โดย Illumina Infinium Human Methylation27 BeadChip

Bisulfite-treated DNA คือการเปลี่ยน cytosine เป็น uracil (unmethylated DNA) ในขณะที่ cytosine ที่ถูก methylated จะคงเป็น cytosine (methylated DNA) จากนั้น U bead type (ที่จำเพาะกับ un-methylated CpG) และ M bead type (ที่จำเพาะกับ methylated CpG) ดังแสดงในภาพที่ 1 โดยใช้ Illumina Infinium Human Methylation27 BeadChip (Illumina, Inc. San Diego, CA, USA) (The manufacturer's instruction) สแกนด้วย Illumina BeadArray Reader แล้วประมวลผลโดยซอฟต์แวร์ GenomeStudio 3.2 (Genomestudio Methylation Module v3.2, User Guide. Illumina Inc., San Diego, CA, USA) ข้อมูลดิบได้รับการฝากไว้ในฐานข้อมูล NCBI GEO ภายใต้หมายเลข Accession ของ GSE23789 ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CU-DREAM (CU-DREAM program)⁽¹⁷⁾ เพื่อคำนวณค่าเมทิลเลชันเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มตัวอย่างในแต่ละ

การทดลอง (ซีพีจี 27,578 ตำแหน่ง บนจีโนม) และนำข้อมูลที่ได้มารวบรวมและจัดเรียงลงในโปรแกรม Microsoft Excel



ภาพที่ 1 หลักการของเมทิลเลชันไมโครอะเรย์ (methylation microarray) โดย Bisulfite-treated DNA คือการเปลี่ยน cytosine เป็น uracil (unmethylated DNA) ในขณะที่ cytosine ที่ถูก methylated จะคงเป็น cytosine (methylated DNA) จากนั้น U bead type (ที่จำเพาะกับ unmethylated CpG) และ M bead type (ที่จำเพาะกับ methylated CpG) (Illumina user Guide line, 2008)

การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติ

การวิเคราะห์เมทิลเลชันไมโครอะเรย์ เพื่อดูความสัมพันธ์ของยีนที่น่าสนใจ (candidate gene) กับโรค สะเก็ดเงิน จะถูกวิเคราะห์แต่ละยีนในทางสถิติ เช่น ค่า beta value (β) และค่า Difference score (*DiffScore*) ในตำแหน่งของ CpG locus เป็นค่าที่ใช้ประมาณค่าของระดับของดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) ซึ่งมีสูตรดังนี้

$$\beta = \frac{\text{Max (signal B, 0)}}{\text{Max (signal A, 0) + Max (signal B, 0) + 100}}$$

สำหรับค่า *DiffScore* เป็นการคำนวณความแตกต่างของดีเอ็นเอเมทิลเลชันโดยใช้ค่าของ β ของกลุ่มตัวอย่าง (condition group) กับกลุ่มอ้างอิง (reference group) โดยมีสูตรคำนวณดังนี้

$$p = z \left(\frac{|\beta_{cond} - \beta_{ref}|}{\sqrt{\frac{S^2_{ref}}{N_{ref}} + \frac{S^2_{cond}}{N_{cond}}}} \right)$$

$$DiffScore = 10 \text{ sgn} (\beta_{cond} - \beta_{ref}) \log_{10} p$$

โดยค่า Difference score (*DiffScore*) > 20 มีค่า $p < 0.01^{(18,19)}$ และการให้เกณฑ์การแปลผล *DiffScore* แยกเป็น *DiffScore* < -40 เกิดภาวะดีเอ็นเอดีเมทิลเลชัน และ *DiffScore* > 40 เกิดภาวะดีเอ็นเอเมทิลเลชัน การสรุปข้อมูลอื่นๆ ใช้ mean $\pm$ SD, median, interquartile range และ proportion การทดสอบสมมติฐานของการศึกษาใช้ Wilcoxon signed rank test การทดสอบความแตกต่าง (Test of difference) ใช้ Mann-Whitney test และ Kruskal-Wallis test ทดสอบ correlation ใช้ Spearman correlation วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม SPSS version 16 และจะถือว่ามียีนสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $\alpha=0.05$

วิธีตรวจดีเอ็นเอเมทิลเลชัน โดยเมทิลเลชันสเปซิฟิกไพรเมอร์ (**Methylation Specific Primer, MSP**) ของยีนเอ็มเอสเอ็กซ์วัน (*MSX1*)

Bisulfite-treated DNA ถูกตรวจหาการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน โดยใช้ $1 \times$ PCR buffer (Tris-Cl, KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.5 mM MgCl_2 , pH 8.3), 1 unit HotStarTaq DNA Polymerase, 200 nM of each dNTPs (Qiagen, USA), 0.25 μM of each forward and reverse primers and 2 μl of the Bisulfite treated DNA. Primer *MSX1* MF AGG-ATT-TCG-TTT-TCG-GTA-AGT-CGG-C 25 bp (ตำแหน่ง 282 – 306) และ Primer *MSX1* MR CTC-GAA-AAA-CGC-CAA-AAC-GCT-CT 23 bp (ตำแหน่ง 487 – 465) (สำหรับ methylated form) และ primer *MSX1* UF TTT-TGT-TTT-TGG-TAA-GTT-GGT-GGG-G 25 bp (ตำแหน่ง 291 – 315) และ *MSX1* UR CCC-TCA-AAA-AAC-ACC-AAA-ACA-CTC-T 25 bp (ตำแหน่ง 487 – 465) (RefSeqID: NM_002448) สำหรับ unmethylated form จากนั้นทำ PCR ด้วยเครื่อง Gene Amp 2400 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

ขั้นตอน PCR

94°C นาน 5 นาที	1 รอบ
94°C นาน 1 นาที	40 รอบ (met/unmet)
55°C นาน 1 นาที	
72°C นาน 1 นาที	
72°C นาน 5 นาที	1 รอบ

การตรวจชิ้นส่วนที่ได้ (PCR product) ทั้งหมดนำมาแยกด้วย gel electrophoresis

เตรียม 2% agarose gel ที่มีความเข้มข้น $0.5 \times$ TBE buffer ในความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ นาน 45 นาที และย้อมด้วย ethidium bromide ดูภายใต้แสง UV เพื่อสังเกตหา PCR product ของยีน *MSX1* ทั้ง 2 แบบ (M, methylated form และ U, unmethylated form) ขนาด 206 และ 199 bp ตามลำดับ

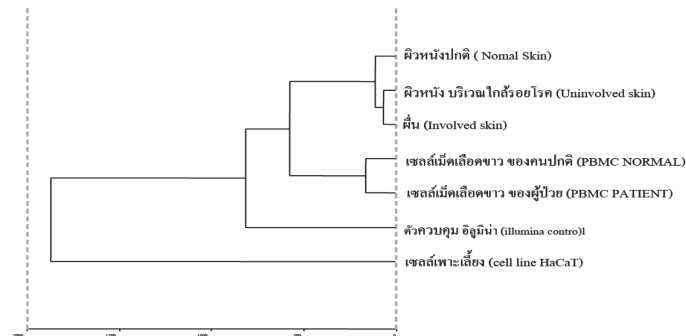
ผล

การแยกกลุ่มตัวอย่างตามลักษณะดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (pattern of methylation)

การทำ methylation microarray สามารถวิเคราะห์ข้อมูลของ 24 ตัวอย่าง ($n=24$) ซึ่งแต่ละตัวอย่างมีตำแหน่งซีพีจี (CpG site) ทั้งหมด 27,578 ตำแหน่ง (หรือจำนวนยีนทั้งหมด 14,495 ยีน) ที่สามารถแสดงสัญญาณ (signal) ตามค่าที่อ่านได้โดยใช้โปรแกรม Genome Studio ซึ่งพบว่าสามารถแบ่งกลุ่มของตัวอย่างตามค่า beta value (β) ทำให้เกิดลักษณะดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (pattern of methylation) ดังนั้นคือ กลุ่มที่เป็นชิ้นเนื้อจะอยู่ใกล้กันเป็นคลัสเตอร์ (Cluster) แตกต่างจากกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาว (PBMC) เซลล์เพาะเลี้ยง (Cell line, HaCaT) และตัวควบคุมของอิลูมินา (Illumine control) จะมีความแตกต่างมากที่สุด ดังแสดงในภาพที่ 2

การแสดงออกของการเกิดภาวะดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) หรือการเกิดดีเอ็นเอดีเมทิลเลชัน (DNA demethylation) (ตารางที่ 1)

ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (*DiffScore*) ของแต่ละตำแหน่งของยีน (CpG site) และรวบรวมเป็นยีนนั้น พบว่าในกลุ่มของชิ้นเนื้อ ก) ผิวหนังคนปกติ (Normal skin) มีความแตกต่างจากผิว (Involved skin) ในจำนวน (CpG sites) 1,293 ซีพีจี (หรือจำนวน 1,019 ยีน) โดยแยกเป็นค่า *DiffScore* < -40 (เกิดกระบวนการ DNA demethylation) จำนวน 861 ซีพีจี และค่า *DiffScore* > 40 (เกิดกระบวนการ DNA methylation) จำนวน



ภาพที่ 2 การจัดกลุ่มตัวอย่าง (Cluster) ของตัวอย่างทั้ง 4 ประเภท ได้แก่ ชิ้นเนื้อเซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์เพาะเลี้ยง และตัวควบคุมอีลูมินา ตามลักษณะการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (pattern of methylation)

432 ซีพจี และระบุเป็นยีนได้เป็นจำนวน 637 ยีน และ 382 ยีน ตามลำดับ ข) ผิวหนังปกติ กับผิวหนังที่ไม่มีรอยโรค (Uninvolved skin) ในจำนวน (CpG sites) 1,072 ซีพจี (หรือจำนวน 804 ยีน) โดยแยกเป็นค่า *DiffScore* < -40 จำนวน 833 ซีพจี และค่า *DiffScore* > 40 จำนวน 239 ซีพจี และระบุเป็นยีนได้ 591 ยีน และ 213 ยีน ตามลำดับ ค) ผิวหนังที่ไม่มีรอยโรค (Uninvolved skin) กับ ผื่น (Involved skin) มีความแตกต่างกันในจำนวน 602 ซีพจี (หรือจำนวน 533 ยีน) แยกเป็นค่า *DiffScore* < -40 จำนวน 317 ซีพจี และค่า *DiffScore* > 40 จำนวน 285 ซีพจี ระบุเป็นยีนได้เป็นจำนวน 276 ยีน และ 257 ยีน ตามลำดับ

สำหรับกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาว พบว่าระหว่างเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนปกติ (PBMC normal) กับเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน (PBMC psoriasis) มีความแตกต่างกันจำนวน 483 ซีพจี (จำนวน 359 ยีน) แยกเป็นค่า *DiffScore* < -40 จำนวน 39 ซีพจี และค่า *DiffScore* > 40 จำนวน 444 ซีพจี ระบุเป็นยีนได้ 32 ยีน และ 327 ยีน ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความสัมพันธ์ของจำนวนซีพจี (CpG site) และจำนวนของยีนทั้งหมดที่ได้จากค่า *DiffScore* โดยการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่าง (ผิวหนังปกติ, Normal skin) (ผื่น, Involved skin, IN) (ผิวหนังที่ไม่มีรอยโรค, Uninvolved skin, UN) และกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาว (PBMC)

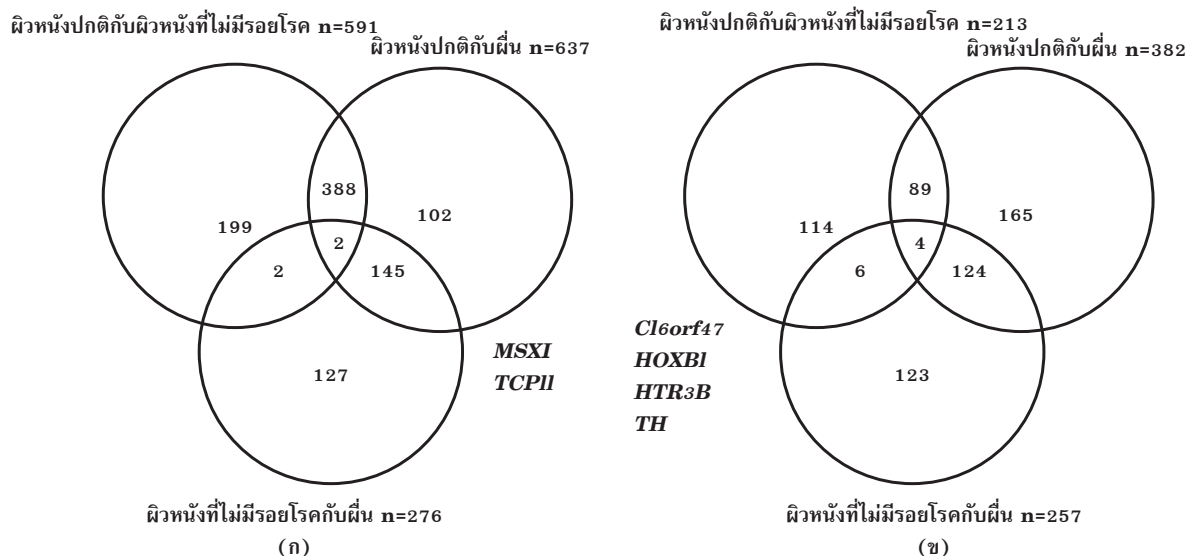
การเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่าง	จำนวนซีพจี (n=27,578)	จำนวนยีน (n= 14,495)	ค่า Difference Score (<i>DiffScore</i>)	
			มากกว่าหรือ เท่ากับ (≥ 40)	น้อยกว่า -40 (< -40)
			จำนวนซีพจี (ยีน)	จำนวนซีพจี (ยีน)
ผิวหนังปกติ กับ ผื่น	1293	1019	432 (382)	861 (637)
ผิวหนังปกติ กับ ผิวหนังที่ไม่มีรอยโรค	1072	804	239 (213)	833 (591)
ผิวหนังที่ไม่มีรอยโรค กับ ผื่น	602	533	285 (257)	317 (276)
เซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน กับ เซลล์เม็ดเลือดขาวคนปกติ*	483	359	444 (327)	39 (32)
เซลล์เพาะเลี้ยง (Cell line, HaCaT)**				

* จำนวนตัวอย่างที่เปรียบเทียบกันอย่างละ 1 ตัวอย่าง

** เป็นเซลล์ลักษณะเฉพาะ ไม่มีการเปรียบเทียบกับกลุ่มตัวอย่าง

ความสัมพันธ์ของยีนระหว่างกลุ่มของผิวหนังคนปกติ (Normal skin), ผิวหนังที่ไม่มีรอยโรค (Uninvolved skin) และผิว (Involved skin)

โดยยีนที่มีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (*DiffScore*) ซึ่งแยกเป็นค่า *DiffScore* < -40 และค่า *DiffScore* > 40 พบว่า ก) ในกลุ่มยีนระหว่างยีนของกลุ่มผิวหนังคนปกติ-ผิว (Normal skin-Involved skin) กับกลุ่มผิวหนังคนปกติ-ผิวหนังที่ไม่มีรอยโรค (Normal-uninvolved skin) มียีนที่เหมือนกันจำนวน 388 ยีน และ 89 ยีน ตามลำดับ ข) ความสัมพันธ์ของยีนระหว่างในกลุ่มยีนของผิวหนังที่ไม่มีรอยโรค-ผิว (Uninvolved skin-Involved skin) กับกลุ่มผิวหนังคนปกติ-ผิว (Normal skin-Involved skin) มียีนที่เหมือนกันจำนวน 145 ยีน และ 124 ยีน ตามลำดับ ค) ความสัมพันธ์ของยีนระหว่างในกลุ่มยีนของผิวหนังที่ไม่มีรอยโรค-ผิว (Uninvolved skin-Involved skin) กับกลุ่มผิวหนังคนปกติ-ผิวหนังที่ไม่มีรอยโรค (Normal skin-Uninvolved skin) มียีนที่เหมือนกันจำนวน 2 ยีน และ 6 ยีน ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 3 นอกจากนี้ยังพบยีนที่เป็น “Hot spot” สำหรับค่า *DiffScore* < -40 (ภาวะ demethylation) จำนวน 2 ยีน คือ *MSX1* และ *TCP11* และสำหรับค่า *DiffScore* > 40 (ภาวะ methylation) 4 ยีน คือ *C16orf47*, *HOXB1*, *HTR3B* และ *TH* โดยพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงอย่างเป็นลำดับ เช่น ยีน *MSX1* มีค่า β Value ลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยเริ่มจากผิวหนังคนปกติ (Normal skin), ผิวหนังที่ไม่มีรอยโรค (Uninvolved skin) และผิว (Involved skin) คือ 0.602 , 0.420 และ 0.251 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2



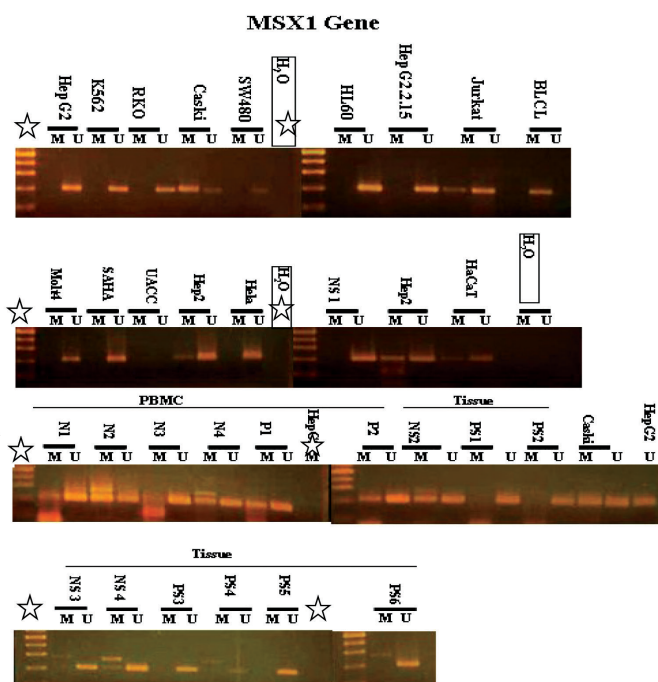
ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์ของยีนทั้งหมด จำนวนตำแหน่งซีพีจี (CpG) ทั้งหมด 27,578 ตำแหน่ง (ของจำนวนยีนทั้งหมด 14,495 ยีน) ระหว่างผิวหนังคนปกติ (Normal skin), ผิวหนังที่ไม่มีรอยโรค (Uninvolved skin) และผิว (Involved skin) ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ค่า *DiffScore*) ซึ่งแยกเป็น ก) ค่า *DiffScore* < -40 (ขบวนการเกิดดีเอ็นเอดีเมทิลเลชัน) และ ข) ค่า *DiffScore* > 40 (ขบวนการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน)

ตารางที่ 2 ยีนที่มีความสำคัญ 6 ยีน และยีนที่มีรายงานที่มีความสัมพันธ์กับโรคสะเก็ดเงิน

SYMBOL	TargetID	ACCESSION	NS.AVG_Beta	US .AVG_Beta	IS.AVG_Beta
<i>MSX1</i>	cg01785568	NT_006051.17	0.6020483	0.4197896	0.2507048
<i>TCP11</i>	cg22407458	NM_018679.2	0.4433122	0.2945935	0.16112
<i>C16orf47</i>	cg17500962	NM_207385.1	0.3640586	0.612873	0.5986091
<i>HOXB1</i>	cg07823492	NM_002144.2	0.5164548	0.8563957	0.9095344
	cg17233506	NM_002144.2	0.2837003	0.4803769	0.6322188
<i>HTR3B</i>	cg06531741	NM_006028.3	0.3813598	0.5289409	0.6747844
<i>TH</i>	cg05912121	NM_199292.1	0.6278027	0.7132202	0.8366116
	cg08573687	NM_199292.1	0.6536191	0.7545237	0.8691378
<i>S100A9</i>	cg16139316	NM_002965.2	0.7513244	0.7351661	0.2919489
<i>BCAP31</i>	cg01910452	NM_005745.6	0.5188954	0.1628981	0.1689605
<i>ID4</i>	cg17252960	NM_001546.2	0.1637356	0.06758781	0.07560308

ยีนที่นำเสนอของโรคสะเก็ดเงิน (DNA methylated of candidate gene for psoriasis)

ยีน *MSX1* ทดสอบด้วยวิธีตรวจดีเอ็นเอเมทิลเลชัน โดย Methylation Specific Primer (MSP) กับ ก) เซลล์เพาะเลี้ยง (Cell line) จำนวน 15 ชนิด ได้แก่ BLCL, RKO, SW480, HL60, HepG2, HepG2.2.1.5, K562, Malt4, SAHA, UACC, HeLa, CaSki, Jurkat, Hep2 และ HaCaT พบว่าเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) (โดยพบแถบ M, methylated form) กับเซลล์เพาะเลี้ยง (Cell line) 4 ชนิด คือ CaSki, Jurkat,



ภาพที่ 4 การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน/ดีเอ็นเอดีเมทิลเลชันของยีน *MSX1* ของเซลล์เพาะเลี้ยง ตัวอย่างชิ้นเนื้อ และตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือด M=methylated form และ U=unmethylated form, เซลล์เพาะเลี้ยง (Cell line) BLCL, RKO, SW480, HL60, HepG2, HepG2.2.1.5, K562, Malt4, SAHA, UACC, HeLa, CaSki, Jurkat, Hep2 และ HaCaT (ผิวหนัง, PS=Involved skin) (ผิวหนังปกติ, NS= Normal skin), PBMC (คนปกติ, N=Normal, ผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน, P=Psoriasis) เหมือนในภาพ ☆DNA marker, PCR product (M=206 bp และ U=ขนาด 199 bp)

Hep2 และ HaCaT ข) ทดสอบกับตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียส (PBMC) จำนวน 6 ตัวอย่าง (คนปกติ, N=Normal, n=4 ตัวอย่าง ผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน, P=Psoriasis, n=2 ตัวอย่าง) พบว่าให้ผลเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันทั้งหมด และ ค) ทดสอบกับตัวอย่างที่เป็นชั้นเนื้อ (tissue) จำนวน 10 ตัวอย่าง (ผิวหนังคนปกติ, NS=Normal skin, n=4 ตัวอย่าง), (ผื่น, PS=Involved skin, n=6 ตัวอย่าง) พบว่าผิวหนังคนปกติเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันจำนวน 3 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 75 ในขณะที่ผื่น (Involved skin) ไม่เกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันทั้งหมดคิดเป็นร้อยละ 0 ดังแสดงในภาพที่ 4 และตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน/ดีเอ็นเอดีเมทิลเลชันของยีน *MSX1* ของเซลล์เพาะเลี้ยง ตัวอย่างชั้นเนื้อ และตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดขาว

ชนิดตัวอย่าง	การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (ร้อยละ)	
เซลล์เพาะเลี้ยง (n=15)	1. กลุ่มเซลล์เยื่อบุ (Epithelial) n=9 (3) ได้แก่ RKO, SW480, HepG2, HepG2.2.1.5, SAHA, UACC, HeLa, CaSki*, Hep2* และ HaCaT* ร้อยละ 33.3	2. กลุ่มเซลล์เม็ดเลือด (Hematopoietic) n=6 (1) ได้แก่ BLCL, HL60, K562, Malt4, SAHA และ Jurkat* ร้อยละ 16.6
เซลล์เม็ดเลือดขาว (n=6)	1. คนปกติ (Normal) n=4 (4) ร้อยละ 100	2. ผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน (Psoriasis) n=2 (2) ร้อยละ 100
เนื้อเยื่อ (n=10)	1. คนปกติ (Normal) n=4 (3) ร้อยละ 75	2. ผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน (Psoriasis) n=6 (0) ร้อยละ 0

*แสดงตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยงที่เกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน

วิจารณ์

การศึกษาดีเอ็นเอเมทิลเลชัน โดยวิธีเมทิลเลชันไมโครอะเรย์

ข้อมูลตามลักษณะดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (pattern of methylation) ที่แบ่งเป็นกลุ่มตัวอย่าง (Cluster) เป็นการแสดงถึงการเกิดเมทิลเลชันที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งซีพีจีในส่วนทั้งที่อยู่บนโปรโมเตอร์ หรือส่วนนอกของโปรโมเตอร์ของยีนนั้น ๆ ตามแต่ละชนิดของตัวอย่าง ซึ่งบ่งบอกถึงการเป็น tissue-specific gene ในเซลล์แต่ละชนิดได้เป็นอย่างดี⁽¹²⁾ และการศึกษาครั้งนี้เป็นการเริ่มต้นเพื่อให้ได้กลุ่มยีนที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งข้อมูลที่สำคัญและสอดคล้องกับยีนเหล่านี้ที่มีการเปลี่ยนแปลงระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันในโรคสะเก็ดเงิน เช่น *SHP-1* (*PTP1C*, *HCP*, *SH-PTP1*, *PTPN6*)⁽¹¹⁾ *p15*, *p16 ink* (*CDKN2A*, *MTS1*, *TP16*, *ARF*), *S100A9*, *PDCD5*, *TIMP2*⁽²⁰⁾ *SFRP* เกี่ยวข้องกับ *Wnt pathway*⁽²¹⁾ เป็นต้น

วิธีเมทิลเลชันไมโครอะเรย์สามารถค้นพบกลุ่มของยีนที่มีการเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่สำคัญ โดยเมื่อหาความสัมพันธ์ของยีนระหว่าง Normal skin, Uninvolved และ Involved skin ในกลุ่มของยีนที่ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (*DiffScore*) ซึ่งแยกเป็น *DiffScore* < -40 และ *DiffScore* > 40 พบว่าในกลุ่มยีนของ Normal-uninvolved และ Normal-involved มียีนที่เหมือนกันจำนวน 388 ยีน และ 89 ยีน ตามลำดับ ซึ่งยีนกลุ่มนี้น่าจะเป็นยีนที่มีความสำคัญต่อการเกิดโรคของผู้ป่วย หรืออาจเป็นยีนที่มีความผิดปกติทำให้เกิดโรคสะเก็ดเงิน

โดยผ่าน Wnt signaling pathway, Infergin signaling pathway และ Cadherin Signaling pathway เป็นต้น⁽²²⁾ เช่น (*BCAP31*, *DXS9879E*, *EFNB1*, *ELK1*, *EMD*, *FLJ44112*, *GRIA3*, *IL13RA1*, *MSX1*, *OTUD5*, *PHF8*, *PLP2*, *RPL10*, *S100A9*, *SLC9A6*, *TSC22D3*, *WDR45*, *RAB33A*, *RPGR*, *CXorf40A* และ *CXorf34*) และ (*GPR81*, *HAK*, *HOXB1*, *HOXB3*, *HTR3B*, *IL11RA*, *IL17RC*, *ITGBL1*, *KCTD4*, *KIAA0240*, *KSP37*, *LGALS1*, *NUMBL*, *PHACTR3*, *PRX*, *RDH5*, *RHOJ*, *SLC7A11*, *SORBS3*, *SPRR1A* และ *TH*) นอกจากนี้แสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงตั้งแต่ระดับปกติจนถึงเกิดเป็นโรค โดยมีรายงานที่สอดคล้องกับยีน *ID4* (inhibitor of differentiation 4) ที่พบว่าการแสดงออกของโปรตีนลดลงในผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินในชั้นของคอร์เนียม ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดพาราเคอราโตซิส⁽²³⁾ และยีน *BCAP 31* (B-cell receptor associated protein 31) ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคในขบวนการดีเอ็นเอดีเมทิลเลชัน เป็นต้น⁽²⁴⁾ และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างในกลุ่มยีนของ uninvolved-involved skin และ Normal-involved มียีนที่เหมือนกันจำนวน 145 ยีน และ 124 ยีน ตามลำดับ (*ABRA*, *ACADVL*, *ACOT11*, *ACOX2*, *ACVR1*, *ADAMTS13*, *BIK*, *BPIL1*, *BTBD4*, *C14orf68*, *C1orf42*, *C1orf52*, *C1orf61*, *GDF10*, *GDPD5*, *NNMT*, *NOX4*, *NPR2X*) และ (*FCGR3B*, *FFAR2*, *FGR*, *P2RY2*, *P53AIP1*, *PADI1*, *LAPTM5*, *LAT2* และ *LCE1B* เป็นต้น) สันนิษฐานว่ายีนกลุ่มนี้น่าจะเป็นยีนอยู่ในภาวะก่อนจะเกิดโรคสะเก็ดเงิน (prepsoriatic state) ซึ่งความผิดปกติขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายชนิด เช่น การถูกกระตุ้นด้วย infiltrating CD3+T-cells และ inflammatory DCs ทำให้เพิ่มการอักเสบมากขึ้น ยีนเหล่านี้อาจมีการแสดงออกมากขึ้น⁽²⁵⁾ นอกจากนี้ยีนกลุ่มนี้มีความสัมพันธ์ผ่านทาง Cadherin signaling pathway, Endothelin signaling pathway, PDGF signaling pathway⁽²²⁾ เป็นต้น

สำหรับค้นพบยีนที่มีภาวะดีเอ็นเอดีเมทิลเลชัน/ดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่อาจมีความสำคัญต่อการเกิดโรคสะเก็ดเงิน (Hot spot) ทั้งยีน *MSX1*, *TCP11*, *C16orf47*, *HOXB1*, *HTR3B* และ *TH* นั้น อาจนำมาใช้เป็น biomarker สำหรับโรคสะเก็ดเงินต่อไป ยีนนำเสนอ (candidate gene) *MSX1* (msh homeo box 1) เป็นยีนที่อยู่บนโครโมโซม p16.2 มีความสำคัญกับการแบ่งตัวและการเจริญเติบโตของเซลล์ (cell proliferation and differentiation) และ ectodermal organ morphogenesis โดยเฉพาะเซลล์ประสาท กระดูกและฟัน⁽²⁶⁾ มีการแสดงออกของยีน *MSX1* บริเวณที่มี tissue-tissue interaction และมีรายงาน mutation ของยีนนี้สัมพันธ์กับการเกิดโรคทางระบบประสาท โรค craniofacial disorders ความผิดปกติของฟัน⁽¹⁶⁾ และการลดการแสดงออกของ *MSX1* ในโรค osteonecrosis of jaw นอกจากนี้ยังมีรายงานการเกิด *MSX1* hypermethylation สัมพันธ์กับโรค childhood lymphoblastic leukemia⁽²⁷⁾ และสำหรับในการศึกษานี้พบว่าผื่นของผู้ป่วยโรคสะเก็ดมีการเกิดกระบวนการดีเอ็นเอดีเมทิลเลชันของยีน *MSX1* จึงอาจเป็นไปได้ว่าการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน *MSX1* มีความสำคัญกับการแบ่งตัวและการเจริญเติบโตที่ผิดปกติของเซลล์หนังกำพร้า (keratinocyte) ของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน อย่างไรก็ตามยังคงต้องการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องของการแสดงออกของระดับอาร์เอ็นเอ (RNA) และโปรตีน เพื่อทราบถึงบทบาทที่ชัดเจนของยีนนี้ในโรคสะเก็ดเงินต่อไป สำหรับการทดสอบกับกลุ่มเซลล์เพาะเลี้ยงทั้งชนิดกลุ่มเซลล์เยื่อและกลุ่มเซลล์เม็ดเลือด ให้ผลลัพธ์การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ใกล้เคียงกัน (ร้อยละ 33.3 กับร้อยละ 16.6) จึงยังไม่สามารถแยกความจำเพาะของยีนในการเป็น tissue specific gene ได้ การศึกษาโดยวิธีเมทิลเลชันไมโครอาร์เรย์มีข้อจำกัดเนื่องจากมีราคาแพง เทคนิคยุ่งยาก ต้องใช้ความชำนาญ และความเชี่ยวชาญอย่างมาก ทำให้สามารถศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยและคนปกติได้จำนวนจำกัด ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมในกลุ่มผู้ป่วยและคนปกติให้มีจำนวนมากขึ้นเพื่อให้สามารถมีข้อมูลมากขึ้นนำไปใช้เป็น biomarker ได้อย่างแท้จริง

สรุป

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงขบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) ในโรคสะเก็ดเงินแบบครอบคลุมยีนทั้งหมดโดยวิธี high through-put methylation microarray ซึ่งผลการศึกษา พบว่าวิธีนี้มีความน่าสนใจในการทำนายการเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีนต่างๆ ที่ให้ผลสอดคล้องกับยีนที่เคยมีการรายงาน เช่น ยีน *ID4* เป็นต้น และการศึกษาแบบครอบคลุมยีนทั้งหมดนี้ ยังทำให้พบกลุ่มของยีนที่มีการเปลี่ยนแปลงเกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของโรคสะเก็ดเงิน และค้นพบยีนใหม่ที่น่าสนใจที่เป็น Hot spot ของโรค นอกจากนี้ความสัมพันธ์ของยีนในแต่ละกลุ่มที่มีความแตกต่างกันหรือยีนที่จำเพาะ ยังคงจำเป็นต้องเพิ่มเติมศึกษาในเชิงลึกเพื่อให้ทราบบทบาทและหน้าที่ของกลุ่มยีนหรือยีนที่จำเพาะ ซึ่งนำไปสู่ความเข้าใจในพยาธิกำเนิดที่ชัดเจนมากขึ้น และอาจพัฒนาต่อไปสู่การรักษาแบบใหม่ๆ ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอบคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช) สนับสนุนในโครงการวิจัย รหัสโครงการ RES5309830006 ดร. สุรศักดิ์ อยู่ยงสถิต วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

เอกสารอ้างอิง

1. Nickoloff BJ, Nestle FO. Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. *J Clin Invest* 2004; 113(12): 1664-75.
2. Christophers E. Psoriasis--epidemiology and clinical spectrum. *Clin Exp Dermatol* 2001; 26(4): 314-20.
3. Raychaudhuri SP, Farber EM. The prevalence of psoriasis in the world. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2001; 15(1): 16-7.
4. Bowcock AM, Krueger JG. Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. *Nat Rev Immunol* 2005; 5(9): 699-711.
5. Schön MP, Boehncke WH. Psoriasis. *N Engl J Med* 2005; 352(18): 1899-912.
6. Nickoloff BJ, Qin JZ, Nestle FO. Immunopathogenesis of psoriasis. *Clin Rev Allergy Immunol* 2007; 33(1-2): 45-56.
7. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004; 429(6990): 457-63.
8. Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet* 2005; 6(8): 597-610.
9. Rodenhiser D, Mann M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CMAJ* 2006; 174(3): 341-8.
10. Ruchusatsawat K, Wongpiyabovorn J, Shuangshoti S, Hirankarn N, Mutirangura A. SHP-1 promoter 2 methylation in normal epithelial tissues and demethylation in psoriasis. *J Mol Med (Berl)* 2006; 84(2): 175-82.

11. Brown SE, Fraga MF, Weaver IC, Berdasco M, Szyf M. Variations in DNA methylation patterns during the cell cycle of HeLa cells. *Epigenetics* 2007; 2(1): 54–65.
12. Shen L, Kondo Y, Guo Y, Zhang J, Zhang L, Ahmed S, et al. Genome-wide profiling of DNA methylation reveals a class of normally methylated CpG island promoters. *PLoS Genet* 2007; 3(10): 2023–36.
13. Bock C, Paulsen M, Tierling S, Mikeska T, Lengauer T, Walter J. CpG island methylation in human lymphocytes is highly correlated with DNA sequence, repeats, and predicted DNA structure. *PLoS Genet* 2006; 2(3): e26. (10 pages).
14. Yu YP, Paranjpe S, Nelson J, Finkelstein S, Ren B, Kokkinakis D, et al. High throughput screening of methylation status of genes in prostate cancer using an oligonucleotide methylation array. *Carcinogenesis* 2005; 26(2): 471–9.
15. Rauch T, Li H, Wu X, Pfeifer GP. MIRA-assisted microarray analysis, a new technology for the determination of DNA methylation patterns, identifies frequent methylation of homeodomain-containing genes in lung cancer cells. *Cancer Res* 2006; 66(16): 7939–47.
16. Miletich I, Sharpe PT. Normal and abnormal dental development. *Hum Mol Genet* 2003; 12 Spec No 1: R69–73.
17. Wanichnopparat W, Suwanwongse K, Pin-on P, Apornthewan C, Mutirangura A. Genes associated with the cis-regulatory functions of intragenic LINE-1 elements. *BMC Genomics* 2013; 14(1): 205.
18. Weisenberger DJ, Trinh BN, Campan M, Sharma S, Long TI, Ananthnarayan S, et al. DNA methylation analysis by digital bisulfite genomic sequencing and digital MethyLight. *Nucleic Acids Res* 2008; 36(14): 4689–98.
19. Naumova OY, Lee M, Koposov R, Szyf M, Dozier M, Grigorenko EL. Differential patterns of whole-genome DNA methylation in institutionalized children and children raised by their biological parents. *Dev Psychopathol* 2012; 24(1): 143–55.
20. Zhang P, Zhao M, Liang G, Yin G, Huang D, Su F, et al. Whole-genome DNA methylation in skin lesions from patients with psoriasis vulgaris. *J Autoimmun* 2013; 41: 17–24.
21. Bai J, Liu Z, Xu Z, Ke F, Zhang L, Zhu H, et al. Epigenetic downregulation of SFRP4 contributes to epidermal hyperplasia in psoriasis. *J Immunol* 2015; 194(9): 4185–98.
22. Verma D, Ekman AK, Bivik Eding C, Enerbäck C. Genome-wide DNA methylation profiling identifies differential methylation in uninvolved psoriatic epidermis. *J Invest Dermatol* 2018; 138(5): 1088–93.
23. Ruchusatsawat K, Wongpiyabovorn J, Protjaroen P, Chaipipat M, Shuangshoti S, Thorner PS, et al. Parakeratosis in skin is associated with loss of inhibitor of differentiation 4 via promoter methylation. *Hum Pathol* 2011; 42(12): 1878–87.

24. Ruchusatsawat K, Thiemsing L, Mutirangura A, Wongpiyabovorn J. BCAP 31 expression and promoter demethylation in psoriasis. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2017; 35(2): 86-90.
25. Johnson-Huang LM, Suárez-Fariñas M, Pierson KC, Fuentes-Duculan J, Cueto I, Lentini T, et al. A single intradermal injection of IFN- γ induces an inflammatory state in both non-lesional psoriatic and healthy skin. *J Invest Dermatol* 2012; 132(4): 1177-87.
26. Alappat S, Zhang ZY, Chen YP. Msx homeobox gene family and craniofacial development. *Cell Res* 2003; 13(6): 429-42.
27. Dunwell TL, Hesson LB, Pavlova TV, Zabarovska V, Kashuba VI, Catchpoole D, et al. Epigenetic analysis of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Epigenetics* 2009; 4(3): 185-93.

Global DNA Methylated Gene of Involved Skin and Uninvolved Skin of Psoriasis Compared with Normal Skin by Methylation Microarray

Kriangsak Ruchusatsawat¹ Laddawan Thiemsing¹ Phantipa Protjaroen² and Jongkonnee Wongpiyabovorn²

¹National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Tiwanon Road, Nonthaburi 11000

²Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Rama 4 Road, Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand

ABSTRACT Psoriasis is approximately 1–3% of the population worldwide. Etiology of the disease is still unclear. Recently, epigenetic phenomena have also been implicated in the pathogenesis of psoriasis. We investigated DNA methylation by methylation microarray in tissue from 6 involved skins and uninvolved skins of chronic plaque type psoriasis patients compared to 6 normal skins from healthy controls. There are 6 candidate genes, *MSX1*, *TCP11*, *C16orf47*, *HOXB1*, *HTR3B* and *TH*. *MSX1* gene was selected from methylation microarray data and was analyzed DNA methylation correlated with genes expression in keratinocytes and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) compared between psoriasis and normal controls, using methylation specific primer (MSP). DNA methylation occurred in three of four samples of normal skins, accounting for 75%. Whereas DNA methylation from 6 of all 6 involved skin samples were represented 0%. In conclusion, the present study is the first study using high through-put technique (methylation microarray) to investigate DNA methylation in psoriasis. The result of methylation microarray could indicate the significant the candidate genes for further studying in psoriasis. Moreover, this study demonstrated DNA methylation plays an important role in pathogenesis and course of psoriasis

Keywords: Psoriasis, DNA methylation, Methylation microarray, *MSX1*

การป้องกันควบคุมยุงพาหะโรคไข้เลือดออก แบบบูรณาการในพื้นที่เสี่ยงสูงของจังหวัดตรัง

สุวรรณี ทรัพย์เจริญ¹ โชติกา แก่นอินทร์² วารุณี เทพมณีรัตน์³ ขวัญกมล ไกรสุทธิ⁴ จริยาภรณ์ ใบกอดี⁵
และเกรียงศักดิ์ ฤทธาศาสตร์⁶

¹ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อำเภอเมือง ตรัง 92000

²สำนักงานสาธารณสุขอำเภอเมืองตรัง อำเภอเมือง ตรัง 92000

³โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพประจำตำบลบ้านโพธิ์ อำเภอเมือง ตรัง 92000

⁴โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพประจำตำบลนาท่ามเหนือ อำเภอเมือง ตรัง 92000

⁵ศูนย์ควบคุมโรคติดต่อฯ โดยแมลงที่ 12.3 ตรัง อำเภอเมือง ตรัง 92000

⁶สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อำเภอเมือง นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ โรคไข้เลือดออกยังคงเป็นปัญหาทางสาธารณสุขในภาคใต้ โดยมียุงลายเป็นพาหะ อุบัติการณ์โรคดังกล่าวในจังหวัดตรังยังคงมีแนวโน้มสูงโดยเฉพาะอำเภอเมือง การควบคุมและป้องกันยุงพาหะอย่างมีประสิทธิภาพจะช่วยลดจำนวนผู้ป่วยไข้เลือดออก แต่ปัจจุบันผลการควบคุมยังไม่ดีเท่าที่ควร กับดักลิโอแทรปและซีโอไลต์เป็นอีกหนึ่งเครื่องมือจะช่วยกำจัดลูกน้ำยุงลาย การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินการควบคุมยุงพาหะไข้เลือดออกโดยใช้กับดักลิโอแทรปและซีโอไลต์ในพื้นที่เสี่ยงของอำเภอเมืองตรัง ได้แก่ ตำบลบ้านโพธิ์และนาท่ามเหนือ ระหว่างเดือนมิถุนายนถึงสิงหาคม 2563 ดำเนินการวางกับดักในหมู่บ้านทดลองหมู่บ้านละ 100 หลังคาเรือน สุ่มตรวจวัดดัชนีลูกน้ำยุงลาย (CI, HI) และตรวจนับจำนวนไข่ยุงลาย เทียบกับหมู่บ้านเปรียบเทียบซึ่งใช้มาตรการควบคุมเดิม หลังวางกับดักลิโอแทรปนาน 2 เดือน พบค่า CI และ HI ของหมู่บ้านทดลองในตำบลบ้านโพธิ์ลดลงจากร้อยละ 28.29 และ 87 เป็นร้อยละ 12.88 และ 47 ตามลำดับ มีจำนวนไข่ยุงลายในกับดักรวม 64,359 ฟอง และอัตราการพบไข่ยุงลายในกับดักร้อยละ 93.25 ขณะที่ตำบลนาท่ามเหนือ หมู่บ้านทดลองมีค่า CI และ HI เปลี่ยนแปลงจากร้อยละ 6.58 และ 33 เป็นร้อยละ 3.50 และ 41 ตามลำดับ มีจำนวนไข่ยุงลายในกับดักรวม 53,125 ฟอง และอัตราการพบไข่ยุงลายในกับดักร้อยละ 92.79 ทั้งนี้ตำบลบ้านโพธิ์พบค่าเฉลี่ยของจำนวนไข่ยุงลายบริเวณในและนอกบ้านแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.03$) และไม่พบผู้ป่วยไข้เลือดออกหลังจากวางกับดัก 1 เดือน กับดักลิโอแทรปและซีโอไลต์มีบทบาทสำคัญในการกำจัดลูกน้ำยุงลาย อาจจะนำไปสู่การใช้เป็นมาตรการเสริมเพื่อช่วยลดประชากรยุงลายและจำนวนผู้ป่วยไข้เลือดออกในอนาคต

คำสำคัญ: กับดักไข่ยุง, ลิโอแทรป, ยุงลาย, ไข้เลือดออก, จังหวัดตรัง

Corresponding author E-mail: suwandee.s@dmasc.mail.go.th

Received: 19 January 2021

Revised: 19 February 2021

Accepted: 12 March 2021

บทนำ

โรคไข้เลือดออกถือเป็นอีกหนึ่งปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุข โดยมียุงลายเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสเดงกี มาสู่คน จากการสำรวจในประเทศไทย พบยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) เป็นพาหะนำโรคหลัก ส่วนยุงลายสวน (*Aedes albopictus*) เป็นพาหะรอง^(1, 2, 3) ทั้งนี้พบการระบาดของโรคไข้เลือดออกในประเทศไทยเป็นประจำทุกปีและมีอุบัติการณ์สูงขึ้นเป็นลำดับ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเขตพื้นที่ภาคใต้^(4, 5, 6) ซึ่งมีฝนตกชุกตลอดปี ถึงแม้ว่าโรคไข้เลือดออกมักมีการระบาดสูงในช่วงฤดูฝน แต่ยังสามารถพบผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกในช่วงฤดูอื่นได้

กรมควบคุมโรคได้พยากรณ์โรคไข้เลือดออกในปี 2563 โดยใช้วิธีการทางสถิติแบบอนุกรมเวลาด้วย ARIMA model จากข้อมูลจำนวนผู้ป่วย 10 ปีย้อนหลัง (ปี 2553-2562) ผลการวิเคราะห์คาดว่าในปี 2563 จะมีผู้ป่วยโรคไข้เลือดออก 140,000 รายใกล้เคียงกับการระบาดใหญ่ในปี 2558⁽⁷⁾ ทุกพื้นที่จึงควรดำเนินการตามมาตรการควบคุมและป้องกันโรคอย่างเข้มข้นในพื้นที่เสี่ยงสูง ในปี 2563 คาดว่าจะมีพื้นที่เสี่ยงสูงต่อการระบาด 224 อำเภอ ใน 60 จังหวัด จังหวัดตรังมีอำเภอที่เป็นพื้นที่เสี่ยงสูง 1 อำเภอ ได้แก่ อำเภอเมืองตรัง⁽⁷⁾ จากข้อมูลของกองโรคติดต่อมาโดยแมลง กรมควบคุมโรค รายงานสถานการณ์โรคไข้เลือดออกระหว่างวันที่ 1 มกราคม ถึง 28 เมษายน 2563 พบว่าภาคใต้มีอัตราป่วยของผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกสูงถึง 15.68 ต่อแสนประชากร และมีอัตราป่วยตายร้อยละ 0.14 เมื่อศึกษาในรายละเอียดของข้อมูลโดยแยกตามเขต พบว่าเขตสุขภาพที่ 12 ประกอบด้วย 7 จังหวัด ได้แก่ สงขลา สตูล ตรัง พัทลุง ปัตตานี ยะลา และนราธิวาส มีอัตราป่วยของผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกสูงถึง 16.75 ต่อแสนประชากร และมีอัตราป่วยตายร้อยละ 0.24⁽⁸⁾ ทั้งนี้การลดปริมาณยุงลายซึ่งเป็นพาหะจึงมีส่วนช่วยลดอุบัติการณ์โรคดังกล่าวได้ การจัดการเพื่อควบคุมปริมาณยุงลายในปัจจุบันจะใช้วิธีขัดล้างขอบภาชนะที่บรรจุน้ำเพื่อให้ไข่ของยุงลายที่เกาะอยู่หลุดลอกออกไป ส่งผลให้ไม่สามารถฟักออกมาได้ ขณะที่การกำจัดระยะตัวอ่อนหรือลูกน้ำ จะใช้ 3 วิธี ได้แก่ 1) วิธีทางกายภาพ คือ การเก็บ กลบ ฝัง เผา ปิดฝาภาชนะ และเปลี่ยนน้ำทุก ๆ 7 วัน 2) วิธีทางชีวภาพ คือ การเลี้ยงปลาที่กินลูกน้ำเป็นอาหาร 3) วิธีทางเคมี คือ การใช้สารเคมีที่มีฟอส (Temephos)⁽⁹⁾ ชนิดเคลือบบนเม็ดทรายเพื่อกำจัดลูกน้ำ และการฉีดพ่นหมอกควันเพื่อกำจัดตัวเต็มวัย

การดำเนินการควบคุมตามมาตรการต่างๆ ข้างต้นที่ผ่านมายังประสบผลสำเร็จในการป้องกันโรคไข้เลือดออกได้ไม่เต็มที่เท่าที่ควร ปัจจุบันจึงมีวิธีการควบคุมปริมาณยุงลายโดยใช้กับดักไข่ยุงลาย^(3, 10) ซึ่งเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถลดจำนวนยุงลายได้ กับดักไข่ยุงลายลิโอแทรป (Lethal Ovitrap: LeO-Trap) เป็นอีกหนึ่งนวัตกรรมของไทยจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์⁽¹¹⁾ มีรูปร่างคล้ายโถงขนาดเล็กสีดำ พื้นผิวภายในเคลือบด้วยสารสกัดจากหอยลายผสมสารสังเคราะห์ (Carpet Shell Plus) เพื่อช่วยดึงดูดให้ยุงลายมาวางไข่ในกับดักและลูกน้ำจะถูกกำจัดด้วยซีโอไลท์ การกำจัดลูกน้ำยุงลายด้วยวิธีนี้จะสามารถกำจัดยุงได้ปริมาณที่มากกว่าการปล่อยให้ยุงค้นหาภาชนะและตำแหน่งวางไข่เอง ซึ่งผู้อาศัยในบ้านอาจจะสังเกตไม่พบ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ดำเนินการทดสอบกับดักลิโอแทรปในห้องปฏิบัติการ ผลการทดสอบ แสดงให้เห็นว่ากับดักลิโอแทรปมีอัตราการดึงดูดยุงลายให้มาวางไข่ได้มากกว่าภาชนะถ้วยสีดำที่ขนาดใกล้เคียงกันประมาณ 3 เท่า^(9, 12) และจากการทดสอบภาคสนามที่จังหวัดชลบุรีภายในระยะเวลา 3 เดือน กับดักลิโอแทรปช่วยลดความชุกชุมของยุงลายลงถึงประมาณร้อยละ 92⁽¹²⁾ สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 12 สงขลา ดำเนินการทดสอบประสิทธิภาพของกับดักลิโอแทรปในพื้นที่ระบาดของไข้เลือดออกในจังหวัดสงขลา ผลการทดสอบ พบว่าค่าดัชนีลูกน้ำยุงลาย (House Index) ลดลงหลังวางทิ้งไว้ 4 วัน จากร้อยละ 58.33 เหลือร้อยละ 20.37 ผลการศึกษาในพื้นที่สงขลาแสดงให้เห็นว่ากับดักลิโอแทรปมีประสิทธิภาพในการลดความหนาแน่นของยุงลาย⁽¹¹⁾

การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินผลการควบคุมยุงพาหะโดยใช้นวัตกรรมกับดักลิโอแทรปและซีโอไลท์ไปใช้กำจัดลูกน้ำยุงลายเพื่อช่วยลดปริมาณยุงลายซึ่งเป็นพาหะนำโรคไข้เลือดออกอันนำไปสู่การป้องกันควบคุมโรคแบบบูรณาการในพื้นที่เสี่ยงของจังหวัดตรัง

วัสดุและวิธีการ

การคัดเลือกพื้นที่ดำเนินการ

คัดเลือกพื้นที่เสี่ยงสูงต่อการระบาดของโรคไข้เลือดออกตามรายงานพยากรณ์โรคไข้เลือดออกปี 2563 ของกองโรคติดต่อมาโดยแมลง กรมควบคุมโรค ซึ่งจังหวัดตรังมีพื้นที่ที่จัดอยู่ในระดับเสี่ยงสูง 1 อำเภอ ได้แก่ อำเภอเมืองตรัง⁽⁷⁾ เลือกหมู่บ้านเสี่ยงสูงในอำเภอเมืองตรังจำนวน 2 หมู่บ้าน โดยพิจารณาจากรายงานอัตราป่วยที่สูงในเขตอำเภอเมือง จังหวัดตรัง ระหว่างเดือนมกราคม 2562 ถึงพฤษภาคม 2563 ได้แก่ หมู่ที่ 3 ตำบลบ้านโพธิ์ และหมู่ที่ 2 ตำบลนาท่ามเหนือ หมู่บ้านละ 100 หลังคาเรือน และคัดเลือกหมู่บ้านเปรียบเทียบที่มีสภาพแวดล้อมใกล้เคียงกันจำนวน 2 หมู่บ้าน หมู่บ้านละ 100 หลังคาเรือน ได้แก่ หมู่ที่ 1 ตำบลบ้านโพธิ์ และหมู่ที่ 4 ตำบลนาท่ามเหนือ โดยทำการศึกษาในช่วงเดือนมิถุนายนถึงสิงหาคม 2563

ข้อมูลพื้นฐานโดยภาพรวมของหมู่บ้านที่เข้าร่วมโครงการ มีดังนี้ ตำบลบ้านโพธิ์ หมู่ที่ 3 ซึ่งเป็นกลุ่มทดลอง มีจำนวน 535 หลังคาเรือน จำนวนประชากร 1,697 คน และจำนวนอาสาสมัครสาธารณสุขประจำหมู่บ้าน (อสม.) 24 คน ส่วนกลุ่มเปรียบเทียบ คือ หมู่ที่ 1 มีจำนวน 535 หลังคาเรือน จำนวนประชากร 1,687 คน และจำนวน อสม. 23 คน ขณะที่ตำบลนาท่ามเหนือ กลุ่มทดลอง คือ หมู่ที่ 2 มีจำนวน 367 หลังคาเรือน จำนวนประชากร 1,257 คน และจำนวน อสม. 19 คน ส่วนกลุ่มเปรียบเทียบ คือ หมู่ที่ 4 มีจำนวน 375 หลังคาเรือน จำนวนประชากร 983 คน และจำนวน อสม. 19 คน

วิธีการศึกษา

อสม. แต่ละหมู่บ้านออกสำรวจความชุกของลูกน้ำยุงลายในพื้นที่ดำเนินการทั้ง 4 หมู่บ้าน ก่อนเริ่มดำเนินการ วางกับดักยุงลายสี่เหลี่ยมผืนผ้า ใช้เวลาในการสำรวจ 3-5 วัน โดยใช้แบบสำรวจของกรมควบคุมโรค ซึ่งจะใช้ไฟฉายส่องสำรวจดูการเคลื่อนไหวของลูกน้ำในภาชนะที่มีน้ำขังทั้งในบ้านและบริเวณรอบบ้านทั้งหมด คำนวณค่าดัชนีความชุกของลูกน้ำยุงลาย ได้แก่ House Index (HI) เป็นดัชนีแสดงร้อยละของจำนวนครัวเรือนที่พบแหล่งเพาะพันธุ์ยุงลาย ทำให้ทราบโอกาสเสี่ยงต่อการระบาดของโรคไข้เลือดออกในแต่ละพื้นที่ และ Container Index (CI) วัดจากจำนวนภาชนะ เป็นดัชนีแสดงร้อยละของจำนวนแหล่งเพาะพันธุ์ยุงลาย ซึ่งมีประโยชน์ทางด้านระบาดวิทยา จากนั้นจึงนำกับดักยุงลายที่ใส่แผ่นฟองน้ำพันรอบด้านในกับดักไปวางในพื้นที่เป้าหมาย 2 หมู่บ้าน คือ หมู่ที่ 3 ตำบลบ้านโพธิ์ และหมู่ที่ 2 ตำบลนาท่ามเหนือ หมู่บ้านละ 100 หลังคาเรือน จำนวนบ้านละ 4 กับดักรวมใช้กับดักทั้งหมด 800 กับดัก โดยวางในตำแหน่งที่ยุงลายมักมาเกาะในบริเวณนอกบ้านจำนวน 2 กับดัก และในบ้านจำนวน 2 กับดัก หลังจากครบระยะเวลา 1 เดือน และ 2 เดือน อสม. จะออกสำรวจความชุกของลูกน้ำยุงลายใส่เอชไอจีจัดลูกน้ำยุงลายในภาชนะขังน้ำ และเก็บแผ่นฟองน้ำนำส่งมายังศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง เพื่อตรวจนับจำนวนไข่ยุงลายโดยใช้แว่นขยายกำลังขยาย 3 เท่า

การเตรียมกับดักสี่เหลี่ยมผืนผ้า

เปิดฝากับดักแล้วเติมน้ำสะอาดลงไปโดยให้ระดับน้ำต่ำกว่าขอบบนของรูน้ำล้นประมาณครึ่งนิ้ว จากนั้นใส่เอชไอจีจัดลูกน้ำยุงลายลงในกับดักประมาณครึ่งซันชา

การวิเคราะห์ข้อมูล ข้อมูลที่ได้จะถูกนำมาวิเคราะห์ผลหาค่าดัชนีชี้วัดต่าง ๆ ดังนี้

1. ค่าดัชนีความชุกของลูกน้ำยุงลาย

$$\text{Container Index (CI)} = \frac{\text{จำนวนภาชนะที่พบลูกน้ำยุงลาย}}{\text{จำนวนภาชนะที่สำรวจทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{House Index (HI)} = \frac{\text{จำนวนบ้านที่พบลูกน้ำยุงลาย}}{\text{จำนวนบ้านที่สำรวจทั้งหมด}} \times 100$$

$$2. \text{ อัตราการพบไข่ยุงลาย} = \frac{\text{จำนวนก้นดักที่มีไข่ยุงลาย}}{\text{จำนวนก้นดักที่มีทั้งหมด}} \times 100$$

$$3. \text{ ปริมาณไข่ยุงลายต่อก้นดัก} = \frac{\text{จำนวนไข่ยุงลาย}}{\text{จำนวนก้นดักที่พบไข่ยุงลาย}}$$

$$4. \text{ จำนวนยุงลายที่ถูกกำจัด} = \frac{\text{จำนวนไข่ยุงลาย}}{2} \times 500^{(13)}$$

(เนื่องจากยุงตัวเมีย 1 ตัว สามารถวางไข่ได้ประมาณ 500 ฟอง โดยลูกยุงที่เกิดขึ้นใหม่จะเป็นยุงเพศเมียครึ่งหนึ่ง ซึ่งสามารถดูดเลือดคนและแพร่เชื้อไข้เลือดออกต่อไปได้)

การเปรียบเทียบจำนวนไข่ยุงลายบริเวณในบ้านและนอกบ้านจะใช้การทดสอบด้วยสถิติ t-test โดยกำหนดระดับนัยสำคัญที่ $\alpha = 0.05$

ผล

การสำรวจค่าดัชนีความชุกของลูกน้ำยุงลาย

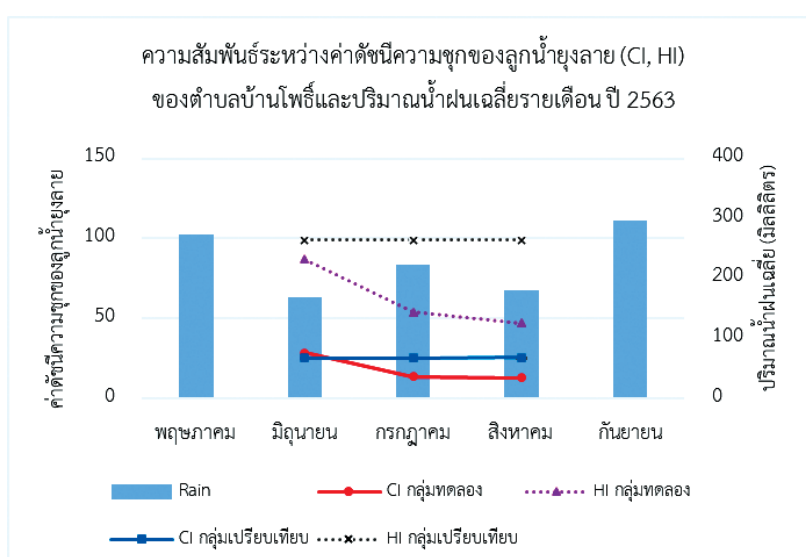
ค่าดัชนีความชุกของลูกน้ำยุงลายประจำเดือนมิถุนายน 2563 ของหมู่ที่ 3 ตำบลบ้านโพธิ์ ก่อนวางกับดักลิโอแทรป มีค่า CI และ HI ร้อยละ 28.29 และ 87 ตามลำดับ จากนั้นออกสำรวจค่าดัชนีความชุกของลูกน้ำยุงลายประจำเดือนกรกฎาคม 2563 หลังจากวางกับดักลิโอแทรปนาน 1 เดือน พบว่ามีค่า CI และ HI ลดลงจากเดิม โดยมีค่า CI ร้อยละ 13.39 และค่า HI ร้อยละ 54 ขณะที่ค่าดัชนีความชุกของลูกน้ำยุงลายประจำเดือนสิงหาคม 2563 มีค่า CI ร้อยละ 12.88 และค่า HI ร้อยละ 47 ซึ่งลดลงจากเดือนกรกฎาคม ขณะที่ค่า CI และ HI ของหมู่บ้านเปรียบเทียบกับ หมู่ที่ 1 ตำบลบ้านโพธิ์ มีค่า CI และ HI คงที่ไม่เปลี่ยนแปลง ดังแสดงในตารางที่ 1

ค่าดัชนีความชุกของลูกน้ำยุงลายในเดือนมิถุนายน 2563 ของหมู่ที่ 2 ตำบลนาทามเหนือ ก่อนวางกับดักลิโอแทรป มีค่า CI และ HI ร้อยละ 6.58 และ 33 ตามลำดับ หลังจากวางกับดักลิโอแทรปนาน 1 เดือน ได้ออกสำรวจค่าดัชนีความชุกของลูกน้ำยุงลายในเดือนกรกฎาคม 2563 พบว่ามีค่า CI และ HI คิดเป็นร้อยละ 7.02 และ 41 ตามลำดับ ซึ่งเพิ่มขึ้นจากเดิมเล็กน้อย เมื่อครบกำหนดเดือนที่ 2 ได้ออกสำรวจค่าดัชนีความชุกของลูกน้ำยุงลายประจำเดือนสิงหาคม 2563 อีกครั้ง พบค่า CI ร้อยละ 3.50 และ HI ร้อยละ 41 ซึ่งมีค่า CI ลดลงจากเดือนกรกฎาคม แต่ค่า HI ไม่เปลี่ยนแปลง ในขณะที่ค่า CI และ HI ของหมู่บ้านเปรียบเทียบกับ หมู่ที่ 4 ตำบลนาทามเหนือ มีค่า CI ของเดือนมิถุนายนร้อยละ 7.75 ส่วนในเดือนกรกฎาคมและสิงหาคมมีค่าค่อนข้างคงที่ไม่เปลี่ยนแปลง สำหรับค่า HI ในเดือนกรกฎาคมลดลงเล็กน้อย และในเดือนสิงหาคมมีค่าลดลงจากเดิมเหลือเพียงร้อยละ 36 ดังแสดงในตารางที่ 1

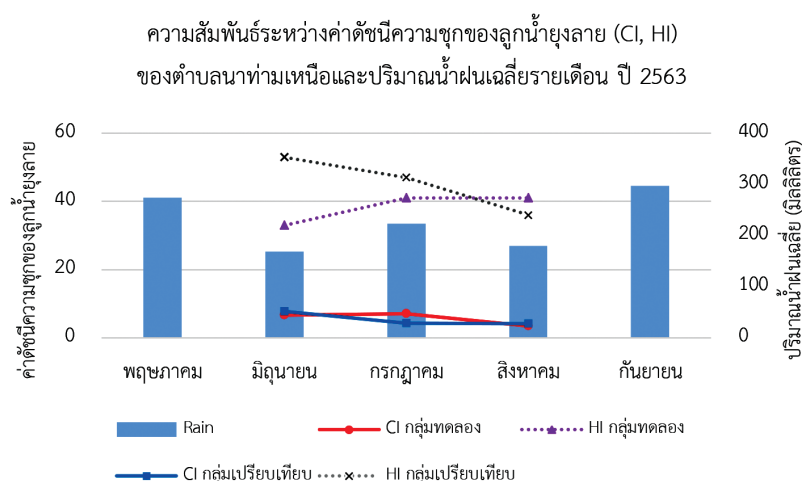
นอกจากนี้ ปัจจัยสำคัญอีกหนึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการควบคุมโรคไข้เลือดออก คือ สภาพภูมิอากาศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งความชุกของฝน เนื่องจากน้ำฝนสามารถขังอยู่ตามสิ่งแวดล้อมรวมถึงภาชนะรองรับต่าง ๆ ซึ่งจะเป็นแหล่งเพาะพันธุ์ยุงได้ จากรายงานสถานีอุตุนิยมวิทยาดำรง พบปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยรายเดือนของอำเภอเมืองตรัง ระหว่างเดือนพฤษภาคมถึงกันยายน 2563 คิดเป็น 274, 168.80, 223.20, 180.10 และ 297.30 มิลลิเมตร ตามลำดับ หลังวางกับดักลิโอแทรป ค่า CI และ HI ในเดือนกรกฎาคมและสิงหาคมของหมู่ที่ 3 ตำบลบ้านโพธิ์ มีค่าลดลง ในขณะที่กลุ่มเปรียบเทียบกับ หมู่ที่ 1 สำหรับตำบลนาทามเหนือ หลังวางกับดักลิโอแทรป 1 เดือน ค่า CI ของหมู่ที่ 2 ลดลงในเดือนสิงหาคม ส่วนค่า HI เพิ่มขึ้นในเดือนกรกฎาคม และคงที่ในสิงหาคม ค่า CI ของหมู่ที่ 4 ลดลงในเดือนแรก และคงที่ในเดือนที่ 2 และค่า HI ลดลงอย่างต่อเนื่อง ดังแสดงในภาพที่ 1 และ 2

ตารางที่ 1 ค่าดัชนีความชุกของลูกน้ำยุงลายในแต่ละเดือนแยกตามรายหมู่บ้าน

หมู่บ้าน	จำนวนบ้าน (หลัง)	Container Index (CI)			House Index (HI)		
		มิ.ย. 63	ก.ค. 63	ส.ค. 63	มิ.ย. 63	ก.ค. 63	ส.ค. 63
ตำบลบ้านโพธิ์							
หมู่ที่ 3 (กลุ่มทดลอง)	100	28.29	13.39	12.88	87.00	54.00	47.00
หมู่ที่ 1 (กลุ่มเปรียบเทียบ)	100	25.63	25.63	25.64	99.00	99.00	99.00
ตำบลนาทมเหนือ							
หมู่ที่ 2 (กลุ่มทดลอง)	100	6.58	7.02	3.50	33.00	41.00	41.00
หมู่ที่ 4 (กลุ่มเปรียบเทียบ)	100	7.75	4.34	4.21	53.00	47.00	36.00



ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าดัชนีความชุกของลูกน้ำยุงลาย (CI, HI) และปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยรายเดือนของหมู่บ้านที่เข้าร่วมโครงการในตำบลบ้านโพธิ์ ปี 2563



ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าดัชนีความชุกของลูกน้ำยุงลาย (CI, HI) และปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยรายเดือนของหมู่บ้านที่เข้าร่วมโครงการในตำบลนาทมเหนือ ปี 2563

การตรวจนับจำนวนไยุงลาย

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง ดำเนินการตรวจนับจำนวนไยุงลายบนแผ่นฟองน้ำ โดยฝั่งฟองน้ำให้แห้งแล้วเก็บลงในถุงพลาสติกใส นับจำนวนไยุงลายภายใต้แว่นขยายที่มีกำลังขยาย 3 เท่า ตำบลบ้านโพธิ์เก็บแผ่นฟองน้ำมาครบถ้วนในเดือนกรกฎาคมจำนวน 400 แผ่น นับจำนวนไยุงลายบริเวณในบ้านรวม 13,503 ฟอง และนอกบ้านรวม 18,408 ฟอง รวมจำนวนไยุงลายที่กักตัวสามารถดึงดูดยุงลายให้มาวางไข่ได้ทั้งหมด 31,911 ฟอง ซึ่งค่าเฉลี่ยของจำนวนไยุงลายบริเวณในบ้านและนอกบ้านมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.03$) ในเดือนสิงหาคมเก็บแผ่นฟองน้ำมาครบถ้วนจำนวน 400 แผ่น นับจำนวนไยุงลายบริเวณในบ้านรวม 14,387 ฟอง และนอกบ้านรวม 18,061 ฟอง รวมจำนวนไยุงลายที่กักตัวสามารถดึงดูดยุงลายให้มาวางไข่ได้ทั้งหมด 32,448 ฟอง โดยค่าเฉลี่ยของจำนวนไยุงลายบริเวณในบ้านและนอกบ้านไม่มีความแตกต่างกัน ($p = 0.18$) เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของไยุงลายบริเวณในบ้านระหว่างเดือนกรกฎาคมและสิงหาคมพบว่าไม่แตกต่างกัน ($p = 0.70$) และค่าเฉลี่ยของไยุงลายบริเวณนอกบ้านระหว่างเดือนกรกฎาคมและสิงหาคมไม่มีความแตกต่างกันเช่นเดียวกัน ($p = 0.87$) ดังแสดงในตารางที่ 2 อย่างไรก็ตามสามารถคำนวณจำนวนยุงลายที่ถูกกำจัดไปจากจำนวนไยุงลายทั้งหมด 64,359 ฟอง โดยไยุงลายเหล่านี้สามารถฟักออกมาเป็นยุงตัวเมีย ซึ่งจะมากินเลือดคนและแพร่เชื้อใช้เลือดออกได้ประมาณ 32,180 ตัว และยุงตัวเมีย 1 ตัวสามารถวางไข่ได้ประมาณ 500 ฟอง^(1,9) ทำให้สามารถกำจัดยุงลายในหมู่บ้านที่ 3 ตำบลบ้านโพธิ์นี้ได้ประมาณ 16,089,750 ตัวภายในระยะเวลา 2 เดือน ทั้งนี้พบไยุงลายในก้นดักลิโอแทรปทั้งหมด 746 ก้นดัก จากทั้งหมด 800 ก้นดัก อัตราการพบไยุงลายในก้นดักลิโอแทรปจึงคิดเป็นร้อยละ 93.25 ดังแสดงในตารางที่ 3 ส่วนค่าเฉลี่ยไยุงลายที่พบ ซึ่งคำนวณจากจำนวนไยุงลาย 64,359 ฟอง/จำนวนก้นดักที่พบไยุง 746 ก้นดัก คิดเป็น 86.27 ฟอง/ก้นดัก

ตำบลนาท่ามเหนือเก็บแผ่นฟองน้ำมาได้ในเดือนกรกฎาคมจำนวน 398 แผ่น นับจำนวนไยุงบริเวณในบ้านรวม 13,999 ฟอง และนอกบ้านรวม 18,081 ฟอง รวมจำนวนไยุงลายที่กักตัวสามารถดึงดูดยุงลายให้มาวางไข่ได้ทั้งหมด 32,080 ฟอง ซึ่งค่าเฉลี่ยของไยุงลายบริเวณในบ้านและนอกบ้านไม่มีความแตกต่างกัน ($p = 0.07$) ในเดือนสิงหาคมเก็บแผ่นฟองน้ำมาได้จำนวน 268 แผ่น นับจำนวนไยุงบริเวณในบ้านรวม 12,025 ฟอง และนอกบ้านรวม 9,048 ฟอง รวมจำนวนไยุงลายที่กักตัวสามารถดึงดูดยุงลายให้มาวางไข่ได้ทั้งหมด 21,073 ฟอง โดยค่าเฉลี่ยของไยุงลายบริเวณในบ้านและนอกบ้านไม่มีความแตกต่างกัน ($p = 0.13$) เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของไยุงลายบริเวณในบ้านระหว่างเดือนกรกฎาคมและสิงหาคมพบว่าไม่แตกต่างกัน ($p = 0.19$) ขณะที่ค่าเฉลี่ยของไยุงลายบริเวณนอกบ้านระหว่างเดือนกรกฎาคมและสิงหาคมมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.02$) ดังแสดงในตารางที่ 2 เมื่อคำนวณจำนวนยุงลายที่ถูกกำจัดไปโดยประมาณจากจำนวนไยุงลาย 53,153 ฟอง ในหมู่บ้านที่ 2 ตำบลนาท่ามเหนือนี้คิดเป็น 13,288,250 ตัว ภายในระยะเวลา 2 เดือน ทั้งนี้พบไยุงลายในก้นดักลิโอแทรปทั้งหมด 618 ก้นดัก จากทั้งหมด 666 ก้นดัก อัตราการพบไยุงลายในก้นดักลิโอแทรปจึงคิดเป็นร้อยละ 92.79 ดังแสดงในตารางที่ 3 ส่วนค่าเฉลี่ยไยุงลายที่พบซึ่งคำนวณจากจำนวนไยุงลาย 53,153 ฟอง/จำนวนก้นดักที่พบไยุง 618 ก้นดัก คิดเป็น 86.01 ฟอง/ก้นดัก

สถานการณ์ผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกของหมู่บ้านที่เข้าร่วมโครงการ

จากข้อมูลของสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดตรัง รายงานสถานการณ์จำนวนผู้ป่วยและอัตราป่วยต่อแสนประชากรแยกตามรายเดือน ดังแสดงในตารางที่ 4 ช่วงก่อนเริ่มดำเนินการลงพื้นที่ศึกษา ระหว่างเดือนมกราคมถึงพฤษภาคม 2563 ในหมู่บ้านที่ 3 และหมู่บ้านที่ 1 ตำบลบ้านโพธิ์ พบผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกสะสม 8 ราย และ 1 ราย ตามลำดับ และมีอัตราป่วยเท่ากับ 117.86, 117.86, 0, 176.78 และ 58.93 ต่อแสนประชากร ตามลำดับ เมื่อเริ่มดำเนินการลงพื้นที่ศึกษาในเดือนมิถุนายนถึงกันยายน 2563 ไม่พบรายงานจำนวนผู้ป่วยในหมู่บ้านที่ 3 ส่วนในหมู่บ้านที่ 1 พบผู้ป่วย 2 ราย เฉพาะในเดือนกรกฎาคมคิดเป็นอัตราป่วย 118.55 ต่อแสนประชากร สำหรับหมู่บ้านที่ 2 และหมู่บ้านที่ 4 ตำบลนาท่ามเหนือ ช่วงก่อนเริ่มดำเนินการลงพื้นที่ศึกษา พบผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกสะสม 3 ราย และ 0 ราย ตามลำดับ โดยในหมู่บ้านที่ 2 มีอัตรา

ป่วยในเดือนเมษายนและพฤษภาคมคิดเป็น 79.55 และ 159.11 ต่อแสนประชากร ตามลำดับ หลังดำเนินการลงพื้นที่พบผู้ป่วยไข้เลือดออกสะสมเพิ่มขึ้นทั้ง 2 หมู่บ้าน คือ 4 ราย และ 1 ราย ตามลำดับ มีอัตราป่วยในหมู่ที่ 2 ระหว่างเดือนมิถุนายนและกันยายนคิดเป็น 159.11, 159.11, 0 และ 0 ต่อแสนประชากร ตามลำดับ ในขณะที่พบอัตราป่วยของหมู่ที่ 4 เฉพาะในเดือนกรกฎาคมเท่ากับ 101.73 ต่อแสนประชากร

ตารางที่ 2 จำนวนไข้อยู่ลายบนแผ่นฟองน้ำในแต่ละเดือนแยกตามรายหมู่บ้าน

หมู่บ้าน	เดือน ก.ค. 63: ฟอง (ค่าเฉลี่ย)				เดือน ส.ค. 63: ฟอง (ค่าเฉลี่ย)			
	ในบ้าน	นอกบ้าน	รวม	p-value*	ในบ้าน	นอกบ้าน	รวม	p-value*
ตำบลบ้านโพธิ์ หมู่ที่ 3	13,503 (67.52)	18,408 (92.04)	31,911	0.03	14,387 (71.89)	18,061 (90.28)	32,448	0.18
ตำบลนาท่ามเหนือ หมู่ที่ 2	13,999 (69.98)	18,081 (91.33)	32,080	0.07	12,025 (90.43)	9,048 (66.61)	21,073	0.13
หมู่บ้าน	ในบ้าน: ฟอง (ค่าเฉลี่ย)				นอกบ้าน: ฟอง (ค่าเฉลี่ย)			
	ก.ค. 63	ส.ค. 63	รวม	p-value*	ก.ค. 63	ส.ค. 63	รวม	p-value*
ตำบลบ้านโพธิ์ หมู่ที่ 3	13,503 (67.52)	14,387 (71.89)	27,890	0.70	18,408 (92.04)	18,061 (90.28)	36,469	0.87
ตำบลนาท่ามเหนือ หมู่ที่ 2	13,999 (69.98)	12,025 (90.43)	26,024	0.19	18,081 (91.33)	9,048 (66.61)	27,129	0.02

*กำหนดระดับนัยสำคัญที่ $\alpha = 0.05$

ตารางที่ 3 อัตราการพบไข้อยู่ลายในกับดักลิโอแทรปในแต่ละเดือนแยกตามรายหมู่บ้าน

หมู่บ้าน	ในบ้าน			นอกบ้าน			รวม		
	จำนวน	พบ	อัตรา	จำนวน	พบ	อัตรา	จำนวน	พบ	อัตรา
	กับดัก (กับดัก)	ไข้อยู่ลาย (กับดัก)	การพบ (ร้อยละ)	กับดัก (กับดัก)	ไข้อยู่ลาย (กับดัก)	การพบ (ร้อยละ)	กับดัก (กับดัก)	ไข้อยู่ลาย (กับดัก)	การพบ (ร้อยละ)
ตำบลบ้านโพธิ์ หมู่ที่ 3									
เดือน ก.ค. 63	200	170	85.00	200	191	95.50	400	361	90.25
เดือน ส.ค. 63	200	188	94.00	200	197	98.50	400	385	96.25
รวม							800	746	93.25
ตำบลนาท่ามเหนือ หมู่ที่ 2									
เดือน ก.ค. 63	200	174	87.00	198	186	93.93	398	360	90.45
เดือน ส.ค. 63	133	127	95.49	135	131	97.04	268	258	96.27
รวม							666	618	92.79

ตารางที่ 4 จำนวนผู้ป่วยและอัตราป่วยโรคไข้เลือดออกของหมู่บ้านที่เข้าร่วมโครงการ ปี 2563 แยกตามรายเดือน

หมู่บ้าน	จำนวนผู้ป่วยก่อนลงพื้นที่: ราย (อัตราป่วยต่อแสนประชากร)					จำนวนผู้ป่วยหลังลงพื้นที่: ราย (อัตราป่วยต่อแสนประชากร)			
	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.
ตำบลบ้านโพธิ์									
หมู่ที่ 3	2	2	0	3	1	0	0	0	0
(กลุ่มทดลอง)	(117.86)	(117.86)	(0)	(176.78)	(58.93)	(0)	(0)	(0)	(0)
หมู่ที่ 1	0	0	1	0	0	0	2	0	0
(กลุ่มเปรียบเทียบ)	(0)	(0)	(59.28)	(0)	(0)	(0)	(118.55)	(0)	(0)
ตำบลนาทมเหนือ									
หมู่ที่ 2	0	0	0	1	2	2	2	0	0
(กลุ่มทดลอง)	(0)	(0)	(0)	(79.55)	(159.11)	(159.11)	(159.11)	(0)	(0)
หมู่ที่ 4	0	0	0	0	0	0	1	0	0
(กลุ่มเปรียบเทียบ)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(101.73)	(0)	(0)

วิจารณ์

การควบคุมปริมาณหรือกำจัดยุงลายจะนำไปสู่การลดหรือป้องกันการเกิดโรคไข้เลือดออกและโรคอื่นๆ ที่มีพาหะนำโรคเป็นยุงลายได้ ได้แก่ ไข้ซิกนุกุนยา⁽¹⁰⁾ และโรคติดเชื้อไวรัสชิคา จากผลการศึกษาครั้งนี้ พบว่ากับดักลิโอแตรปสามารถลดจำนวนประชากรยุงลายลงได้เป็นจำนวนมาก มีประสิทธิภาพในการดึงดูดยุงลายให้มาวางไข่ได้ในระดับดีมาก สอดคล้องกับการศึกษาของ ชุคกีดี โมลิโต และคณะ ที่ประยุกต์ใช้กับดักไข่ยุงลิโอแตรปเพื่อลดความหนาแน่นของยุงลายในพื้นที่ระบาดของโรคไข้เลือดออกในจังหวัดสงขลา⁽¹¹⁾ โดยการลดปริมาณไข่ยุงลายจะเป็นการตัดวงจรชีวิตของยุงลายในระยะแรกที่มีโอกาสจะแพร่พันธุ์ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการยับยั้งการระบาดของโรคติดต่อที่มียุงลายเป็นพาหะลงได้ในกรณีไข่ยุงลายนั้นติดเชื้อไวรัส จากการศึกษาของ อุซาวดี ถาวระ และคณะ เกี่ยวกับอัตราการติดเชื้อไวรัสแดงกีของยุงลายบ้านและยุงลายสวนในธรรมชาติ พบว่ายุงลายบ้านมีอัตราการติดเชื้อไวรัสแดงกีมากกว่ายุงลายสวน⁽⁵⁾ อย่างไรก็ตาม กับดักลิโอแตรปสามารถดึงดูดยุงลายเพศเมียทั้งสองชนิดให้มาวางไข่ได้เป็นอย่างดี⁽⁹⁾

จากผลการศึกษาในตำบลบ้านโพธิ์ กับดักลิโอแตรปดักจับไข่ยุงลายได้สูงถึง 64,359 ฟอง ภายในระยะเวลา 2 เดือน ซึ่งลดปริมาณยุงลายที่จะเกิดใหม่ได้ประมาณ 16,089,750 ตัว ภายในระยะเวลา 30-45 วัน โดยประมาณ เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลการสำรวจลูกน้ำยุงลายจะเห็นว่าค่า CI และ HI ของหมู่บ้านที่ใช้กับดักไข่ยุงลิโอแตรปมีค่าลดลงเช่นกัน สำหรับตำบลนาทมเหนือ กับดักลิโอแตรปสามารถดักจับไข่ยุงลายและลดจำนวนประชากรยุงลายได้จำนวนมากเช่นเดียวกันกับตำบลบ้านโพธิ์ โดยกับดักลิโอแตรปดักจับไข่ยุงลายได้ถึง 53,153 ฟอง ลดปริมาณยุงที่จะเกิดขึ้นใหม่ได้ประมาณ 13,288,250 ตัว แม้ว่าตำบลนาทมเหนือจะเก็บแผ่นฟองน้ำมาได้ไม่ครบถ้วนเนื่องจากอาจมีปัจจัยภายนอกที่ควบคุมไม่ได้มารบกวน ในส่วนของข้อมูลการสำรวจลูกน้ำยุงลาย หมู่บ้านที่ใช้กับดักไข่ยุงลิโอแตรป มีค่า CI ลดลงหลังดำเนินการในเดือนที่ 2 แต่ค่า HI เพิ่มขึ้นเล็กน้อย อาจเนื่องมาจากมีจำนวนภาชนะที่ซังน้ำเพิ่มขึ้นหลังฝนตก

สำหรับค่าดัชนีความชุกลูกน้ำยุงลาย ค่า HI ถือว่าเป็นค่าดัชนีที่ง่ายที่สุดในการทำนายความเสี่ยงของโรคเนื่องจากไม่ได้นำจำนวนภาชนะที่พบลูกน้ำยุงลายมาพิจารณา แต่ทำให้ทราบโอกาสเสี่ยงต่อการเป็นโรคไข้เลือดออกในแต่ละพื้นที่ได้ ขณะที่ค่า CI จะคำนวณจากร้อยละของจำนวนภาชนะที่พบลูกน้ำยุงลายซึ่งถือเป็นแหล่งเพาะพันธุ์

ยุงลาย ทำให้มีประโยชน์ในการวางแผนควบคุม อย่างไรก็ตามไม่มีการนับจำนวนลูกน้ำยุง หากครัวเรือนนั้นพบลูกน้ำยุงลายในภาชนะหนึ่งมากหรือมีภาชนะอื่น ๆ ตามธรรมชาติที่เกิดขึ้นและตกลำวางไป การสำรวจจำนวนไข่ยุงลายจึงเป็นดัชนีที่มีความละเอียดสูงกว่า สามารถวัดค่าออกมาในเชิงปริมาณได้ชัดเจน

นอกจากนี้ในเดือนกรกฎาคม 2563 ตำบลบ้านโพธิ์ หมู่ที่ 3 มีจำนวนไข่ยุงลายในกับดักภายในบ้านและนอกบ้านแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.03$) โดยมีจำนวนไข่ยุงลายนอกบ้านมากกว่าในบ้าน ซึ่งแตกต่างกันกับผลการศึกษาของ ณัฐพัชร รัตนเดชนาคินทร์ และคณะ ที่ทำการศึกษาในอำเภอบางระกำ จังหวัดพิษณุโลก โดยพบไข่ยุงในกับดักภายในบ้านมากกว่านอกบ้านคิดเป็นร้อยละ 65.4 และ 34.6 ตามลำดับ⁽¹⁴⁾ ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของยุงลายในแต่ละพื้นที่ ยุงลายบ้านมักวางไข่ในน้ำขังตามภาชนะต่าง ๆ ที่อยู่ภายในบ้าน เช่น จานรองขาตู้ ตุ่มน้ำ เป็นต้น และชอบออกหากินช่วงเวลากลางวันหลังจากการรณรงค์ให้กำจัดแหล่งเพาะพันธุ์ยุงภายในบ้าน พบว่ายุงลายบ้านออกไปวางไข่นอกบ้านมากขึ้นตามภาชนะที่ทิ้งกระจัดกระจาย เช่น ยางรถยนต์ กระบองน้ำ ถังพลาสติก เป็นต้น ขณะที่ยุงลายสวนมักออกหากินในเวลากลางวันเช่นเดียวกับยุงลายบ้านและจะพบตามสวนผลไม้หรือสวนยางพาราเป็นส่วนใหญ่ ยุงตัวเต็มวัยจึงวางไข่ตามแหล่งน้ำขังต่าง ๆ ตามสวนผลไม้ สวนยางพารา โพรงต้นไม้ที่มีน้ำขัง โดยหลังจากมีการรณรงค์ให้กำจัดแหล่งเพาะพันธุ์ยุงลายชนิดนี้อย่างต่อเนื่อง ยุงลายชนิดนี้จึงเข้ามาวางไข่ภายในบ้านและอยู่ร่วมกันกับยุงลายบ้านได้⁽¹⁵⁾

สภาพภูมิอากาศเป็นอีกหนึ่งตัวแปรสำคัญต่อประชากรยุงลาย โดยจะส่งผลต่อพัฒนาการในวงจรชีวิตของยุงลายพาหะ อาจยืดชีวิตของยุงลายพาหะออกไปทำให้มีการส่งผ่านเชื้อนานขึ้น หรืออาจทำให้ระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญเติบโตสั้นลง เป็นผลให้มีปริมาณยุงลายพาหะเพิ่มมากขึ้นและมีอัตราการกัดสูงขึ้น ซึ่งประเทศไทยมีปริมาณน้ำฝนเป็นปัจจัยสำคัญต่อการระบาดของโรคไข้เลือดออก⁽⁵⁾ ในระหว่างการศึกษานี้ มีข้อมูลปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยจากรายงานสถานีอุตุนิยมวิทยาตรังประจำเดือนพฤษภาคม 2563 คิดเป็น 274 มิลลิเมตร ซึ่งเป็นช่วงก่อนเริ่มดำเนินการลงพื้นที่และหลังจากลงพื้นที่ในช่วงเดือนมิถุนายนถึงสิงหาคม 2563 มีปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 168.8–223.2 มิลลิเมตร แต่ค่า CI และ HI ของหมู่บ้านที่วางกับดักลิโอแทรปลดลง แสดงให้เห็นว่าการลดลงของดัชนีความชุกของลูกน้ำยุงลายอาจเป็นผลมาจากการใช้กับดักลิโอแทรปและใส่ซีไอโลทกำจัดลูกน้ำยุง

สรุป

กับดักลิโอแทรปมีบทบาทสำคัญในการกำจัดลูกน้ำยุงลายเนื่องจากสามารถดึงดูดยุงลายให้มาวางไข่ได้จำนวนมาก ทั้งยุงลายบ้านซึ่งมีแหล่งอาศัยอยู่ในบ้านและยุงลายสวนที่มีแหล่งอาศัยอยู่นอกบ้าน โดยมีประสิทธิภาพในการดึงดูดยุงลายให้มาวางไข่ร้อยละ 90.25–96.27 และช่วยลดจำนวนยุงลายในพื้นที่ที่ใช้ลิโอแทรปได้ประมาณ 13,288,250–16,089,750 ตัว ภายในระยะเวลา 2 เดือน จึงสามารถนำมาใช้เป็นมาตรการในการกำจัดยุงลายเพื่อควบคุมโรคไข้เลือดออกได้อีกทางหนึ่ง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่สนับสนุนงบประมาณ และขอขอบคุณผู้ร่วมโครงการ ประกอบด้วยสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดตรัง สำนักงานสาธารณสุขอำเภอเมืองตรัง ศูนย์ควบคุมโรคติดต่ออำเภอเมืองตรัง 12.3 ตรัง โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพประจำตำบลบ้านโพธิ์ โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพประจำตำบลนาท่ามเหนือ อาสาสมัครสาธารณสุขประจำหมู่บ้าน ตลอดจนทุกครัวเรือนในหมู่ที่ 1 และ 3 ตำบลบ้านโพธิ์ หมู่ที่ 2 และ 4 ตำบลนาท่ามเหนือ รวมทั้งสถานีอุตุนิยมวิทยาตรัง ที่สนับสนุนข้อมูลต่าง ๆ และให้ความร่วมมือในการดำเนินโครงการเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

1. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข. ชีววิทยา นิเวศวิทยา และการควบคุมยุงในประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 4. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2553.
2. ไสว โพธิ์มิล, สุภาภรณ์ โคตรมณี. การสำรวจความชุกชุมของลูกน้ำยุงลายในพื้นที่จังหวัดอุดรธานี พ.ศ. 2554-2557. วารสารสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 จังหวัดขอนแก่น. 2558; 22(1): 42-8.
3. Paz-Soldan VA, Yukich J, Soonthornthada A, Giron M, Apperson CS, Ponnusamy L, et al. Design and testing of novel lethal ovitrap to reduce populations of Aedes mosquitoes: community-based participatory research between industry, academia and communities in Peru and Thailand. PLoS One 2016; 11(8): e0160386. (20 pages).
4. Kajornkasirat S, Muangprathub J, Boonnam N. Online advanced analytical service: profiles for dengue hemorrhagic fever transmission in Southern Thailand. Iran J Public Health 2019; 48(11): 1979-87.
5. อุชาวดี ถาวระ, พายุ ภักดีนวน, อภิวัฏ ธวัชสิน, จักรวาล ชมภูศรี, ชญาดา ขำสวัสดิ์, ยุทธนา ภูทรัพย์, และคณะ. ชีววิทยาของยุงพาหะโรคไข้เลือดออกและซีโรทัยปของเชื้อไวรัสเดงกีในวงจรการเกิดโรคในประเทศไทย. ว กรมวิทย พ 2558; 57(2): 186-96.
6. สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 12 จังหวัดสงขลา กรมควบคุมโรค. สคร.12 สงขลา เตือน ปชช. ระวังป่วยด้วยโรคไข้เลือดออก เน้นยึดหลัก “3 เก็บ ป้องกัน 3 โรค”. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 19 ก.พ. 2564]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://ddc.moph.go.th/uploads/files/1297620200521085502.pdf>.
7. กองโรคติดต่อภายในโดยแมลง กรมควบคุมโรค. รายงานพยากรณ์โรคไข้เลือดออก ปี 2563. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 28 พ.ย. 2563]; [77 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: http://direct.disaster.go.th/site9/cms-download_content.php?did=32461.
8. กองโรคติดต่อภายในโดยแมลง กรมควบคุมโรค. สถานการณ์โรคไข้เลือดออก ปี 2563. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 27 พ.ย. 2563]; [6 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: http://phanhospital.go.th/phanhospital/images/Disease%20situation/DHF_Wk18%2004282563.pdf.
9. Tawatsin A, Thavara U, Srivarom N, Siriyasatien P, Wongtitirote A. LeO-Trap®: a novel lethal ovitrap developed from combination of the physically attractive design of the ovitrap with biochemical attractant and larvicide for controlling Aedes aegypti (L.) and A. albopictus (Skuse) (Diptera: Culicidae). Biomed J Sci & Tech Res 2019; 21(5): 16183-92.
10. Zeichner BC, Debboun M. The lethal ovitrap: a response to the resurgence of dengue and chikungunya. US Army Med Dep J 2011; Jul-Sep: 4-11.
11. ชุศักดิ์ โมลิโต, สุวิธ ธรรมปาโล, ไสภวดี มูลเมฆ, ธาเรีย เสาวธัญ, บัลลังก์ อุปพงษ์. การประยุกต์ใช้กับดักยุง “LeO-Trap” เพื่อลดความหนาแน่นของยุงลายในพื้นที่ระบาดของโรคไข้เลือดออก จังหวัดสงขลา. ว กรมวิทย พ 2563; 62(1): 6-15.
12. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข. นวัตกรรมกรมวิทยพิชิตแมลง: รักษาสิ่งแวดล้อมพร้อมประชารัฐ. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2561.
13. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. การป้องกันกำจัดยุงลายสาเหตุโรคไข้เลือดออก ชีวคุณยา และใช้ชีกา. [วีดิทัศน์ออนไลน์]. 2563. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://www.youtube.com/watch?v=yYfQe-AXGHs>.

14. ณัฐพัชร รัตนเดชานาคินทร์, พรทิพย์ ลักษณะกุล, มลลิกา รัตนเมือง. การใช้กับดักไขยุงสีโอแทปควบคุมการระบาดของโรคไข้เลือดออกในอำเภอบางระกำ จังหวัดพิษณุโลก. ใน: การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ ครั้งที่ 28 ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2563. วันที่ 25-27 มีนาคม 2563. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2563. หน้า 114.
15. อภิวิทย์ ธวัชสิน, อุษาวดี ถาวรระ, บรรณาธิการ. แผลงทางการแพทย์: ชีววิทยาและนวัตกรรมในการป้องกันกำจัดแมลง.. นนทบุรี: สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2559.

Integrated Prevention and Control of Dengue Haemorrhagic Fever Vectors in High Risk Areas in Trang

Suwandee Sapcharoen¹ Chotika Kanin² Warunee Thepmaneerat³ Kwankamon Kraikut⁴ Jariyaporn Baikodem⁵ and Kriangsak Ruchusatsawat⁶

¹Regional Medical Sciences Center 12/1 Trang, Department of Medical Sciences, Amphoe Muang, Trang 92000

²Muang Trang District Public Health Office, Amphoe Muang, Trang 92000

³Banpho Tambon Health Promoting Hospital, Amphoe Muang, Trang 92000

⁴Na Tham Nuea Tambon Health Promoting Hospital, Amphoe Muang, Trang 92000

⁵Vector Borne Disease Control 12.3 Trang, Amphoe Muang, Trang 92000

⁶National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Amphoe Muang, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Dengue haemorrhagic fever (DHF) is one of public health problems that has *Aedes* mosquitoes as vectors. The incidence of the disease remains high in Trang province, particularly Muang Trang area. The effective prevention and control measures for DHF vectors are needed in order to reduce the incidence of DHF, while the existing measures are currently not effective as expected. The use of LeO-Trap and zeolite granules could be the effective devices for controlling *Aedes* larvae. This study aimed to evaluate the control method for *Aedes* larval control using LeO-Trap and zeolite granules in Muang Trang area, including Banpho and Na Tham Nuea sub-districts, between June and August 2020. LeO-Trap sets were installed in 100 houses per sub-district. *Aedes* larval indices: Container Index (CI) and House Index (HI) were carried out and the number of mosquito eggs were collected and compared with the control sites. After implementing LeO-Trap for two months, CI and HI in Banpho sub-district were declined from 28.29% and 87% to 12.88% and 47%, respectively. The total of 64,359 eggs was found in traps, while the percentage of trap containing eggs was 93.25%. In Na Tham Nuea sub-district, CI and HI were altered from 6.58% and 33.0% to 3.50% and 41.0%, respectively. The total of 53,125 eggs in traps was demonstrated, while the percentage of trap containing eggs was 92.79%. Moreover, in Banpho sub-district, average of the number of mosquito eggs was statistically different between indoor and outdoor traps ($p=0.03$), as well as no DHF patient was found after placing traps for one month. LeO-Trap and zeolite granules could be an effective device to control *Aedes* larvae, possibly leading to an additional vector control to diminish the populations of *Aedes* mosquitoes and the number of DHF patients in the future.

Keywords: Ovitrap, LeO-Trap, *Aedes*., Dengue Haemorrhagic Fever, Trang

การพัฒนากระบวนการรับรองคุณภาพ ของห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ในประเทศไทย สู่มาตรฐานสากล ISO 15189

สุรศักดิ์ หมั่นพล¹ ภัทรวีร์ สร้อยสังวาลย์¹ ศิริพรรณ วงศ์วานิช² และนัฐกาญจน์ ละเอียดดี¹

¹สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

²นักวิชาการอิสระ 53/1013 ถนนแจ้งวัฒนะ ปากเกร็ด นนทบุรี 11120

บทคัดย่อ สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เป็นหน่วยรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ตามมาตรฐาน ISO 15189 แห่งเดียวของประเทศไทย โดยดำเนินการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17011 จนได้ลงนามยอมรับร่วม (Mutual Recognition Arrangement, MRA) กับองค์การระหว่างประเทศ Asia Pacific Accreditation Cooperation (APAC) และ International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC) ได้สร้างนักวิชาการที่ผ่านหลักสูตรอบรมขึ้นทะเบียนเป็นผู้ตรวจประเมินห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ตามมาตรฐาน ISO 15189 จำนวน 193 คน นับจากปี พ.ศ. 2547 มีห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ผ่านการรับรองสะสมมาจนถึงปี พ.ศ. 2562 จำนวน 201 แห่ง แม้ปรากฏผลสำเร็จของการยกระดับคุณภาพตามมาตรฐานสากลของห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ในประเทศไทย แต่ข้อมูลจากการวิเคราะห์กระบวนการรับรองระบบงานยังแสดงถึงจุดอ่อนบางส่วน จึงได้กำหนดกลยุทธ์ เพื่อปิดจุดอ่อนและเพิ่มประสิทธิภาพของโปรแกรมการรับรองห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ โดยการลดขั้นตอน ลดเวลา และลดจำนวนเอกสารที่ใช้ในกระบวนการรับรอง เน้นการเพิ่มพูนความสามารถของผู้ตรวจประเมินที่เป็นอาสาสมัครจากองค์กรภายนอกและบุคลากรภายในของหน่วยรับรอง รวมถึงการพัฒนาแบบการสื่อสารและการประชาสัมพันธ์เชิงรุกมากขึ้น มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ที่ผ่านการรับรองมาตรฐานระดับประเทศสามารถปรับปรุงเข้าสู่มาตรฐานสากล ISO 15189 ขณะเดียวกันกระบวนการรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ได้รับการพัฒนาให้มีความรวดเร็วและทันสมัยขึ้นอย่างชัดเจน ซึ่งกระบวนการ e-Accreditation ช่วยลดเวลากระบวนการรับรองจาก 220 วัน เหลือเฉลี่ย 77 วัน นอกจากนี้หน่วยรับรองได้มุ่งมั่นขยายขอบข่ายการรับรองให้ครอบคลุมด้านการเก็บรักษาสารชีวภาพตามมาตรฐาน ISO 20387: 2018 Biotechnology - Biobanking - General requirements for biobanking ภายในปี พ.ศ. 2565 และการศึกษาวิจัยได้เสนอแนวทางปรับปรุงโครงสร้างการบริหารหน่วยรับรองทั้ง 4 แห่ง ของประเทศไทยไว้ด้วย

คำสำคัญ: หน่วยรับรองระบบงาน, ISO 15189, ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์

Corresponding author E-mail: surasak.m@dmisc.mail.go.th

Received: 16 November 2020

Revised: 8 January 2021

Accepted: 13 March 2021

บทนำ

ในกระบวนการตรวจวินิจฉัยโรค ต้องมีการเก็บตัวอย่างจากส่วนต่างๆ จากร่างกายของบุคคลไปตรวจวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ เพื่อนำผลการตรวจไปใช้ประกอบการตัดสินใจวางแผนการดูแลรักษาผู้ป่วย ไข้หวัด ควบคุม หรือป้องกันโรค ดังนั้นผลตรวจวิเคราะห์ต้องมีความถูกต้อง ครบถ้วน และส่งมอบให้แพทย์หรือผู้ให้บริการได้ทันเวลา เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อประชาชน ซึ่งกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เห็นความสำคัญดังกล่าว จึงจัดตั้งโปรแกรมทดสอบความชำนาญการตรวจวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการในสังกัดกระทรวงสาธารณสุข ตั้งแต่ พ.ศ. 2522 ซึ่งมีการเตรียมตัวอย่างส่งไปให้ห้องปฏิบัติการสมาชิกตรวจวิเคราะห์แล้วนำรายงานผลมาเปรียบเทียบกับเกณฑ์ที่กำหนด หากพบประเด็นปัญหาเชิงวิชาการ จะมีการพัฒนาโดยการอบรมฟื้นฟูความรู้ ความเข้าใจของเจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการที่ร่วมในโปรแกรม ต่อมาในปี พ.ศ. 2545 สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้จัดตั้งโปรแกรมพัฒนาคุณภาพของห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ในประเทศไทย โดยนำมาตรฐานระดับสากล ISO 15189: 2003 มาเผยแพร่ให้บุคลากรของห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ในประเทศไทย ได้รับทราบ และกระตุ้นให้นำไปพัฒนาใช้ต่อไป มีการสร้างระบบรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ตามมาตรฐาน ISO 15189: 2003–Medical laboratories–Requirements for quality and competence⁽¹⁾ ขึ้นในประเทศจนบรรลุความสำเร็จเชิงประจักษ์ โดยมีห้องปฏิบัติการที่ผ่านการรับรองแห่งแรกในปี พ.ศ. 2547 และจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2562 มีการรับรองห้องปฏิบัติการไปแล้วจำนวน 201 แห่ง⁽²⁾ คิดเป็นร้อยละ 10.27 ของจำนวนห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ที่มีอยู่ในประเทศไทย 1,957 แห่ง^(3, 4) การศึกษานี้ได้รวบรวมข้อมูลเชิงประจักษ์ที่ได้ดำเนินการผ่านมาตั้งแต่ พ.ศ. 2545 ถึง พ.ศ. 2562 เพื่อแสดงผลลัพธ์ของความสำเร็จบางส่วน และแสดงผลการวิเคราะห์กระบวนการที่ได้จัดตั้งมา ใช้การสืบค้นหาปัจจัยที่เป็นจุดอ่อน จุดแข็ง อุปสรรค และโอกาส เพื่อเร่งส่งเสริมคุณภาพห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ของประเทศไทยที่สามารถให้บริการตามมาตรฐานสากลมากยิ่งขึ้นไปอย่างต่อเนื่อง รวมถึงให้เกิดการพัฒนาแบบก้าวกระโดดในอนาคตต่อไป

วิธีการศึกษา

1. การจัดตั้งระบบการรับรองห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ให้สอดคล้องมาตรฐานสากล ISO/IEC 17011⁽⁵⁾

กลุ่มรับรองห้องปฏิบัติการ สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ได้ริเริ่มจัดตั้งโปรแกรมการรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ตามมาตรฐานสากลให้เป็นไปตามมาตรฐาน ISO/IEC 17011: Conformity assessment – Requirements for accreditation bodies accrediting conformity assessment bodies โดยมุ่งผลให้โปรแกรมเป็นที่ยอมรับ และได้ลงนามยอมรับร่วม (Mutual Recognition Arrangement, MRA) กับองค์การระดับภูมิภาค คือ Asia Pacific Accreditation Cooperation (APAC) และองค์การระดับโลก คือ International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC) โดยเริ่มต้นจากการศึกษาด้วยตนเอง (Self-Learning) เรียนรู้จากแหล่งข้อมูลนานาชาติที่ตีพิมพ์ในสื่อสิ่งพิมพ์ต่าง ๆ จัดหลักสูตรอบรมและเชิญวิทยากรต่างประเทศมาบรรยายเกี่ยวกับมาตรฐาน ISO/IEC 17011 และ ISO 15189 รวมถึงเรียนรู้จากการเข้าร่วมประชุมประจำปีในฐานะสมาชิกของ APAC และ ILAC อีกทั้งมีกระบวนการเรียนรู้จากการลงมือปฏิบัติจริง (Learning by doing) โดยจัดทำโปรแกรมการรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ที่เป็นลายลักษณ์อักษร แล้วนำไปใช้ปฏิบัติตาม และมีการทบทวนปรับปรุงแก้ไขอย่างสม่ำเสมอ นอกจากนั้นได้นำระบบ Fast Track มาปรับใช้ ในกรณีที่ห้องปฏิบัติการยื่นขอการรับรองมีเหตุผลความจำเป็นเร่งด่วน หน่วยรับรองได้ประกันเวลาให้กระบวนการรับรองแล้วเสร็จลดลงจากปกติ 220 วัน เหลือไม่เกิน 90 วัน อีกทั้งในปี พ.ศ. 2562 ได้พัฒนาโปรแกรมอิเล็กทรอนิกส์นำกระบวนการ e-Accreditation มาใช้ในการรับรองห้องปฏิบัติการ โดยเอกสารของห้องปฏิบัติการที่ต้องส่งมาให้

ใช้ดำเนินการและรายงานผลของผู้ตรวจประเมิน จัดทำในรูปแบบเอกสารอิเล็กทรอนิกส์ทั้งหมด จึงเป็นการลดการใช้กระดาษทำสำเนาเอกสาร รวมถึงลดเวลาที่ใช้ในการขนส่งเอกสารด้วย และได้ประกันเวลาดำเนินการไม่เกิน 120 วัน

2. การวิเคราะห์เชิงคุณภาพและความสามารถของห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ที่เข้าสู่กระบวนการรับรองมาตรฐานสากล

รวบรวมข้อมูลจากการตรวจประเมินห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ทั้งภาครัฐและเอกชนในประเทศไทย ที่ผ่านการรับรองตามมาตรฐานสากล ISO 15189 ฉบับที่เป็นปัจจุบันอยู่เสมอ (ฉบับล่าสุด ISO 15189: 2012, third edition) แล้วนำมาศึกษาวิเคราะห์ประเด็นที่ต้องนำไปปรับปรุงเชิงคุณภาพและความสามารถของห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ต่อไป

3. การวิเคราะห์กระบวนการดำเนินงานของโปรแกรมการรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์

นำข้อมูลผลการดำเนินการโปรแกรมการรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ตามมาตรฐานสากล มาวิเคราะห์โดยใช้หลักการวิเคราะห์ตามระบบที่นิยมในสากล SWOT Matrix^(6, 7) เพื่อค้นหาปัจจัยที่เป็นจุดแข็ง จุดอ่อน โอกาส และอุปสรรค เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการวางแผนพัฒนาโปรแกรมการรับรองต่อไปในอนาคต

4. แนวทางใหม่สู่การปรับปรุงหน่วยรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์

นำเสนอแนวทางใหม่สู่การปรับปรุงหน่วยรับรองห้องปฏิบัติการและการพัฒนาคุณภาพห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ทั้งภาครัฐและเอกชนในประเทศไทย โดยเสนอการปรับปรุงโครงสร้างการบริหารจัดการหน่วยรับรอง ในภาพรวมของประเทศไทย

ผล

1. การจัดตั้งระบบรับรองห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ให้สอดคล้องมาตรฐานสากล ISO/IEC 17011

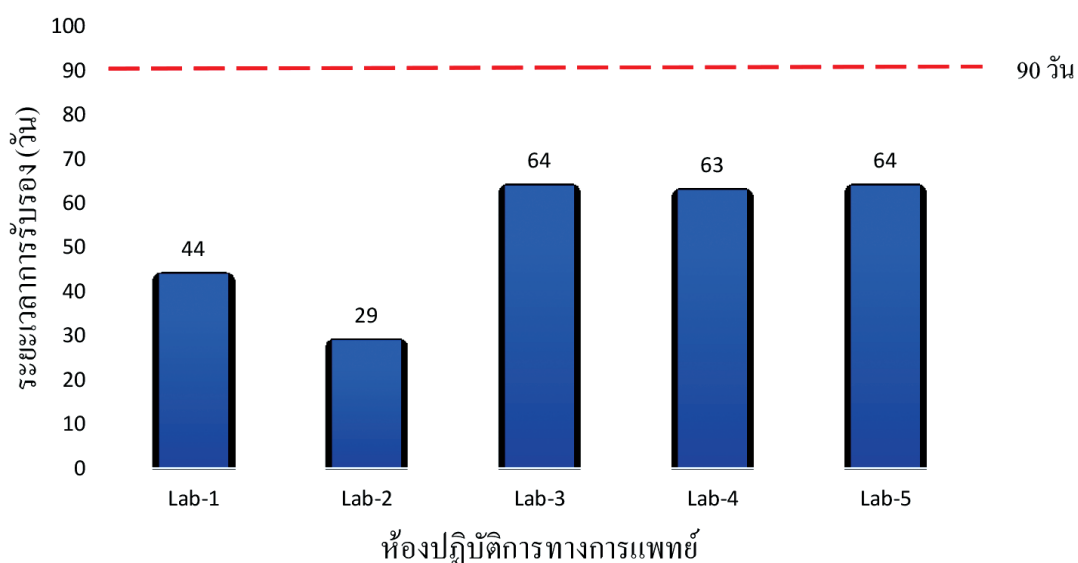
สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เป็นหน่วยงานแรกและหน่วยงานเดียวในประเทศไทย ที่ได้เปิดโปรแกรมการรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ที่มีบริการทดสอบตัวอย่างจากมนุษย์สอดคล้องตามมาตรฐานสากล ISO 15189 โดยสร้างระบบบริหารจัดการกระบวนการรับรองที่เป็นไปตามข้อกำหนดของหน่วยรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานสากล ISO/IEC 17011 เริ่มจากการสร้างสิ่งจำเป็นพื้นฐานในกระบวนการรับรองที่สำคัญ 4 ด้าน ได้แก่

1.1 การจัดทำระบบรับรองห้องปฏิบัติการที่เป็นลายลักษณ์อักษรหรือเอกสาร

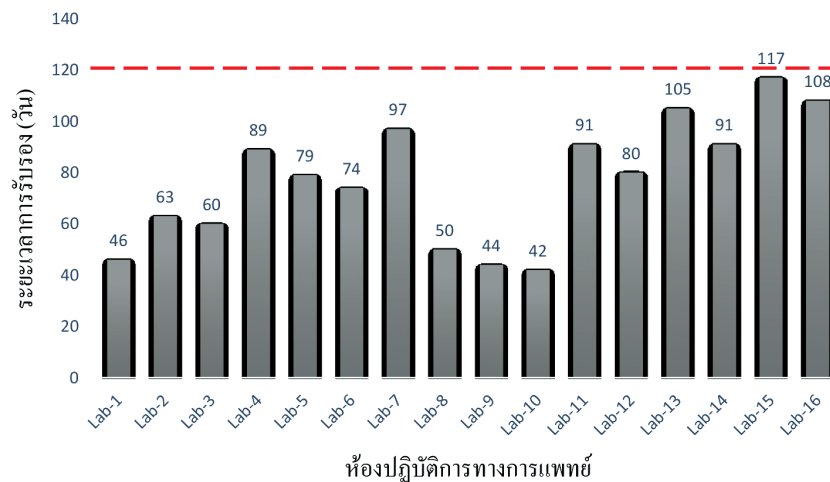
การพัฒนาโปรแกรมการรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ เริ่มจากบุคลากรที่รับผิดชอบในกลุ่มรับรองห้องปฏิบัติการค้นคว้าทำความเข้าใจกระบวนการรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ โดยการศึกษามาตรฐาน ISO/IEC 17011, ISO 15189, เอกสารของ APAC และ ILAC ที่เกี่ยวข้อง และเอกสารการรับรองระบบงานที่ประเทศสมาชิก APAC และ ILAC ได้จัดทำออกมาใช้จากนั้นได้เร่งสร้างโอกาสเรียนรู้ทำความเข้าใจมากขึ้นจากการเข้าร่วมการอบรมด้านมาตรฐาน ISO/IEC 17011 ที่มีการเปิดอบรมขึ้นในประเทศไทย และจากการร่วมประชุมในกลุ่มประเทศสมาชิก APAC และ ILAC พร้อมเร่งจัดทำเอกสาร และมาตรฐานการปฏิบัติงาน (Standard Operating Procedure, SOP) ตามที่ ISO/IEC 17011 กำหนดให้ใช้ในกระบวนการบริหารจัดการของหน่วยรับรองรวมจำนวน 21 เรื่อง ตัวอย่างมาตรฐานการปฏิบัติงาน (SOP) ที่หน่วยรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการได้จัดทำขึ้น เช่น เรื่องการรับรองห้องปฏิบัติการ, เรื่องการคัดเลือก การพัฒนา และการอบรมผู้ตรวจประเมิน, เรื่องการแต่งตั้งผู้ตรวจประเมิน, เรื่องการระงับ การเพิกถอน และการปรับลดการรับรอง

ห้องปฏิบัติการ, เรื่องการตรวจเฝ้าระวังและการตรวจประเมินซ้ำห้องปฏิบัติการ, เรื่องการจัดการข้อร้องเรียนเกี่ยวกับการรับรองห้องปฏิบัติการ และเรื่องการขยายขอบข่ายการรับรองห้องปฏิบัติการ เป็นต้น อนึ่ง ยังมีเอกสารบางส่วนที่จัดทำเพื่อให้ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์นำไปใช้ปฏิบัติตามจำนวนรวม 16 เรื่อง เช่น นโยบายการรับรองความสามารถการทดสอบด้านการแพทย์และสาธารณสุข, Supplement Requirements for Medical Laboratory, Supplement Requirements for Surgical Pathology Laboratory, ข้อกำหนดเพิ่มเติมด้านวิชาการตามมาตรฐาน ISO 15189 สาขาโลหิตวิทยาและการแข็งตัวของเลือด, ข้อกำหนดเพิ่มเติมด้านวิชาการตามมาตรฐาน ISO 15189 สาขาเคมีคลินิก, ข้อกำหนดเพิ่มเติมด้านวิชาการตามมาตรฐาน ISO 15189 สาขาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก, ข้อกำหนดเพิ่มเติมด้านวิชาการตามมาตรฐาน ISO 15189 สาขานาการเลือด และ Supplement Requirements for Cytopathology Laboratory เป็นต้น ซึ่งเอกสารเหล่านี้มีการทบทวนปรับปรุงอย่างสม่ำเสมอ และได้้นำออกแสดงไว้ในรูปแบบเอกสารอิเล็กทรอนิกส์ ในเว็บไซต์ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นอกจากนี้มีการออกแบบฟอร์มให้ผู้ตรวจประเมินใช้ประกอบการตรวจประเมินห้องปฏิบัติการ เพื่อบันทึกผลการตรวจประเมินไว้เป็นหลักฐานที่ทวนสอบกลับได้ ตัวอย่างเช่น แบบฟอร์มการรักษาข้อมูลที่เป็นความลับและการไม่มีผลประโยชน์ทับซ้อน, แบบรายงานการตรวจประเมินห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ แบบบันทึกผลการตรวจประเมินห้องปฏิบัติการทางการแพทย์, Worksheet for registration list of assessor team meeting, แบบบันทึกหลักฐานที่ผู้ตรวจประเมินพบจากการตรวจประเมิน, แบบบันทึกรายงานข้อมูลที่มีการเปลี่ยนแปลง/ปัญหาที่พบจากการตรวจประเมิน, การสอบผู้มีสิทธิ์ลงนามตรวจสอบใบรายงานผล (Approved signatory) และทะเบียนผู้เข้าร่วมประชุมการตรวจประเมินเพื่อรับรองห้องปฏิบัติการ เป็นต้น

จากการนำระบบ Fast Track มาปรับใช้ในกระบวนการรับรองห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ทำให้ลดกระบวนการรับรองจาก 220 วัน ลงมาเหลือเฉลี่ย 53 วัน โดยในปี พ.ศ. 2562 มีจำนวนห้องปฏิบัติการที่ผ่านการรับรอง 5 แห่ง นอกจากนี้ได้ใช้กระบวนการ e-Accreditation ทำให้ใช้เวลาในการรับรองห้องปฏิบัติการโดยเฉลี่ยเพียง 77 วัน โดยผ่านการรับรองจำนวน 16 แห่ง ดังแสดงในภาพที่ 1 ห้องปฏิบัติการผ่านการรับรองในระบบ Fast Track และดังแสดงในภาพที่ 2 ห้องปฏิบัติการที่ผ่านการรับรองด้วยระบบ e-Accreditation ตามลำดับ



ภาพที่ 1 ห้องปฏิบัติการผ่านการรับรองในระบบ Fast Track ใช้เวลา 29-64 วัน (เฉลี่ย 52.8 วัน)



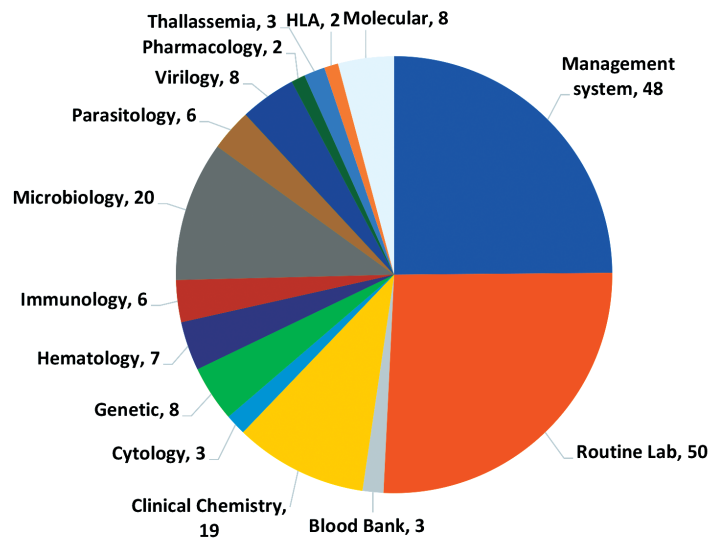
ภาพที่ 2 ห้องปฏิบัติการผ่านการรับรองด้วยระบบ e-Accreditation ใช้เวลา 42-117 วัน (เฉลี่ย 77.3 วัน)

1.2 ทรัพยากรบุคคล

ทรัพยากรบุคคลที่เกี่ยวข้องในโปรแกรมรับรองห้องปฏิบัติการทางการแพทย์มี 3 ส่วน ประกอบด้วย

- 1) บุคลากรภายในหน่วยรับรองที่ต้องรับผิดชอบกระบวนการรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการ
- 2) ผู้ตรวจประเมินที่ต้องรับผิดชอบออกตรวจห้องปฏิบัติการที่ยื่นขอรับรอง
- 3) บุคลากรที่เป็นคณะกรรมการและคณะกรรมการที่พิจารณาผลการตรวจประเมินเพื่อนำไปสู่การตัดสินใจอนุมัติให้การรับรองคุณภาพห้องปฏิบัติการ ซึ่งบุคลากรทั้งหมดต้องมีความสามารถในงานที่ได้รับมอบหมาย

อนึ่ง การบริหารจัดการทรัพยากรบุคคลภายในโปรแกรมรับรองห้องปฏิบัติการทางการแพทย์เริ่มจากมีข้าราชการประจำที่เป็นทีมดำเนินการเพียง 4 ตำแหน่ง เท่านั้น จึงจำเป็นต้องพึ่งพาทรัพยากรบุคคลจากหน่วยงานภายนอกสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการในส่วนที่ต้องปฏิบัติหน้าที่เป็นผู้ตรวจประเมินห้องปฏิบัติการที่ยื่นขอรับรองมาตรฐาน ISO 15189 จากตั้งต้นมีผู้ตรวจประเมินเพียง 3 คน ที่เป็นบุคลากรในกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จึงได้สร้างผู้ตรวจประเมินให้มากขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยจัดทำหลักสูตรการอบรมผู้ตรวจประเมินตามมาตรฐานที่กำหนดโดย APAC⁽⁸⁾ ประกอบด้วยภาคบรรยายและภาคปฏิบัติที่มีเนื้อหาเกี่ยวกับการตีความในข้อกำหนดด้านคุณภาพและวิชาการตามมาตรฐาน ISO 15189 ข้อกำหนดของหน่วยรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการ ISO/IEC 17011 และแนวทางการตรวจประเมินระบบบริหาร ISO 9001⁽⁹⁾ รวมทั้งข้อกำหนดและเงื่อนไขการรับรองห้องปฏิบัติการทางการแพทย์และแนวทางปฏิบัติที่หน่วยรับรองจัดทำขึ้นมาบังคับใช้ รวมระยะเวลาการอบรมไม่น้อยกว่า 40 ชั่วโมง ซึ่งผู้ที่ผ่านการอบรมหลักสูตรเท่านั้นจึงจะได้รับการขึ้นทะเบียนเป็นผู้ตรวจประเมินของโปรแกรมการรับรองห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ การอบรมจัดขึ้นแทบทุกปี จนถึงปี พ.ศ. 2562 มีผู้ตรวจประเมินด้านระบบบริหารคุณภาพจำนวนรวม 48 คน และผู้ตรวจประเมินด้านวิชาการจำนวนรวม 145 คน ที่มีความเชี่ยวชาญเชิงวิชาการในสาขาแตกต่างกันไป เช่น โลหิตวิทยา เคมีคลินิก ภูมิคุ้มกันวิทยา จุลชีววิทยา ไวรัสวิทยา จุลทรรศน์ศาสตร์ อนุชีวโมเลกุล มนุษยพันธุศาสตร์ เซลล์วิทยา และพยาธิวิทยา เป็นต้น ดังแสดงในภาพที่ 3 จำนวนผู้ตรวจประเมินด้านระบบบริหารคุณภาพและด้านวิชาการ รวมจำนวน 193 คน ทั้งนี้ร้อยละ 90 ของจำนวนผู้ตรวจประเมินทั้งหมดเป็นบุคลากรที่อาสาสมัครมาจากหน่วยงานภายนอก ได้แก่ จากมหาวิทยาลัย และสถานพยาบาลต่างๆ ส่วนอีกร้อยละ 10 เป็นข้าราชการประจำและข้าราชการบำนาญของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ด้วยความจำเป็นต้องใช้ทรัพยากรบุคคลจากภายนอกปฏิบัติหน้าที่แทนหน่วยรับรอง เพื่อออกตรวจประเมิน ณ สถานปฏิบัติการจริงของห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่ภายในของหน่วยรับรองเองจึงต้องทำหน้าที่ประสานขอความร่วมมือจากผู้ที่ได้ผ่านการอบรมหลักสูตรและขึ้นทะเบียนเป็นผู้ตรวจประเมินแล้ว เพื่อขอให้สละเวลาและใช้ความสามารถเฉพาะบุคคลออกไปตรวจประเมินห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งที่ยื่นขอการรับรอง



ภาพที่ 3 จำนวนผู้ตรวจประเมินด้านระบบบริหารและด้านวิชาการรวมจำนวน 193 คน

ในปี พ.ศ. 2562 กลุ่มรับรองห้องปฏิบัติการ ISO 15189 มีเจ้าหน้าที่รับผิดชอบปฏิบัติงาน (Case officer) ทั้งหมดจำนวน 10 คน แบ่งเป็นนักเทคนิคการแพทย์ 5 คน และนักวิทยาศาสตร์การแพทย์ 5 คน มีประสบการณ์ด้านการรับรองตั้งแต่ 1–20 ปี โดยเฉลี่ย 6 ปี เนื่องจากงานด้าน ISO 15189 ต้องใช้ความรู้ที่เป็นวิชาชีพเฉพาะด้านค่อนข้างมาก ตำแหน่งที่เป็นข้าราชการมีเพียง 3 ตำแหน่ง ที่เหลือเป็นพนักงานกระทรวงสาธารณสุข จึงเป็นปัญหาด้านความมั่นคงในอาชีพ ทำให้หน่วยงานไม่สามารถวางแผนเพิ่มอัตรากำลังคนที่มีความสามารถในสาขาที่จำเป็นได้

1.3 การลงนามยอมรับร่วม (Mutual Recognition Arrangement, MRA) กับองค์การระหว่างประเทศ Asia Pacific Accreditation Cooperation (APAC) และ International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC)

เพื่อให้การรับรองห้องปฏิบัติการของสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการเป็นที่ยอมรับขององค์การระหว่างประเทศ ผลการตรวจจากห้องปฏิบัติการที่ผ่านการรับรองสามารถนำไปใช้ได้ในประเทศโดยไม่ต้องตรวจซ้ำ ดังนั้นเมื่อสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการได้ให้การรับรองห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ไปบางส่วนแล้ว จึงขอรับการตรวจประเมินจาก Peer Evaluators ของ APAC และ ILAC จนผ่านการยอมรับเข้าเป็นสมาชิก APAC-MRA เมื่อวันที่ 18 เมษายน พ.ศ. 2550 และถูกเสนอให้เป็นสมาชิก ILAC-MRA ในโปรแกรมรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ในเวลาต่อมา ทั้งนี้ได้รับการตรวจประเมินจาก Peer Evaluators เข้าในทุก ๆ 4 ปี โดยรับการตรวจประเมินครั้งล่าสุดเมื่อวันที่ 19 – 23 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2561 การได้เป็นสมาชิกขององค์การรับรองห้องปฏิบัติการระดับนานาชาติอย่างต่อเนื่องจนถึงปัจจุบัน ย่อมเป็นการประกันด้านคุณภาพและมาตรฐานของโปรแกรมการรับรอง ยิ่งไปกว่านั้น บุคลากรจากหน่วยรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ของประเทศไทยยังได้รับเชิญเข้าร่วมเป็น Peer Evaluator ในทีมของ APAC ที่ไปตรวจประเมินโปรแกรมการรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ของหน่วยรับรองในประเทศต่าง ๆ ได้แก่ สาธารณรัฐประชาชนจีน ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา ฮองกง และแคนาดา ย่อมเป็นการยืนยันว่าหน่วยรับรองของประเทศไทยมีศักยภาพจนเป็นที่ยอมรับในระดับนานาชาติ

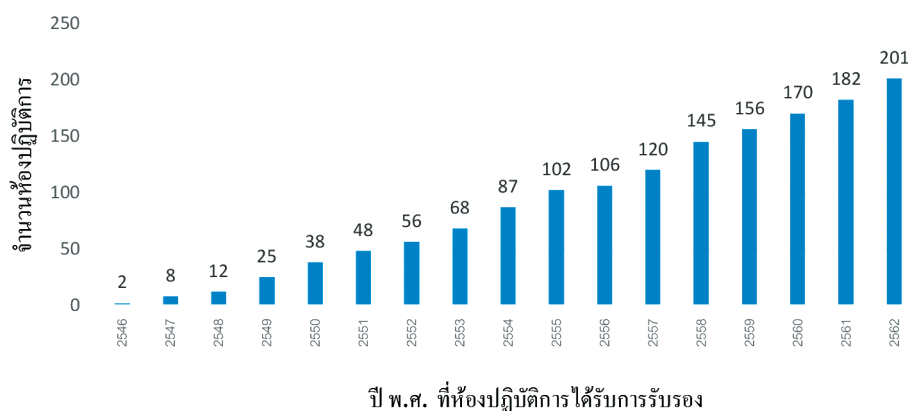
1.4 ระบบจัดการข้อมูลสารสนเทศของหน่วยรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการ

สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ จัดตั้งเว็บไซต์ของหน่วยรับรอง⁽²⁾ <http://blqs.dmsc.moph.go.th/> ที่มีการเผยแพร่เอกสารซึ่งห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ต้องรับทราบและนำไปใช้ปฏิบัติตาม รวมถึงมีการเผยแพร่รายชื่อห้องปฏิบัติการพร้อมรายการทดสอบที่ผ่านการรับรอง ISO 15189 ไว้ด้วย การมีเว็บไซต์ดังกล่าวเปิดโอกาสให้มีการพัฒนาระบบการรับรองแบบอิเล็กทรอนิกส์ e-Accreditation เข้ามาใช้ร่วมกับกระบวนการรับรองระบบงาน

ห้องปฏิบัติการแบบเดิมที่มีการใช้เอกสารในรูปแบบกระดาษในปริมาณมาก เช่น เอกสารด้านระบบบริหารคุณภาพ และด้านวิชาการของห้องปฏิบัติการที่ผู้ตรวจประเมินนำไปศึกษาก่อนการตรวจประเมิน รายงานผลการตรวจประเมิน ห้องปฏิบัติการซึ่งมีข้อบกพร่องหรือข้อสังเกต ผลการพิจารณาของคณะกรรมการ เป็นต้น เอกสารเหล่านี้จำเป็นต้องจัดเก็บไว้เป็นหลักฐาน เมื่อห้องปฏิบัติการที่ผ่านการรับรองมีจำนวนมากขึ้นจึงทำให้ขาดพื้นที่เก็บรักษาเอกสาร ดังนั้น การใช้สารสนเทศในรูปแบบ e-Accreditation จึงมีส่วนช่วยประหยัดกระดาษและลดพื้นที่ในการจัดเก็บเอกสารลงได้ ไม่น้อยกว่าร้อยละ 90

2. คุณภาพและความสามารถของห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ที่เข้าสู่กระบวนการรับรองมาตรฐานสากล

หลังจากที่บุคลากรผู้รับผิดชอบได้สร้างโปรแกรมการรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ของสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ขึ้นมาเป็นลายลักษณ์อักษรที่สอดคล้องกับข้อกำหนดของมาตรฐานหน่วยรับรอง ISO/IEC 17011 และนำมาบังคับใช้ปฏิบัติจริง จึงได้เปิดบริการรับรองห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ตามมาตรฐาน ISO 15189: 2003 ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2546 โดยมีห้องปฏิบัติการที่ได้รับการตรวจประเมินจนสามารถผ่านการรับรองรายแรกเมื่อวันที่ 30 เมษายน พ.ศ. 2547 จากนั้นก็ได้มีการเพิ่มจำนวนขึ้นไปอย่างช้า ๆ จากปีที่ 1 เมื่อ พ.ศ. 2547 จำนวน 2 ห้องปฏิบัติการ กระทั่งถึงปีที่ 17 เมื่อ พ.ศ. 2562 มีห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ผ่านการรับรองสะสมจำนวนรวม 201 (10.27%) แห่ง จากจำนวนของห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ที่มีอยู่ในประเทศไทย จำนวน 1,957 แห่ง^(3, 4) ทั้งนี้จำนวนห้องปฏิบัติการที่ผ่านการรับรองสะสมในแต่ละปีดังแสดงในภาพที่ 4 จำนวนสะสมของห้องปฏิบัติการที่ผ่านรับรอง ISO 15189: 2012



ภาพที่ 4 จำนวนสะสมของห้องปฏิบัติการที่ผ่านรับรอง ISO 15189

จากรายงานผลการตรวจประเมินห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ มีการพบข้อบกพร่องที่ไม่สอดคล้องกับข้อกำหนดตามมาตรฐาน ISO 15189 ทั้งด้านระบบบริหารคุณภาพและด้านวิชาการ⁽¹⁰⁾ จำนวนหนึ่ง มากหรือน้อยแตกต่างกันไป ซึ่งเป็นไปได้ว่าขึ้นกับจำนวนรายการทดสอบที่ยื่นขอรับรองมากหรือน้อยด้วย ตัวอย่างของข้อบกพร่องที่ไม่สอดคล้องกับข้อกำหนด 4 ด้าน ที่ส่งผลกระทบต่อความน่าเชื่อถือของรายงานผลที่ออกจากห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ได้แก่ คุณภาพของตัวอย่างส่งตรวจไม่เหมาะสม การประกันคุณภาพการทดสอบ (Internal Quality Control และ External Quality Assessment) ไม่ครบถ้วน เครื่องมือสำคัญไม่ได้รับการสอบเทียบ และปฏิบัติการแก้ไขสิ่งไม่สอดคล้องกับข้อกำหนดไม่เพียงพอ เป็นต้น โดยสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการได้ประสานให้ห้องปฏิบัติการดำเนินการแก้ไขปรับปรุงให้ตรงประเด็นด้วยวิธีการแตกต่างกันไปตามความเหมาะสม และพิจารณาให้การรับรองโดยคณะกรรมการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ โดยยึดถือตามข้อกำหนดมาตรฐาน ISO 15189 และหลักเกณฑ์เงื่อนไขของสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ

3. การวิเคราะห์กระบวนการดำเนินงานของโปรแกรมการรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ตามมาตรฐานสากล

คณะผู้ศึกษาได้รวบรวมข้อมูลมาดำเนินการวิเคราะห์ปัจจัยภายในและปัจจัยภายนอกที่มีผลกระทบต่อกระบวนการรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์โดยใช้ SWOT Matrix^(6,7) ผลจากการวิเคราะห์ได้แสดงถึงประเด็นสำคัญที่เป็นจุดแข็ง จุดอ่อน โอกาส และอุปสรรค แบ่งเป็นข้อ ๆ ดังนี้

3.1 จุดแข็งของกระบวนการรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (Strength, S)

S1 เป็นหน่วยงานเดียวในประเทศไทยที่ให้การรับรอง ISO 15189

S2 ให้การรับรอง MOPH standard ซึ่งเป็นมาตรฐานที่เป็น Stepwise ไปสู่ ISO 15189

S3 มีสายสัมพันธ์อันดีกับผู้เชี่ยวชาญในวิชาชีพ

S4 มีกระบวนการรับรองที่เป็นไปตามมาตรฐานสากล ISO/IEC 17011 ซึ่งได้รับการยอมรับ (MRA)

จากองค์การระหว่างประเทศ APAC และ ILAC

S5 ผู้บริหารสูงสุดให้ความสำคัญและให้การสนับสนุนการรับรองคุณภาพ

3.2 จุดอ่อนของกระบวนการรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (Weakness, W)

W1 ไม่มีการกำหนดกลยุทธ์และค่านิยมร่วมด้านการรับรองห้องปฏิบัติการทางการแพทย์

W2 กระบวนการรับรองมีหลายขั้นตอนและใช้ระบบเอกสารในทุกขั้นตอนทำให้ล่าช้า

W3 ขาดการใช้ไอทีเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพระบบ

W4 เจ้าหน้าที่ไม่มีความเชี่ยวชาญในด้านวิชาการบางสาขา

W5 การบริหารคนเพื่อมีความสุขในการทำงานยังไม่ชัดเจน (Happiness work place) ก่อให้เกิดความเครียดในการทำงาน

3.3 ปัจจัยที่เป็นโอกาสของกระบวนการรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (Opportunity, O)

O1 หน่วยงานภาครัฐหลายแห่งมีนโยบายให้ห้องปฏิบัติการในสังกัดทั่วประเทศ ผ่านการรับรอง ISO 15189

O2 มีโปรแกรมการรับรองห้องปฏิบัติการด้วยระบบอิเล็กทรอนิกส์

O3 มี Social media ที่เข้าถึงได้ง่าย และรวดเร็ว

O4 พ.ร.บ.ปฏิรูปประเทศ พ.ศ. 2560 กำหนดให้หน่วยรับรองระบบงานทุกแห่งรวมกันเป็นหน่วยงานเดียว (Single agency)

O5 นโยบายปฏิรูประบบราชการมุ่งเน้นการเพิ่มประสิทธิภาพงานบริการ

3.4 ปัจจัยที่เป็นอุปสรรคของกระบวนการรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (Threat, T)

T1 มุมมองของห้องปฏิบัติการต่อการรับรอง ISO 15189 มองว่ายากเกินไป แพงเกินไป ช้า และต้องทำเอกสารจำนวนมาก

T2 ผู้ตรวจประเมินมากกว่าร้อยละ 90 เป็นผู้ตรวจประเมินจากภายนอกที่มีภารกิจอื่นเป็นงานประจำ

T3 ผู้ตรวจประเมินตีความข้อกำหนดมาตรฐานแตกต่างกัน

T4 ห้องปฏิบัติการตีความและประยุกต์ใช้ข้อกำหนดไม่ถูกต้อง

T5 เศรษฐกิจโลกและประเทศอยู่ในช่วงชะลอตัว

คณะผู้ศึกษาได้นำข้อมูลของผลการวิเคราะห์ SWOT Matrix ดังแสดงข้างต้นไปสู่การพิจารณาเพื่อวางแผนทางพัฒนาปรับปรุงกระบวนการรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ โดยใช้ TOWS Matrix⁽¹¹⁾

4. แนวทางใหม่สู่การปรับปรุงหน่วยรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์

4.1 พิจารณาเหตุผลความจำเป็นในการพัฒนาปรับปรุงกระบวนการรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ โดยมี 6 กลยุทธ์ ดังต่อไปนี้

1. กลยุทธ์การยกระดับศักยภาพห้องปฏิบัติการและสร้างเครือข่ายห้องปฏิบัติการที่เป็นมาตรฐานสากล (S1-T4)

1.1 มีการจัดทำหลักสูตรอบรมบุคลากรในตำแหน่งที่สำคัญของห้องปฏิบัติการ ดังแสดงในตารางที่ 1 ได้แก่

1) หลักสูตรสำหรับผู้จัดการคุณภาพ

เนื่องจากผู้จัดการคุณภาพเป็นบุคลากรที่สำคัญมากในการขับเคลื่อนระบบคุณภาพของห้องปฏิบัติการ สามารถเป็นตัวแทนหน่วยรับรองในการธำรงรักษามาตรฐานได้อย่างใกล้ชิดแบบวันต่อวัน ทำให้ห้องปฏิบัติการมีคุณภาพอย่างยั่งยืน จึงต้องสร้างความเข้มแข็งให้ผู้จัดการคุณภาพให้มีความรู้ความเข้าใจข้อกำหนดมาตรฐาน การตีความ การประยุกต์ใช้ การแก้ไขปัญหาอย่างเป็นระบบ ตั้งแต่การวิเคราะห์สาเหตุ (Root cause analysis) การป้องกันการเกิดซ้ำ การตรวจติดตามคุณภาพภายใน การตรวจสอบตัวชี้วัดระบบคุณภาพ เป็นต้น

2) หลักสูตรสำหรับบุคลากรหลักด้านจัดการคุณภาพ และผู้เกี่ยวข้อง

เพื่อให้บุคลากรห้องปฏิบัติการได้มีความรู้ในการประยุกต์ใช้ข้อกำหนดมาตรฐานได้อย่างถูกต้องเหมาะสมกับบริบทของแต่ละห้องปฏิบัติการ รวมถึงการแก้ไขข้อบกพร่อง และการวิเคราะห์สาเหตุของปัญหาได้อย่างถูกต้อง สามารถแก้ปัญหาในระบบคุณภาพได้อย่างตรงประเด็น

3) หลักสูตรเบื้องต้นสำหรับห้องปฏิบัติการที่ต้องการยื่นขอการรับรองใหม่

พบว่าความล่าช้าในกระบวนการรับรองจากห้องปฏิบัติการที่ยื่นขอการรับรองใหม่เตรียมเอกสารไม่ถูกต้องและไม่ครบถ้วน จึงต้องให้ความรู้ในการจัดเตรียมเอกสารหลักฐานเพื่อยื่นขอการรับรอง รวมถึงการให้ความรู้พื้นฐาน ISO 15189/ISO 15190 การธำรงรักษาและปรับปรุงระบบคุณภาพอย่างต่อเนื่อง

ตารางที่ 1 รายละเอียดของหลักสูตรอบรมบุคลากรในตำแหน่งที่สำคัญของห้องปฏิบัติการ

หลักสูตร	ชั่วโมง
ผู้จัดการคุณภาพ	
ข้อกำหนด ISO 15189/ISO 15190/BLQS's requirements การตีความและประยุกต์ใช้	9
เทคนิคการตรวจประเมินตามมาตรฐาน ISO 19011	2
หลักการเขียนข้อบกพร่อง/หลักการแก้ไขข้อบกพร่อง	1
Root cause analysis	2
การธำรงรักษาและปรับปรุงระบบคุณภาพอย่างต่อเนื่อง	1
ฝึกปฏิบัติการตรวจประเมิน	3
รวม	18
บุคลากรหลักด้านจัดการคุณภาพ และผู้เกี่ยวข้อง	
ข้อกำหนด ISO 15189/ISO 15190/BLQS's requirements การตีความและประยุกต์ใช้	3
หลักการแก้ไขข้อบกพร่อง	1
Root cause analysis	1
การธำรงรักษาและปรับปรุงระบบคุณภาพอย่างต่อเนื่อง	1
รวม	6

ตารางที่ 1 รายละเอียดของหลักสูตรอบรมบุคลากรในตำแหน่งที่สำคัญของห้องปฏิบัติการ (ต่อ)

เบื้องต้นสำหรับห้องปฏิบัติการที่ต้องการยื่นขอการรับรองใหม่	
พื้นฐาน ISO 15189/ISO 15190/BLQS's requirements การตีความและประยุกต์ใช้	3
ขั้นตอนการจัดเตรียมเอกสาร/หลักฐานเพื่อยื่นขอการรับรอง การธำรงรักษาและปรับปรุงระบบคุณภาพอย่างต่อเนื่อง	3
รวม	6

- 1.2 การร่วมมือกับสถาบันการศึกษา เพื่อจัดทำ e-Learning
- 1.3 การจัดทำ Quality Management Tools ได้แก่ Quality Document Template (QM, QP, WI, etc.) และ Specific Requirement/Checklist ครอบคลุมทุกสาขาวิชา
- 1.4 การจัดตั้งเครือข่ายห้องปฏิบัติการ ISO 15189 โดยจัดทำชุมชนแลกเปลี่ยนเรียนรู้ระบบคุณภาพผ่าน Social media และการจัดตั้งเครือข่ายห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ด้านอนุชีวโมเลกุลเพื่อรองรับการระบาดของโรคอุบัติใหม่/อุบัติซ้ำ
2. กลยุทธ์การยกระดับมาตรฐานห้องปฏิบัติการจากมาตรฐานประเทศสู่มาตรฐานสากล (S2-T1)
 - 2.1 การรับรอง MOPH standard สู่ ISO 15189
 - 2.2 การรับรองห้องปฏิบัติการเครือข่ายตรวจ SAR-CoV-2 สู่ ISO 15189
3. กลยุทธ์การสร้างและพัฒนาผู้ตรวจประเมินให้ได้มาตรฐานเดียวกัน (S1-T3)
 - 3.1 การ Harmonize ผู้ตรวจประเมิน โดยการจัดทำคู่มือการตรวจประเมินฉบับย่อ และจัดทำหลักสูตรอบรม/ฟื้นฟูผู้ตรวจประเมินออนไลน์
 - 3.2 การจ้างเหมาหัวหน้าคณะผู้ตรวจประเมิน
 - 3.3 การประเมิน/ติดตามตรวจสอบความสามารถของผู้ตรวจประเมิน
4. กลยุทธ์การยกระดับศักยภาพบุคลากรภายในหน่วยรับรอง (S1-W1)
 - 4.1 การพัฒนาผู้เป็นหัวหน้าคณะผู้ตรวจประเมิน/ผู้ตรวจประเมินด้านวิชาการ
 - 4.2 การพัฒนาผู้เป็น APAC evaluator
 - 4.3 การพัฒนาผู้บรรยายด้านกระบวนการรับรองห้องปฏิบัติการ และมาตรฐานต่างๆ ทางห้องปฏิบัติการที่เกี่ยวข้อง
5. กลยุทธ์การเพิ่มประสิทธิภาพและลดเวลาของกระบวนการรับรอง (S5-O2)
 - 5.1 การรับรองห้องปฏิบัติการด้วยระบบอิเล็กทรอนิกส์ (e-Accreditation)
 - 5.2 การรับรองห้องปฏิบัติการด้วยระบบ Fast Track
 - 5.3 การจัดทำข้อกำหนดเพื่อลดขั้นตอนการรับรอง ได้แก่ แนวทางการสุ่มตรวจประเมินรายการทดสอบ (Sampling scope) กรอบแนวทางการตรวจประเมินเฉพาะประเด็นสำคัญ (Critical point assessment) และแนวทางการทำ Flexible scope
 - 5.4 ทบทวน/ออกแบบกระบวนการรับรองให้มีประสิทธิภาพด้วย Core process redesign, Knowledge management, Kaizen
6. กลยุทธ์การสื่อสารและประชาสัมพันธ์เชิงรุก (S1-O1)
 - 6.1 การสื่อสารประชาสัมพันธ์การรับรอง ISO 15189 โดยการประชาสัมพันธ์เจาะกลุ่มเป้าหมายหน่วยงานที่มีห้องปฏิบัติการเครือข่าย

6.2 จัดทำ Web page เครือข่าย ISO 15189 สำหรับผู้ตรวจประเมิน โดยหลักสูตรอบรมออนไลน์ และการ update ประเด็นคุณภาพ ส่วนห้องปฏิบัติการนั้นต้องจัดให้มีหลักสูตรอบรมออนไลน์ การ update ประเด็นคุณภาพ และ Best practice ห้องปฏิบัติการที่ผ่านการรับรอง (ขนาดเล็ก ขนาดใหญ่ เครือข่ายภาครัฐ เครือข่ายภาคเอกชน)

4.2 การปรับปรุงโครงสร้างการบริหารหน่วยรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการของประเทศไทย

เนื่องจากประเทศไทยมีองค์กรที่เป็นหน่วยรับรอง 4 แห่ง ที่แบ่งภารกิจตามความเชี่ยวชาญ โดยมีสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม ให้บริการรับรองระบบงานหน่วยรับรอง (ISO/IEC 17021), หน่วยตรวจ (ISO/IEC 17020), ห้องปฏิบัติการทดสอบและห้องปฏิบัติการสอบเทียบ (ISO/IEC 17025) กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ได้รับผิดชอบให้บริการรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการด้านฟิสิกส์ เคมี วิทยาศาสตร์ชีวภาพ (ISO/IEC 17025) หน่วยจัดโปรแกรมการทดสอบความชำนาญ (ISO/IEC 17043) และหน่วยผลิตวัสดุอ้างอิง (ISO 17034) สำหรับกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ได้ให้บริการรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการด้านการแพทย์ (ISO 15189) ด้านสาธารณสุข (ISO/IEC 17025) และหน่วยผลิตวัสดุอ้างอิง (ISO 17034) โดยมีสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เป็นหน่วยรับรองระบบความปลอดภัยของอาหาร (ISO/IEC 17021) หน่วยรับรองผลิตภัณฑ์เกษตรอินทรีย์ (ISO/IEC 17065) และการปฏิบัติการทางการเกษตรที่ดี (Good Agricultural Practice, GAP) (ISO/IEC 17020) ดังนั้นคณะผู้ศึกษาและผู้เกี่ยวข้องในสำนักงานมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์จึงได้เสนอการจัดโครงสร้างการทำงานของหน่วยรับรองระบบงานทั้ง 4 แห่ง ของประเทศไทยในแบบเครือข่าย (Single platform) ที่เป็นรูปธรรม โดยมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยคณะกรรมการบริหาร (Executive committee) ทำหน้าที่กำหนดนโยบายและยุทธศาสตร์การรับรองให้สอดคล้องกับยุทธศาสตร์ชาติ อุตสาหกรรมเป้าหมาย โครงสร้างพื้นฐานด้านคุณภาพของประเทศ และแผนชาติอื่นๆ รวมถึงการนำนโยบายจากคณะกรรมการมาตรฐานแห่งชาติไปบริหารจัดการให้บรรลุเป้าหมาย และคณะทำงานเฉพาะด้านอีก 4 คณะ ที่ทำหน้าที่ร่วมบูรณาการและปรับปรุงกระบวนการทำงานเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพ ลดความซ้ำซ้อน นำระบบการรับรองแบบอิเล็กทรอนิกส์เข้ามาใช้ พัฒนาผู้ตรวจประเมินให้ได้มาตรฐานเดียวกัน บริหารจัดการผู้ตรวจประเมินร่วมกัน (Share resources) เตรียมความพร้อมการเปิดสาขาการรับรองใหม่เพื่อรองรับแผนยุทธศาสตร์ชาติ หรืออุตสาหกรรมเป้าหมาย พัฒนาศักยภาพบุคลากรหน่วยงานรับรอง สื่อสารประชาสัมพันธ์ประโยชน์ของการรับรองระบบงาน วางระบบการเชื่อมโยงฐานข้อมูล (Database) ระหว่าง 4 หน่วยรับรอง

ทั้งนี้ โครงสร้างการทำงานร่วมกันแบบเครือข่าย (Single platform) ได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการมาตรฐานแห่งชาติแล้วเมื่อวันที่ 21 กันยายน พ.ศ. 2563 และผู้บริหารสูงสุด (อธิบดี/เลขาธิการ) ของทั้ง 4 หน่วยรับรองได้ร่วมลงนามบันทึกข้อตกลงความร่วมมือ (MOU) เมื่อวันที่ 15 ธันวาคม พ.ศ. 2563 เมื่อคณะกรรมการ/คณะทำงานชุดต่างๆ ร่วมกันกำหนดยุทธศาสตร์และเป้าหมายการทำงานร่วมกันแล้ว แต่ละหน่วยงานสามารถจัดทำแผนงาน/โครงการและจัดสรรงบประมาณของตนเองในส่วนที่เกี่ยวข้อง โดยคาดว่าจะทำให้เพิ่มประสิทธิภาพการรับรองระบบงานของประเทศ ลดความซ้ำซ้อน เพิ่มความรวดเร็ว ตอบสนองความต้องการของผู้ใช้บริการ โดยยึดกรอบยุทธศาสตร์และเป้าหมายของประเทศ เพิ่มความเข้มแข็งให้ระบบโครงสร้างพื้นฐานด้านคุณภาพของประเทศ (National Quality Infrastructure, NQI) ส่งเสริมคุณภาพชีวิตที่ดีของคนไทย และเพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขันของประเทศ จากสินค้าและบริการคุณภาพที่ผ่านการตรวจสอบจากหน่วยงานที่ผ่านการรับรองระบบงานจากหน่วยรับรองแล้ว และที่สำคัญทำให้เกิดความเป็นเอกภาพของหน่วยรับรองระบบงานของประเทศไทย ยกระดับการยอมรับในระดับนานาชาติ

จากผลการพัฒนาที่ผ่านมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2546-2562 สามารถสรุปผลสำเร็จในเส้นทางการพัฒนาห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ไทยสู่มาตรฐาน ISO 15189 ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เส้นทางความสำเร็จการพัฒนาห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ไทยสู่มาตรฐาน ISO 15189 ระหว่างปี พ.ศ. 2546-2562

ช่วงเวลา หรือวันที่	รายการที่แสดงถึงความสำเร็จ
พ.ศ. 2546-2562	มีระบบรับรองห้องปฏิบัติการที่เป็นเอกสารตามมาตรฐาน ISO/IEC 17011 ในส่วนที่หน่วยรับรองต้องนำไปใช้จำนวน 21 เรื่อง และห้องปฏิบัติการต้องนำไปใช้จำนวน 16 เรื่อง
พ.ศ. 2546-2562	นักวิชาการที่ผ่านหลักสูตรอบรม และได้ขึ้นทะเบียนเป็นผู้ตรวจประเมินห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ตามมาตรฐาน ISO 15189 รวมจำนวน 193 คน
30 เม.ย. 2547	ห้องปฏิบัติการฝ่ายเวชศาสตร์ชันสูตรโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ได้รับการรับรอง ISO 15189 เป็นแห่งแรกของไทยและในเอเชีย
พ.ศ. 2547-2562	ห้องปฏิบัติการผ่านรับรอง ISO 15189 รวมจำนวน 201 แห่ง ซึ่งมากที่สุดภูมิภาคเอเชียอาคเนย์ (เป็นห้องปฏิบัติการในต่างประเทศจำนวน 4 แห่ง)
18 เม.ย. 2550	ได้ลงนามยอมรับร่วมกับองค์การระหว่างประเทศ APAC-MRA และผ่านการตรวจประเมินจาก APAC-Peer Evaluations ทุก 4 ปี
6-11 ส.ค. 2550	บุคลากรจากหน่วยรับรองได้ร่วมเป็น Peer Evaluator ในทีมของ APAC ที่ไปตรวจประเมิน
28 ก.พ.- 5 มี.ค. 2553	โปรแกรมการรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ของหน่วยรับรองในประเทศ
28 มิ.ย.- 2 ก.ค. 2553	ต่าง ๆ ได้แก่ สาธารณรัฐประชาชนจีน สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น ฮองกง และแคนาดา ตามลำดับ
20-24 มิ.ย. 2554	รวม 5 ประเทศ/5 ครั้ง
29 มิ.ย.- 3 ก.ค. 2558	
พ.ศ. 2552-2558	ห้องปฏิบัติการในสังกัดโรงพยาบาลสมเด็จพระยุพราชที่ตั้งอยู่ทั่วประเทศ ผ่านการรับรอง ISO 15189 ครบทุกแห่งรวมจำนวน 21 แห่ง
พ.ศ. 2561-2562	เปิดบริการรับรองด้วยระบบ Fast Track โดยประกันเวลาแล้วเสร็จไม่เกิน 90 วัน ผ่านการรับรองจำนวน 5 แห่ง
พ.ศ. 2562	เปิดบริการรับรองด้วยระบบ e-Accreditation เป็นแห่งแรกของหน่วยรับรองในประเทศไทย โดยลดเวลาจาก 220 วัน ให้คงเหลือไม่เกิน 120 วัน จำนวนที่ผ่านการรับรอง 16 แห่ง

วิจารณ์

ความสำเร็จที่ปรากฏของกระบวนการรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ดังแสดงในตารางที่ 2 แสดงเส้นทางความสำเร็จการพัฒนาห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ไทยสู่มาตรฐาน ISO 15189 ระหว่างปี พ.ศ. 2546-2562 สืบเนื่องมาจากการสร้างผู้ตรวจประเมินที่มีความสามารถตรวจประเมินให้เป็นมาตรฐานเดียวกันอย่างสม่ำเสมอ ผู้ตรวจประเมินยึดแนวทางที่กำหนดใน ISO 19011 ฉบับที่เป็นปัจจุบัน โดยใช้เทคนิควิธีการสุ่มตรวจทั้งแนวราบและแนวตั้ง ครอบคลุมกิจกรรมต่างๆ ในกระบวนการสำคัญของห้องปฏิบัติการ ซึ่งประกอบด้วย 4 กระบวนการหลัก ได้แก่ กระบวนการของระบบบริหารคุณภาพ กระบวนการก่อนการตรวจวิเคราะห์ กระบวนการตรวจวิเคราะห์ และกระบวนการหลังการตรวจวิเคราะห์ ในการสัมมนาทุกครั้งมีการนำตัวอย่างข้อบกพร่องที่ทีมผู้ตรวจประเมินพบมาถอดเป็นบทเรียน เพื่อกระตุ้นให้เกิดการแลกเปลี่ยนความคิดเห็น และเสริมสร้างความเข้าใจในแต่ละประเด็นให้ตรงกัน นอกจากนี้หน่วยรับรองยังได้ใช้วิธีการปรับเปลี่ยนคณะผู้ตรวจประเมินไม่ให้ตรวจห้องปฏิบัติการที่เดิมซ้ำๆ ติดต่อกัน

การเปลี่ยนแปลงในช่วงปี พ.ศ. 2561-2562 สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการได้พัฒนาระบบ e-Accreditation โดยมุ่งหวังให้มีการลดการใช้กระดาษ ขั้นตอน และเวลาในการส่งเอกสารระหว่างห้องปฏิบัติการกับหน่วยรับรอง และระหว่างหน่วยรับรองกับผู้ตรวจประเมิน ซึ่งส่งผลทำให้กระบวนการรับรองห้องปฏิบัติการมีประสิทธิภาพ และรวดเร็วมากขึ้น แม้ว่ายังคงมีปัญหาคอขวดในเรื่องของชุดอุปกรณ์คอมพิวเตอร์ที่ยังไม่เพียงพอและไม่ทันสมัย ในการให้ผู้ตรวจประเมินนำไปใช้ และข้อจำกัดของโปรแกรมที่ยังใช้งานไม่สะดวก รวมทั้งพื้นที่ของห้องปฏิบัติการ ที่รับการตรวจประเมินบางแห่งรับส่งสัญญาณอิเล็กทรอนิกส์ไม่เสถียร อย่างไรก็ตามสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ยังคงดำเนินการพัฒนาในเรื่องนี้ต่อไป และคณะผู้ศึกษาคาดหวังว่าจะมีการนำระบบการตรวจประเมินทางไกล (Remote assessment) มาใช้ในบางสถานการณ์ ในกรณีที่ไม่สามารถไปตรวจ ณ สถานที่ปฏิบัติการจริงได้ เช่น สถานการณ์โรคระบาด เหตุการณ์ความไม่สงบ เป็นต้น โดยดำเนินการผ่านสื่ออิเล็กทรอนิกส์ในรูปแบบต่างๆ อาทิ Video Call, Virtual Site, Teleconferences, Microsoft Teams, Zoom Meeting, Google Hangouts, Line group, E-mail, Fax, Telephone หรือ Clip VDO เป็นต้น หากมีการใช้ร่วมกับระบบ e-Accreditation ที่สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการพัฒนาขึ้นมาแล้วนั้น จะทำให้กระบวนการรับรองห้องปฏิบัติการทางการแพทย์มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

อนึ่ง ผลจากการวิเคราะห์ปัจจัยภายในและภายนอกได้แสดงถึงจุดแข็งสำคัญที่สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ เป็นหน่วยงานเดียวในประเทศไทยที่ให้บริการรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ตามมาตรฐาน ISO 15189 โดยมีหลักประกันที่แสดงว่าโปรแกรมมีความเป็นสากลสอดคล้องกับ ISO/IEC 17011 ที่ผ่านการลงนามยอมรับร่วม (MRA) จากองค์กรระหว่างประเทศ APAC และ ILAC รวมถึงบุคลากรของหน่วยรับรองมีประสบการณ์มายาวนานพอสมควร จึงมีความสามารถให้บริการจนเป็นที่ยอมรับในกลุ่มประเทศสมาชิกนานาชาติ ดังเช่นได้รับเชิญเข้าร่วมเป็น Peer Evaluator เป็นต้น แม้มีจุดอ่อนของกระบวนการรับรองที่ยังใช้ระบบเอกสารที่เป็นกระดาษทำให้สิ้นเปลือง และล่าช้า แต่ก็มีมีการนำระบบอิเล็กทรอนิกส์ (e-Accreditation) มาใช้เพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการรับรองกับห้องปฏิบัติการบางส่วนที่มีความพร้อม โดยคาดว่าจะเปลี่ยนมาใช้ระบบนี้ทั้งหมดภายในปี พ.ศ. 2565 ส่วนการที่มีผู้ตรวจประเมินร้อยละ 90 เป็นบุคลากรจากภายนอกที่มีภารกิจอื่นเป็นงานประจำ ทำให้ต้องใช้เวลาในการสรรหาผู้ตรวจประเมิน และเคยได้รับการร้องเรียนว่าผู้ตรวจประเมินตีความข้อกำหนด ISO 15189 แตกต่างกัน สภาพปัญหาทั้ง 2 ประเด็นนี้ก็ไม่ได้ถูกละเลย โดยมีการเร่งสร้างสัมพันธภาพที่ดี และจัดการอบรมให้ความรู้ความเข้าใจในข้อกำหนดของมาตรฐานสากลที่เป็นปัจจุบันอย่างต่อเนื่องแก่นักวิชาการที่สังกัดภาครัฐและเอกชน ซึ่งเป็นบุคลากรในมหาวิทยาลัย และโรงพยาบาลทั่วประเทศ ผู้สมัครใจมาเป็นพันธมิตรร่วมทีมเป็นผู้ตรวจประเมินห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ด้วยมิตรไมตรีที่ดีงาม นอกจากนี้คณะผู้ศึกษาตระหนักดีว่าจำนวนห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ที่ผ่านการรับรอง ISO 15189 ในประเทศไทยยังมีจำนวนน้อย สืบเนื่องจากไม่ได้มีนโยบายข้อบังคับของกระทรวงสาธารณสุข อย่างไรก็ตามสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ก็ยังมุ่งมั่นพัฒนาเพื่อยกระดับคุณภาพของบริการทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ให้มีมาตรฐานระดับสากลตาม ISO 15189 จึงได้กำหนดกลยุทธ์ 1 ใน 6 ด้าน คือ กลยุทธ์การยกระดับมาตรฐานห้องปฏิบัติการจากมาตรฐานระดับประเทศไปสู่มาตรฐานสากล เพื่อสามารถเร่งการเพิ่มจำนวนห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ที่ผ่านรับรอง ISO 15189 ได้มากขึ้นในอนาคตอันใกล้ แท้ที่จริงห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ในประเทศไทยที่ให้บริการด้วยมาตรฐานสากล ISO 15189 มีจำนวนมากกว่าประเทศใดๆ ในภูมิภาคเอเชียอาคเนย์ หรือแม้แต่ในทวีปอื่นๆ ก็อยู่ในลำดับต้นๆ ทั้งนี้กลยุทธ์ทั้ง 6 ด้านที่เสนอสู่การพัฒนาปรับปรุงหน่วยรับรอง คาดว่าจะนำไปสู่การยกระดับกระบวนการรับรองห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ตามมาตรฐาน ISO 15189 ให้ครอบคลุมทั่วประเทศ และการปรับปรุงโครงสร้างเพื่อร่วมกันทำงานของหน่วยรับรองทั้ง 4 แห่ง ของประเทศไทย จะทำให้เกิดความเข้มแข็ง เพิ่มศักยภาพการรับรองระบบงานเพื่อตอบโจทย์ในภาพรวมของประเทศในการผลิตสินค้าและบริการที่มีคุณภาพ มีมาตรฐาน และมีความปลอดภัย เพิ่มขีดความสามารถของการแข่งขันในตลาดโลก รวมถึงการยกระดับคุณภาพชีวิตที่ดีของคนไทยโดยรวม

นอกจากนี้ สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการยังได้มุ่งเน้นขยายขอบข่ายการรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการให้ครอบคลุมงานที่สำคัญของประเทศ โดยกำหนดแผนจัดตั้งโปรแกรมการรับรอง ISO 20387: 2018 Biotechnology – Biobanking-General requirements for biobanking ภายในปี พ.ศ. 2565 เพื่อรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการที่มีการเก็บรักษาจุลินทรีย์ รวมถึงเซลล์ ยีน ซึ่งถือเป็นทรัพย์สิน “ทรัพยากรชีวภาพ” ที่มีค่าอย่างยิ่งที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์เพื่อตอบสนองความต้องการทางอุตสาหกรรม นำไปสู่การพัฒนาเศรษฐกิจชีวภาพของประเทศ รวมถึงประโยชน์ทางการแพทย์ เช่น การเก็บเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่าง ๆ เพื่อใช้เป็นเชื้ออ้างอิง ศึกษาวิจัยและพัฒนาชุดตรวจยาคัดค้น ฯลฯ หรือประโยชน์ในการรักษาโรค เช่น สเต็มเซลล์ ยีน เป็นต้น ดังนั้นการเก็บรักษาทรัพยากรชีวภาพอย่างเป็นระบบและมีการควบคุมคุณภาพที่ดีจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ให้มีการยกระดับคุณภาพห้องปฏิบัติการที่มีกิจกรรมเหล่านี้สู่มาตรฐานสากล

สรุป

การศึกษานี้ได้แสดงข้อมูลที่เป็นความสำเร็จของกิจกรรมในกระบวนการพัฒนาทั้งในส่วน of หน่วยรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ และการส่งเสริมสนับสนุนส่วน of ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ในประเทศไทยทุกระดับให้นำเอามาตรฐานสากล ISO 15189 ไปปรับใช้จนสามารถขอรับการตรวจประเมินและผ่านการรับรองได้สำเร็จเป็นที่ประจักษ์ สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการตระหนักดีว่ากระบวนการให้บริการยังมีจุดอ่อนบางประการ จึงได้นำระบบอิเล็กทรอนิกส์มาใช้ในการรับรอง (e-Accreditation) เพื่อช่วยแก้ปัญหาในเบื้องต้นด้านความล่าช้าและลดการแจกจ่ายเอกสาร รวมทั้งได้วิเคราะห์ตนเองและกำหนดกลยุทธ์เพื่อวางกรอบการทำงานอย่างมีทิศทาง ครอบคลุมการพัฒนาศักยภาพของหน่วยงานทุกภาคส่วนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการรับรองระบบงานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ รวมถึงเสนอให้มีการปรับปรุงโครงสร้างการบริหารจัดการหน่วยรับรองทั้ง 4 แห่งของประเทศไทย โดยมุ่งหวังว่าจะทำให้เกิดการพัฒนาและยกระดับคุณภาพของห้องปฏิบัติการทางการแพทย์และห้องปฏิบัติการด้านอื่น ๆ ในประเทศไทยสู่มาตรฐานสากลได้มากยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณอธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และผู้บริหารสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ให้การสนับสนุนด้านนโยบายและงบประมาณในการดำเนินงานรับรองห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ และบุคลากรกลุ่มรับรองห้องปฏิบัติการทุกท่าน ที่มุ่งมั่นทำงานให้เกิดผลสำเร็จอย่างต่อเนื่อง

เอกสารอ้างอิง

1. ISO 15189:2012, Medical laboratories—requirements for quality and competence. 3rd ed. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2012.
2. สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. หน่วยงานที่ผ่านการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการทดสอบด้านการแพทย์ ISO 15189, ISO 15190, ISO 22870. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 16 ก.พ. 2563]; [7 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: http://webdb.dmso.moph.go.th/ifc_qa/dbqa/default.asp?iID=LEDGD.
3. กองยุทธศาสตร์และแผนงาน สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข. จำนวนสถานพยาบาล จำแนกตามประเภท สังกัดกระทรวงสาธารณสุข. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 16 ก.พ. 2563]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: http://203.157.10.8/hcode_2020/query_02.php.

4. สำนักสถานพยาบาลและการประกอบโรคศิลปะ กรมสนับสนุนบริการสุขภาพ. รายชื่อสถานพยาบาลประเภทที่รับผู้ป่วยไว้ค้างคืน ข้อมูล ณ วันที่ 1 เมษายน 2563. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 16 ก.พ. 2563]; [13 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://mrd-hss.moph.go.th/mrd1_hss/?p=225.
5. ISO/IEC 17011:2017, Conformity assessment – requirements for accreditation bodies accrediting conformity assessment bodies. 2nd ed. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2017.
6. Peters T. A brief history of the 7-S (‘McKinsey 7-S’) model. [online]. 2011; [cited 2020 Feb 15]; [4 screens]. Available from: URL: <https://tompeters.com/2011/03/a-brief-history-of-the-7-s-mckinsey-7-s-model/>.
7. Sammut-Bonnici T, Galea D. PEST analysis. In: Wiley encyclopedia of management. [online]. 2015; [cited 2020 Feb 15]; [7 screens]. Available from: URL: https://www.researchgate.net/publication/257303449_PEST_analysis.
8. Asia Pacific Accreditation Cooperation (APAC). APAC CBC-002 guidelines on training courses for LIRP assessors Ver 1.1 (20200224). [online]. 2020; [cited 2020 Feb 15]; [29 screens]. Available from: URL: <https://www.apac-accreditation.org/publications/cbc-series/apac-cbc-002-guidelines-on-training-courses-for-lirp-assessors-ver-1-1-20200224/>.
9. ISO 19011:2018, Guidelines for auditing management systems. 3rd ed. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2018.
10. สุรศักดิ์ หมั่นพล, คณะบรรณาธิการ. สถิติข้อบกพร่องที่พบจากการตรวจประเมินห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ตามมาตรฐาน ISO 15189 2012. นนทบุรี: สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2561.
11. Weihrich H. The TOWS matrix—a tool for situational analysis. Long Range Planning 1982; 15(2): 54-66.

Development of Accreditation Program for Thai Medical Laboratories in Compliance with ISO 15189

Surasak Muenphon¹ Patravee Soisangwan¹ Siripan Wongwanich² and Nattakarn Laieddee¹

¹*Bureau of Laboratory Quality Standards, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000*

²*Retired Government Official, 53/1013 Chaengwattana Road, Pakkred, Nonthaburi 11000, Thailand*

ABSTRACT The Bureau of Laboratory Quality Standards, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health is the only accreditation body in Thailand providing medical laboratory accreditation program according to ISO 15189. This accreditation program has a full member status of Mutual Recognition Arrangement (MRA) under the Asia Pacific Accreditation Cooperation (APAC) and International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC). There are 193 registered assessors who can conduct the medical laboratory assessment according to ISO 15189. From B.E. 2547 to 2562, accumulated numbers of 201 medical laboratories in Thailand have been accredited in compliance with ISO 15189. Despite a number of success in quality improvement was shown by medical laboratories in Thailand. However, the data obtained from the accreditation processes analysis also shows the weakness of the processes that needs to be improved further. Therefore, accreditation body's strategies have been established to enhance the effectiveness of medical laboratory accreditation programs. By simplifying procedures, reducing time and reducing the number of documents, used in the accreditation processes, and then focusing on enhancing the competencies of voluntary assessors from external organizations and all internal personnel of the accreditation body. Developing a more proactive form of communication and public relations has been included. It aims to raise the medical laboratories that certified by national standards to become ISO 15189 accredited laboratories. At the same time, the medical laboratory accreditation processes has been developed to be faster which reduced the duration of the accreditation process from 220 days to an average of 77 days, by implementing the Electronic-Accreditation process (e-Accreditation). We are committed to expanding the scope of accreditation covering the preservation of biological substances in accordance with the ISO 20387:2018 Biotechnology-Biobanking-General requirements for biobanking by B.E. 2565. The study also proposes ways to improve the management structure of four accreditation bodies in Thailand.

Keywords: Accreditation body, ISO 15189, Medical laboratory

การวิเคราะห์โครงสร้างโปรตีนระดับสูงของ ยาโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยวิธี Circular Dichroism Spectroscopy

พันธิวิทย์ นทกุล¹ และอนุรักษ เมืองสงวน²

¹สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

²สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ถนนกำแพงเพชร กรุงเทพฯ 10210

บทคัดย่อ ยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีเป็นยาโปรตีนที่มีโครงสร้างของกรดอะมิโนเฉพาะตัว การเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมหรือขั้นตอนการผลิต เช่น pH อุณหภูมิ หรือการเพิ่มกำลังการผลิต อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างโปรตีน ซึ่งจะทำให้มีผลกระทบต่อคุณภาพ ความปลอดภัย ความคงตัว และประสิทธิภาพในการรักษาของยาได้ โดยปกติจะมีการตรวจสอบคุณลักษณะด้านโครงสร้างของโปรตีนในระหว่างขั้นตอนการผลิตและในตัวยาสำคัญ (Drug substance) แต่ไม่ทำการตรวจสอบในขั้นตอนสุดท้ายของผลิตภัณฑ์ (Finished products) งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างโปรตีนระดับทุติยภูมิและตติยภูมิของผลิตภัณฑ์ยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ขึ้นทะเบียนในประเทศไทยจำนวน 5 ตัวอย่าง โดยเป็นยาต้นแบบ 4 ชนิด และยาค่ายคลี่ง 1 ชนิด ด้วยเทคนิค Circular Dichroism Spectroscopy ในช่วงความยาวคลื่น 190-250 nm (far-UV) และ 250-350 nm (near-UV) ผลการศึกษาพบว่าโครงสร้างโปรตีนระดับทุติยภูมิและตติยภูมิของยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีดังกล่าวมีลักษณะเฉพาะตามชนิดของยาตรงตามที่ได้จัดแจ้งไว้ในทะเบียนตำรับ และโครงสร้างโปรตีนของยาต้นแบบและยาค่ายคลี่งมีลักษณะเหมือนกัน

คำสำคัญ: ยาโมโนโคลนอลแอนติบอดี, ยาค่ายคลี่ง, โครงสร้างโปรตีนระดับทุติยภูมิ, โครงสร้างโปรตีนระดับตติยภูมิ

Corresponding author E-mail: puntawit.n@dmasc.mail.go.th

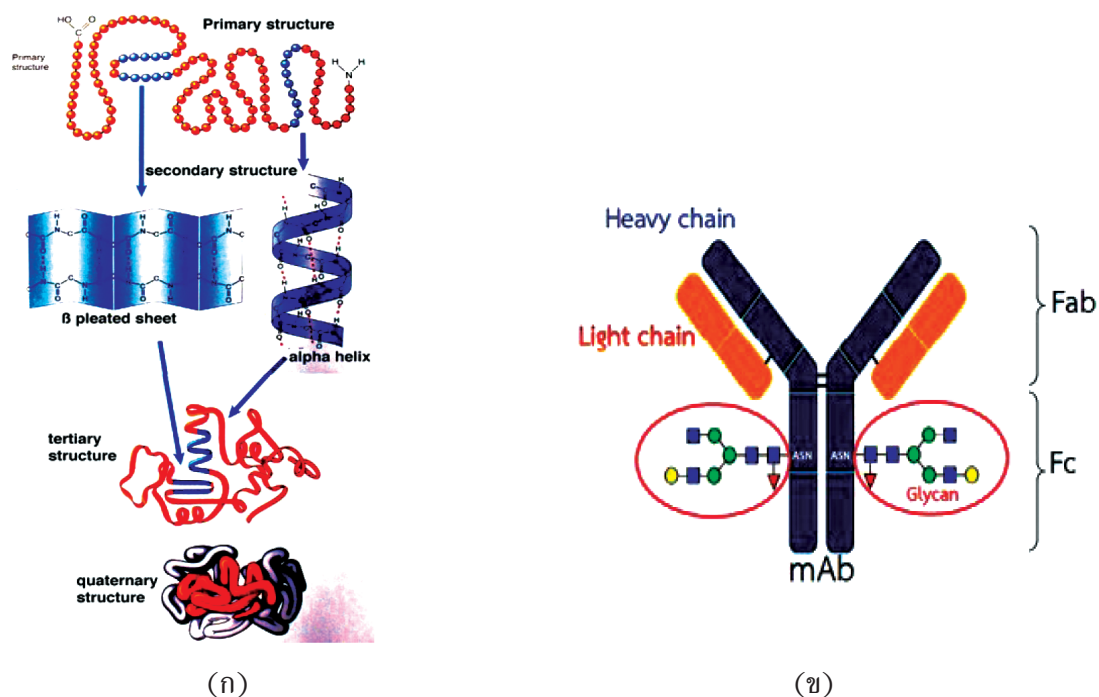
Received: 18 November 2020

Revised: 8 January 2021

Accepted: 14 March 2021

บทนำ

ยาชีววัตถุ (biopharmaceutical products) เป็นยาแผนปัจจุบัน ผลิตโดยกระบวนการทางชีววิทยา เพื่อใช้ในการป้องกันและรักษาโรคต่างๆ ได้แก่ โรคอักเสบภูมิคุ้มกัน โรคภูมิคุ้มกันตนเอง โรคมะเร็ง และความผิดปกติทางเลือด⁽¹⁾ เป็นต้น ยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีเป็นยาชีววัตถุชนิดหนึ่งที่เกิดโดยเทคโนโลยีชีวภาพ เป็นยาโปรตีนที่มีขนาดใหญ่และโครงสร้างซับซ้อน ประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์ของกรดอะมิโนเป็นสายโพลีเปปไทด์เรียกว่า โครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) เมื่อพันธะไฮโดรเจนซึ่งอยู่ในตำแหน่งห่างกันสม่ำเสมอเกิดปฏิกิริยาดึงดูดกันทำให้เกิดโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีนขึ้นเป็นโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) มี 2 แบบ คือ แบบอัลฟาเฮลิกซ์ (α -helix) ที่ขดเป็นเกลียว และแบบเบตาชีท (β -sheet) ที่อยู่ในรูปซิกแซกคล้ายจีบของพัด สำหรับโครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure) เกิดจากพันธะต่างๆ บนสายโพลีเปปไทด์เดียวกันจับกันเป็นกลุ่มก้อนเป็นโครงสร้างที่ทำให้โปรตีนสามารถทำงานได้^(2,3) ซึ่งจะได้โมเลกุลของแอนติบอดีที่ประกอบด้วยโปรตีนสายสั้น (light chain: LC) 2 สาย และโปรตีนสายยาว (heavy chain: HC) 2 สาย เชื่อมกันเป็นรูปตัววาย (Y shape) ด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond)⁽⁴⁾ ดังแสดงในภาพที่ 1



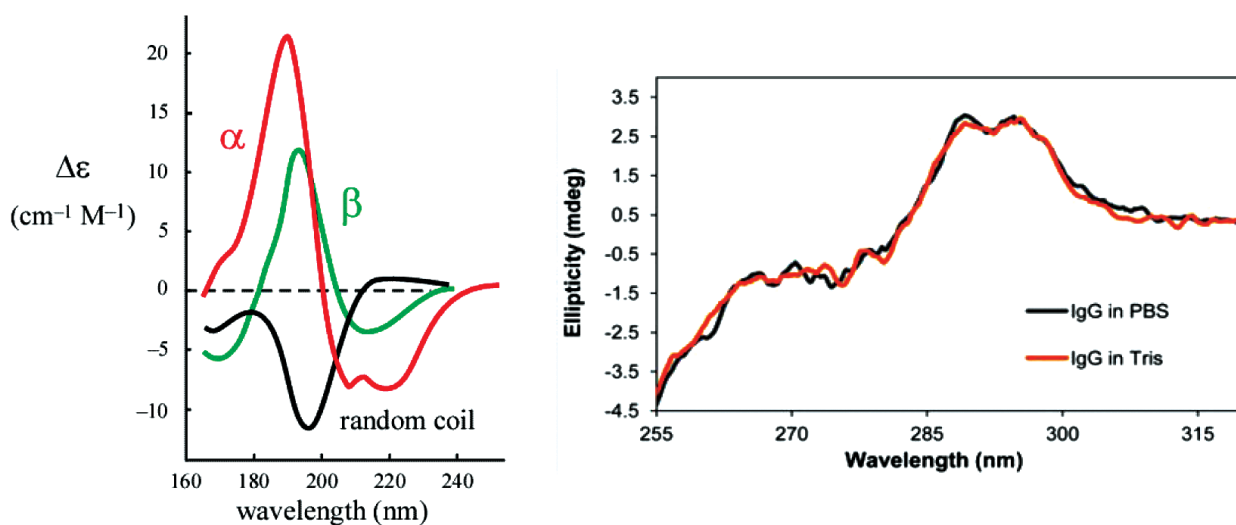
ภาพที่ 1 (ก) โครงสร้างระดับ primary secondary tertiary (ข) โครงสร้าง mAb แสดงส่วน Fab และ Fc และ quaternary ของโปรตีน

ด้วยการผลิตที่ซับซ้อนโดยใช้สารตั้งต้นที่มาจากสิ่งมีชีวิตจึงต้องมีการออกแบบและควบคุมกระบวนการผลิตอย่างเข้มงวดเพื่อให้ได้ยาที่มีโครงสร้างและคุณสมบัติตามที่ออกแบบไว้ ปัจจัยต่างๆ เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง หรือการเกิดปฏิกิริยากับสารเคมีต่างๆ สามารถทำให้โครงสร้างของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป^(5, 6, 7, 8, 9) ซึ่งอาจทำให้ยาสูญเสียคุณสมบัติในการรักษาหรือเกิดอันตรายต่อผู้ที่ได้รับยา ผู้ผลิตจึงมีขั้นตอนการตรวจโครงสร้างทั้งระดับปฐมภูมิและระดับสูง (Higher order structure) ในระหว่างขั้นตอนการผลิตด้วยยาสำคัญ (drug substances) ด้วยเทคนิคที่เหมาะสมหลายวิธีตามที่กำหนดในตำรายาสากล และไม่ตรวจซ้ำในผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป (finished product/drug product)

ในการรักษาโรคด้วยยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ให้การรักษามีประสิทธิภาพดี ผู้ป่วยต้องได้รับยาอย่างต่อเนื่อง แต่เนื่องจากยามีราคาแพง ดังนั้นเมื่อยาต้นแบบ (originators) หมดสิทธิบัตรจึงมีการผลิตยาชีววัตถุคล้ายคลึง (biosimilars) ที่ออกแบบให้ได้โมเลกุลยาที่คล้ายคลึงกับยาต้นแบบ มีกลไกการออกฤทธิ์เช่นเดียวกันแต่ราคาของยาชีววัตถุคล้ายคลึงถูกกว่า ดังนั้นผู้ผลิตยาชีววัตถุคล้ายคลึงต้องแสดงข้อมูลเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับยาต้นแบบที่นำมาเป็นยาอ้างอิง (reference product) ข้อมูลที่สำคัญคือ ข้อมูลด้านคุณภาพที่ระบุถึงโครงสร้างและคุณสมบัติต่าง ๆ ทางเคมี-ฟิสิกส์ ที่ต้องเหมือนกับยาต้นแบบจึงจะได้รับการยอมรับและสามารถขึ้นทะเบียนเป็นยาชีววัตถุคล้ายคลึงได้⁽¹⁰⁾ ดังนั้นการศึกษาโครงสร้างของยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีจึงจำเป็นสำหรับหน่วยงานควบคุมกำกับคุณภาพภาครัฐ เพื่อให้ทราบถึงโครงสร้างของยาว่าเป็นไปตามที่ได้ขึ้นทะเบียนไว้

การตรวจสอบคุณภาพโครงสร้างระดับสูงของยาโปรตีน^(11, 12) จึงมีความสำคัญซึ่งผู้ผลิตต้องทำการวิเคราะห์เพื่อให้เห็นโครงสร้างระดับสูงที่มีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของโมเลกุลของยา ซึ่งมีโอกาสเกิดการเบี่ยงเบนจากที่ออกแบบไว้จากหลายสาเหตุ เช่น การควบคุมการผลิตไม่เหมาะสม การเปลี่ยนแปลงจากการเก็บรักษาหรืออยู่ในอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมทำให้เกิดการจับตัวกัน รวมทั้งตรวจสอบโครงสร้างที่แตกต่างของยาคลายคลึงเมื่อใช้เซลล์เพาะเลี้ยงต่างชนิดกัน⁽⁵⁾ เป็นต้น ดังนั้นข้อมูลด้านคุณภาพที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างระดับสูงของยา mAb มีความสำคัญและจำเป็นต้องได้รับการตรวจสอบ

วิธี circular dichroism spectroscopy เป็นวิธีที่กำหนดในตำรายาสากล^(13, 14, 15) สำหรับการตรวจเอกลักษณ์โปรตีนด้านคุณภาพของโครงสร้างระดับทุติยภูมิและตติยภูมิ สามารถอ่านเส้นสเปกตรัมได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว มีหลักการ คือ การวัดความสามารถในการดูดกลืนแสงของตัวอย่างโปรตีนอาศัยหลักการดูดกลืนแสงช่วง UV ที่ต่างกันของโมเลกุล แสงที่ผ่านโมเลกุลจะมีลักษณะของการบิดของระนาบแสงเป็นรูปวงรี (circular dichroism) ซึ่งโมเลกุลจะมีการดูดกลืนแสงที่หมุนวนซ้าย (left circular polarized light) และหมุนวนขวา (right circular polarized light) ไม่เท่ากัน เมื่อนำมาวิเคราะห์โครงสร้างโปรตีนระดับทุติยภูมิในช่วงความยาวคลื่น 190–250 nm (far-UV) เส้นสเปกตรัมจะแสดงค่าสัญญาณทั้งค่าบวกและลบ สามารถแยกความแตกต่างของโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนได้เป็นแบบอัลฟาเฮลิกซ์ เบตาชีต และแรนดอมคอยล์ และโครงสร้างระดับตติยภูมิในช่วงความยาวคลื่น 250–350 nm (near-UV)⁽¹⁶⁾ ดังนั้นจึงเป็นประโยชน์ในการตรวจสอบพิสูจน์โครงสร้างของยาโปรตีนที่ผลิตแต่ละรุ่น (lot) ว่ามีลักษณะโครงสร้างที่เหมือนกันหรือไม่ เช่น หลังจากการเพิ่มขนาดของกระบวนการผลิตการทำให้บริสุทธิ์ เป็นต้น ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 โครงสร้างทุติยภูมิและตติยภูมิของโปรตีน ที่อ่านได้โดยเครื่อง circular dichroism spectrophotometer^(17, 18)

ในการขึ้นทะเบียนยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีไม่มีข้อกำหนด (Specification) ให้ตรวจวิเคราะห์โครงสร้างโปรตีนในยาสำเร็จรูป เนื่องจากผู้ผลิตได้วิเคราะห์โครงสร้างของตัวยาสำคัญและแสดงไว้ในทะเบียนตำรับยาที่ยื่นขอขึ้นทะเบียนแล้ว อย่างไรก็ตามเพื่อความมั่นใจ หน่วยงานควบคุมกำกับภาครัฐควรตรวจสอบและมีข้อมูลเพื่อให้ทราบถึงโครงสร้างของยาว่าเป็นไปตามที่ได้ออกแบบและจดแจ้งไว้ในตำรับ จุดประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างระดับสูงทั้งทุติยภูมิและตติยภูมิของยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ขึ้นทะเบียนในประเทศไทยโดยวิธี Circular Dichroism Spectroscopy และเปรียบเทียบลักษณะโครงสร้างของยาต้นแบบและยาคัดลอก

วัสดุและวิธีการ

การศึกษานี้เป็นการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและได้เลือกใช้วิธี CD ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่กำหนดไว้ในตำรายา⁽¹⁰⁾ โดย การตรวจสอบโครงสร้างระดับสูงทั้ง 2 แบบของยาโปรตีน พบว่ามีความสะดวกรวดเร็วและมีความจำเพาะ

ตัวอย่างทดสอบ

ตัวอย่างสำหรับการศึกษาเป็นยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ขึ้นทะเบียนในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2559-2560 จำนวน 5 ชนิด เป็นยาต้นแบบจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ Ixekizumab, Alirocumab, Emicizumab, Infliximab และยาคัดลอกจำนวน 1 ชนิด คือ Infliximab

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่อง Circular dichroism spectrometer (CD) ยี่ห้อ Jasco รุ่น J-815 (Jasco Corporation, Japan)
2. เครื่องปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกโปรตีนในตัวอย่าง (ยี่ห้อ Sorvall, Germany)
3. เครื่อง NanoDrop™ 2000/2000 (รุ่น NND-1, ND-2000 ยี่ห้อ Thermal Scientific, USA)
4. เครื่อง Ultrasonic Cleaner Sonicator ใช้ cuvette ชนิด quartz ขนาด 0.1 cm และ 1.0 cm path length
5. Amicon® tube ขนาด 30k หรือ 10k (ยี่ห้อ Amicon, Germany)
6. โปรแกรมกรองสัญญาณรบกวน Savitzky-golay ใช้เป็นตัวกรองดิจิทัลในการปรับข้อมูลให้ราบรื่น เพื่อเพิ่มความแม่นยำของข้อมูลโดยไม่บิดเบือนแนวโน้มของสัญญาณ

สารเคมี

น้ำ ultrapure ที่ผ่านเครื่อง Ultrasonic Cleaner Sonicator

การวิเคราะห์โครงสร้างโปรตีนด้วยเครื่อง CD

การเตรียมตัวอย่าง

ละลายตัวอย่างด้วยตัวทำละลาย โดยใช้ปริมาตรตามที่ระบุของตัวอย่างแต่ละชนิด นำสารละลายตัวอย่าง 100 µl และน้ำ ultrapure ปริมาตร 100 µl ใส่ลงใน Amicon® tube ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 g อุณหภูมิ 4 °C

นาน 30 นาที เก็บสารละลายส่วนบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm ด้วยเครื่อง Nano Drop™ เพื่อให้ทราบความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่าง แล้วเจือจางด้วยน้ำ ultrapure ให้ได้ความเข้มข้น 0.1 mg/ml สำหรับวิเคราะห์โครงสร้างทุติยภูมิ และความเข้มข้น 1.0 mg/ml สำหรับวิเคราะห์โครงสร้างตติยภูมิ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง CD

การเตรียมเครื่อง CD

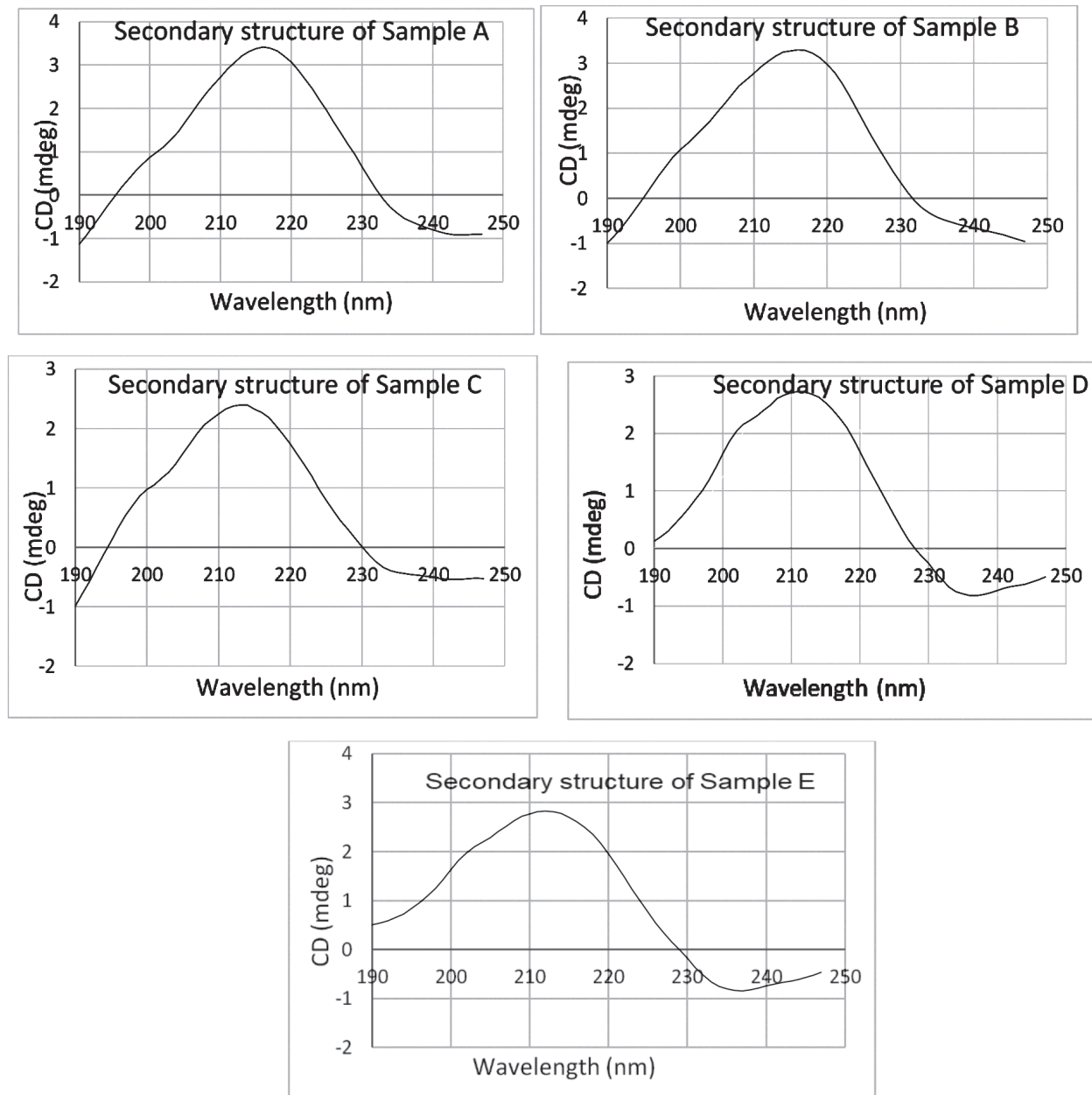
เติมแก๊สไนโตรเจนเข้าในระบบก่อนเปิดหลอดไฟโดยให้เครื่องวัดอัตราไหลของแก๊สได้ 5 ลิตรต่อนาที จากนั้นปล่อยทิ้งไว้ 10-20 นาที ตรวจสอบแรงดันของแก๊สไนโตรเจนในถังไม่ต่ำกว่า 200 psi ตั้งค่าเครื่อง CD ดังนี้ Sensitivity = Standard 100 mdeg, Start Wavelength = 250 nm, End Wavelength = 190 nm, Data Pitch = 1 nm, Scanning mode = Continuous, Scanning speed = 50 nm/min, Response = 1 sec, Bandwidth = 1 nm, Accumulation = 1 สำหรับวิเคราะห์โครงสร้างทุติยภูมิ ส่วนการวิเคราะห์โครงสร้างตติยภูมิ ให้ตั้งค่า Start Wavelength = 350 nm และ End Wavelength = 250 nm

การวิเคราะห์ตัวอย่าง

หาค่า base line correction โดยเติมน้ำ ultrapure ปริมาตร 800 µl ลงใน cuvette และใส่ลงในเครื่อง CD วิเคราะห์ผลโดยสแกนค่าความยาวคลื่น 190-250 nm สำหรับวิเคราะห์โครงสร้างทุติยภูมิและความยาวคลื่น 250-350 nm สำหรับวิเคราะห์โครงสร้างตติยภูมิ จากนั้นใส่ตัวอย่างที่เตรียมแล้วปริมาตร 800 µl ลงใน cuvette แล้ววิเคราะห์เช่นเดิม จากนั้นประมวลผลโดยปรับเส้นกราฟให้เหมาะสมด้วยโปรแกรมกรองสัญญาณ Savistky-Golay เลือกระดับความละเอียดสูงสุด

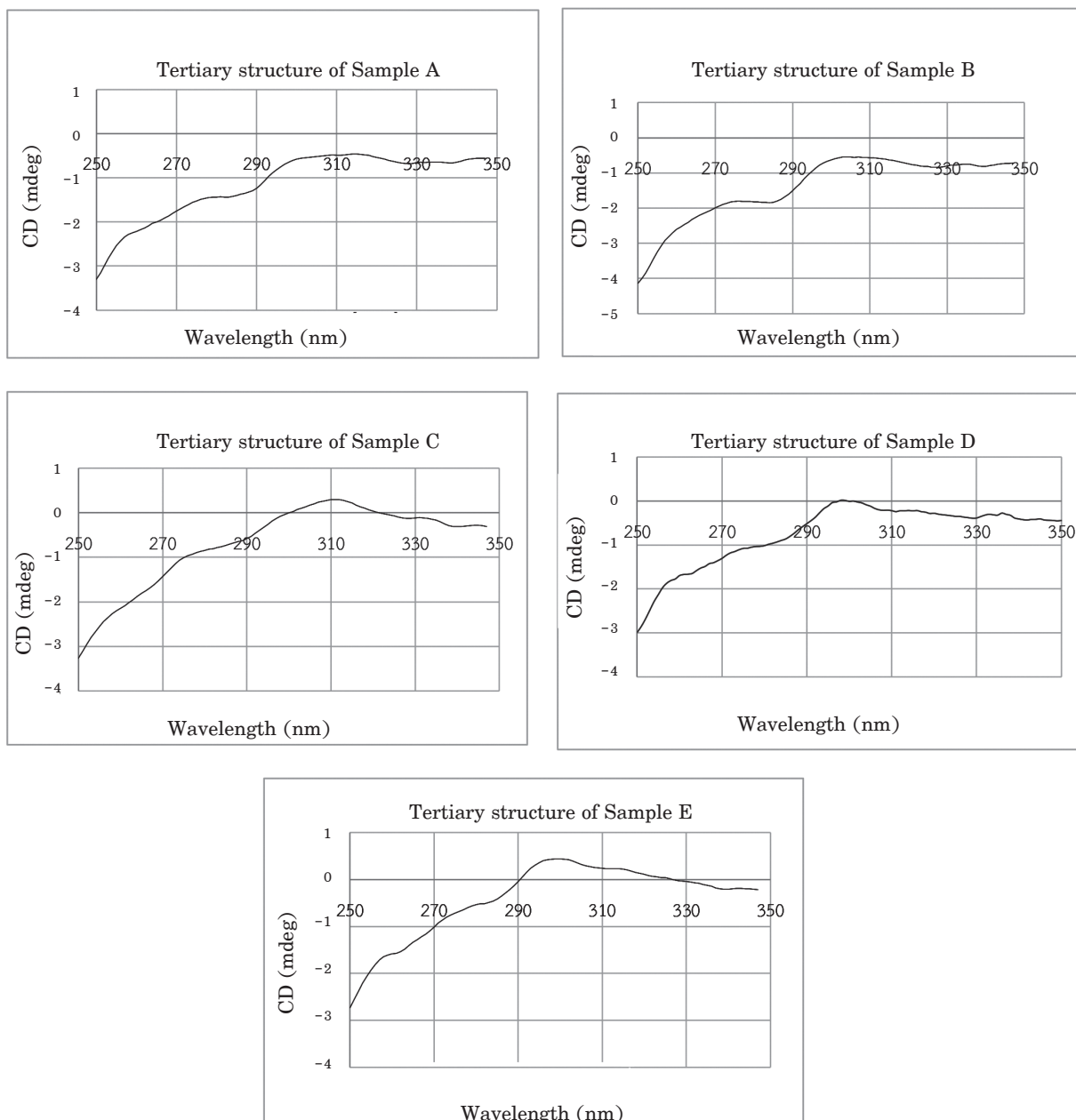
ผล

การตรวจวิเคราะห์โครงสร้างโปรตีนของผลิตภัณฑ์ยาโมโนโคลนอลแอนติบอดี จำนวน 5 ชนิด เป็นยาต้นแบบจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ ยาต้นแบบ ตัวอย่าง A : Ixekizumab, ตัวอย่าง B : Alirocumab, ตัวอย่าง C : Emicizumab, ตัวอย่าง D : Infliximab และยาคลายคลึง จำนวน 1 ชนิด คือ ตัวอย่าง E : Infliximab การศึกษาโครงสร้างระดับทุติยภูมิโดย far-UV ที่ความยาวคลื่น 190-250 nm พบว่าสเปกตรัมของยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีของยาชนิดต่าง ๆ ที่ศึกษา แสดงลักษณะของโครงสร้างหลักเฉพาะของแอนติบอดีที่ขึ้นอยู่กับชนิดของยา ซึ่งตัวอย่างยาต้นแบบ 4 ชนิด ที่ศึกษาแสดงลักษณะของโครงสร้างหลักเฉพาะของแอนติบอดีเป็นแบบ β -sheet structure มีตำแหน่งสูงสุด (positive band) และต่ำสุด (negative band) ของสเปกตรัม ดังแสดงในภาพที่ 3



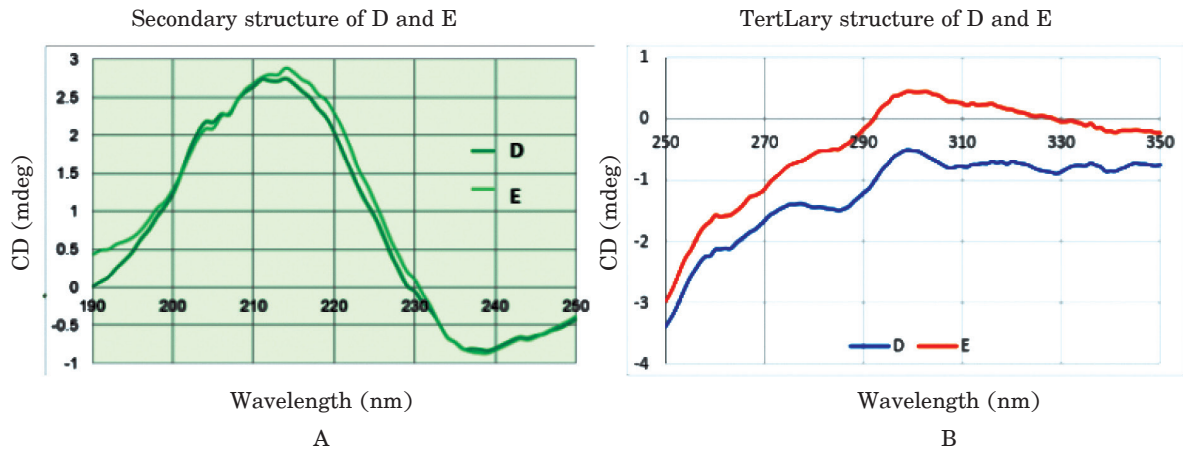
ภาพที่ 3 กราฟค่าการดูดกลืนแสงของโครงสร้างโปรตีนทุติยภูมิของยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 ชนิด

ผลการศึกษาโครงสร้างระดับทุติยภูมิ near-UV ที่ความยาวคลื่น 250–350 nm แสดงเส้นสเปกตรัมของยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ศึกษาของยาชนิดต่างๆ มีลักษณะเฉพาะของแต่ละชนิด ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 กราฟค่าการดูดกลืนแสงของโครงสร้างโปรตีนตติยภูมิของยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 ชนิด

เมื่อศึกษาเปรียบเทียบลักษณะของยาต้นแบบและยาคัดลอก พบว่าโครงสร้างโปรตีนของยา Infliximab ที่เป็นยาต้นแบบและยาคัดลอก เมื่อวิเคราะห์ที่ far-UV และ near-UV ยาทั้งสองชนิดมีรูปแบบของเส้นสเปกตรัมโครงสร้างทุติยภูมิและตติยภูมิลักษณะใกล้เคียงกัน สามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้ ดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 กราฟโครงสร้างระดับทุติยภูมิ (190–250 nm) และตติยภูมิ (250–350 nm) ของยา Infliximab ที่เป็น ยาดันแบบ (D) และยาคัลลัสคลิง (E)

วิจารณ์

โครงสร้างระดับสูงของยา mAb ทุกชนิดที่นำมาศึกษาแสดงสเปกตรัมที่มีรูปแบบเดียวกันในช่วงคลื่น การทดสอบทั้ง far-UV และ near-UV ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนระหว่างโครงสร้างระดับทุติยภูมิและตติยภูมิ แสดงให้เห็นรูปร่างของเส้นสเปกตรัมที่เป็นลักษณะเฉพาะของ mAb ที่มีค่าสูงสุดและค่าต่ำสุดที่เฉพาะตัวของแต่ละชนิด และสอดคล้องกับลักษณะสเปกตรัมจากตำรา ดังแสดงในภาพที่ 2 การเปรียบเทียบเส้นสเปกตรัมของ ยาชีววัตถุต้นแบบและชีววัตถุคล้ายคลึง พบว่าไม่แสดงความแตกต่างของค่าความยาวคลื่นสูงสุดและต่ำสุด ซึ่งเป็น ผลจากการศึกษาเดียวกันของยาชีววัตถุต้นแบบและชนิดคล้ายคลึงตามหลักเกณฑ์การเปรียบเทียบความคล้ายคลึง ของโครงสร้างโปรตีนตามหลักเกณฑ์สากล^(19, 20, 21)

ปัจจุบันมีการแสดงข้อมูลโครงสร้างระดับทุติยภูมิและตติยภูมิของตัวยาสำคัญที่วิเคราะห์โดยผู้ผลิตไว้ในตำรับยาที่ขอขึ้นทะเบียนและไม่มีข้อกำหนดการวิเคราะห์หัวข้อนี้ในยาสำเร็จรูป จึงไม่มีการตรวจสอบโดย ห้องปฏิบัติการของภาครัฐ อย่างไรก็ตามหากหน่วยงานควบคุมกำกับคุณภาพยาของประเทศทำการตรวจวิเคราะห์โครงสร้างระดับสูงของยา mAb ในระหว่างการขึ้นทะเบียน จะทำให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์เก็บไว้เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบกับ โครงสร้างของยาเหล่านั้น หากเกิดข้อสงสัยในคุณภาพหลังจำหน่ายแล้ว ไม่ว่าจะเป็นในเรื่อง cold chain หรือความคงตัวของยาเมื่อระยะเวลาผ่านไป หรือกรณีเกิดการแพ้หลังได้รับยา สามารถพิสูจน์ได้ว่าโครงสร้างโปรตีนของยาเปลี่ยนแปลงไปแล้วหรือไม่ อีกทั้งการวิเคราะห์โครงสร้างระดับทุติยภูมิจะมีความไวต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น อุณหภูมิ pH ส่วนผสม หรือโปรตีนถูกทำลายลง ในส่วนของการวิเคราะห์โครงสร้างตติยภูมิจะทำให้ทราบข้อมูล เช่น เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสูตรยา อุณหภูมิ หรือสภาวะการเก็บรักษาของยา^(22, 23) รวมทั้งใช้เปรียบเทียบเพื่อพิสูจน์ความเหมือนของ ยาคัลลัสคลิงกับยาดันแบบนั้น ๆ

เนื่องจากยา mAb ที่นำมาศึกษานี้เป็นยาใหม่จึงไม่มีสารมาตรฐานจำหน่าย ต้องได้รับจากผู้ผลิตเท่านั้น ซึ่งโดยปกติจะจัดทำให้เพียงพอสำหรับการทดสอบยาสำเร็จรูปประกอบการขึ้นทะเบียนเท่านั้น แต่การศึกษาโครงสร้างระดับสูงนี้ เป็นการทดสอบนอกเหนือจากข้อกำหนดของยาสำเร็จรูป ทำให้ไม่มีสารมาตรฐานของยา mAb ที่จะทดสอบควบคุมกันไป อย่างไรก็ตามสเปกตรัมของยาทุกชนิดที่ได้มีความสอดคล้องกันและตรงตามตำราทฤษฎีเกี่ยวกับโครงสร้างของโปรตีน

สรุป

จากการวิเคราะห์โครงสร้างของยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 ชนิด ด้วยวิธี CD ทั้งโครงสร้างทุติยภูมิและตติยภูมิของยา มีลักษณะตามโครงสร้างของยาดังกล่าวซึ่งมีความแตกต่างกันจากการดูดกลืนแสง far-UV และ near-UV รวมทั้งโครงสร้างของยาต้นแบบและยาคัดลอกที่นำมาศึกษามีลักษณะของสเปกตรัมของโครงสร้างโปรตีนระดับทุติยภูมิและตติยภูมิที่สอดคล้องกัน แสดงถึงความคล้ายคลึงกันระหว่างยา Infliximab ที่เป็นยาต้นแบบและยาคัดลอก สามารถนำวิธีนี้มาใช้ในการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างยาที่เกิดหลังจำหน่ายได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนางสาวเกศรา ธีรวิชพันธุ์ นายเฉลิมชัย อาจประดิษฐ์ และ ดร.มยุรี เฟื่องทอง สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ในความร่วมมือ สนับสนุนสถานที่ และเครื่องมือในการศึกษาวิจัย และนางวิชุดา จริยะพันธุ์ อดีตผู้ทรงคุณวุฒิ ด้านวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์การแพทย์ (ชีววิทยา) กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สำหรับคำแนะนำในการศึกษาวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. วิชุดา จริยะพันธุ์, จูติภรณ์ ภูติภินโยวัฒน์, สายวรพ จตุรกิตตินันท์. คุณลักษณะของไกลแคนในยาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำหน่ายในประเทศไทย. ว กรมวิทย์ พ 2560; 59(2) : 104-14.
2. Parr MK, Montacir O, Montacir H. Physicochemical characterization of biopharmaceuticals. J Pharm Biomed Anal 2016; 130: 366-89.
3. Wei Y, Thyparambil AA, Latour RA. Protein helical structure determination using CD spectroscopy for solutions with strong background absorbance from 190-230 nm. Biochim Biophys Acta 2014; 1844(12): 2331-7.
4. พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์, นิธิยา รัตนพานนท์. โครงสร้างของโปรตีน (Protein structure). [ออนไลน์]. 2562; [สืบค้น 27 เม.ย. 2562]; [5 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://sites.google.com/site/sarchiwmolekul/home/portin-laea-krd-xa-mi-no-proteins/khorngsrang-khxng-portin-protein-structure>.
5. Pisupati K, Benet A, Tian Y, Okbazghi S, Kang J, Ford M, et al. Biosimilarity under stress: a forced degradation study of Remicade® and Remsima™. MAbs 2017; 9(7): 1197-209.
6. Jung SK, Lee KH, Jeon JW, Lee JW, Kwon BO, Kim YJ, et al. Physicochemical characterization of Remsima. MAbs 2014; 6(5): 1163-77.
7. Hong J, Lee Y, Lee C, Eo S, Kim S, Lee N, et al. Physicochemical and biological characterization of SB2, a biosimilar of Remicade® (infliximab). MAbs 2017; 9(2): 365-83.
8. Magnenat L, Palmese A, Fremaux C, D'Amici F, Terlizze M, Rossi M, et al. Demonstration of physicochemical and functional similarity between the proposed biosimilar adalimumab MSB11022 and Humira®. MAbs. 2017; 9(1): 127-39.
9. Cho IH, Lee N, Song D, Jung SY, Bou-Assaf G, Sosic Z, et al. Evaluation of the structural, physicochemical, and biological characteristics of SB4, a biosimilar of etanercept. MAbs. 2016; 8(6): 1136-55.
10. Weise M. From bioequivalence to biosimilars: How much do regulators dare? Z Evid Fortbild Qual Gesundh wesen (ZEFQ) 2019; 140: 58-62.

11. Greenfield NJ. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc* 2006; 1(6): 2876–90.
12. Li CH, Nguyen X, Narhi L, Chemmalil L, Towers E, Muzammil S, et al. Applications of circular dichroism (CD) for structural analysis of proteins: qualification of near- and far-UV CD for protein higher order structural analysis. *J Pharm Sci* 2011; 100(11): 4642–54.
13. Nupur N, Chhabra N, Dash R, Rathore AS. Assessment of structural and functional similarity of biosimilar products: rituximab as a case study. *MAbs*. 2018; 10(1): 143–58.
14. Kelly SM, Jess TJ, Price NC. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1751(2): 119–39.
15. do Monte ZS, Ramos CS. Development and validation of a method for the analysis of paroxetine HCl by circular dichroism. *Chirality* 2013; 25(4): 211–4.
16. Ranjbar B, Gill P. Circular dichroism techniques: biomolecular and nanostructural analyses- a review. *Chem Biol Drug Des* 2009; 74(2): 101–20.
17. Gonzaga University. Circular dichroism (CD) spectroscopy. [online]. 2018; [cited 2021 Mar 10]; [2 screens]. Available from: URL: <http://guweb2.gonzaga.edu/faculty/cronk/CHEM245pub/CD.html>.
18. Sanderson T. Orthogonal approaches in elucidating protein conformation increases confidence in formulation design. [online]. 2013; [cited 2021 Mar 10]; [7 screens]. Available from: URL: <https://www.sgs.com/en/news/2013/07/orthogonal-approaches-in-elucidating-protein-conformation-increases-confidence-in-formulation-design>.
19. Micsonai A, Wien F, Kernya L, Lee Y-H, Goto Y, Réfrégiers M, et al. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112(24): E3095–E103.
20. Cox MG, Ravi J, Rakowska PD, Knight AE. Uncertainty in measurement of protein circular dichroism spectra. *Metrologia* 2014; 51(1): 67–79.
21. Kelly SM, Price NC. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Curr Protein Pept Sci* 2000; 1(4): 349–84.
22. Joshi V, Shivach T, Yadav N, Rathore AS. Circular dichroism spectroscopy as a tool for monitoring aggregation in monoclonal antibody therapeutics. *Anal Chem* 2014; 86(23): 11606–13.
23. Alliance Protein Laboratories. Circular dichroism (CD). [online]. 2021; [cited 2 Jan 2021]; [4 screens]. Available from: URL: https://www.ap-lab.com/circular-dichroism#CD_secondary.

Higher Order Analysis of Protein Structure of Therapeutic Monoclonal Antibody by Circular Dichroism Spectroscopy

Puntawit Natakul¹ and Anurak Muangsaguan²

¹*Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Tiwanon Road, Nonthaburi 11000*

²*Chulabhorn Research Institute, Kamphaeng Phet Road, Bangkok 10210, Thailand*

ABSTRACT Therapeutic monoclonal antibodies (mAb) are protein drugs that have a unique amino acid structure. When there are any changes in the structure due to environmental condition; pH, temperature or increasing production. Their safety, quality and efficacy may be affected. The determination of their higher order protein structure is performed in the in-process control and drug substances but not in the finished products. The purpose of this study was to analyze the protein structure of 5 mAb drugs (4 reference drugs and 1 biosimilar drug) registered in Thailand, using the circular dichroism spectroscopy technique in two ranges of wavelengths: 190–250 nm (far-UV) and 250–350 nm (near-UV). The study demonstrated that the protein structures of all samples showed the specific pattern depending on the product type and the results were conformed to those as their registrations. In addition, we found that the protein structure of the biosimilar mAb drug was similar to its reference drug.

Keywords: Monoclonal antibody products, Biosimilars, Secondary protein structure, Tertiary protein structure

การพัฒนาโปรแกรม Image Measurement Viewer (IMV) เพื่อวัดค่าความเหลื่อมล้ำของลำรังสีเอกซ์กับลำแสงไฟของเครื่องเอกซเรย์

สุรัชย์ ตั๊ยต๊วง

สำนักรังสีและเครื่องมือแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การตรวจสอบคุณภาพเครื่องเอกซเรย์ตามมาตรฐานคุณภาพเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทางการแพทย์ มีข้อกำหนดในการตรวจสอบอุปกรณ์จำกัดลำรังสี โดยการเหลื่อมล้ำระหว่างลำรังสีกับลำแสงไฟในแต่ละด้านของอุปกรณ์จำกัดลำรังสีต้องมีค่าไม่เกิน 1% ของระยะจากตำแหน่งอ้างอิงจุดโฟกัสของหลอดเอกซเรย์ถึงตัวรับภาพ หากลำแสงไฟกับลำรังสีที่ออกมาไม่ตรงกันหรือเกินค่ามาตรฐาน จะทำให้ผลการวินิจฉัยภาพถ่ายทางรังสีเพี้ยนเบนไป ดังนั้นจึงได้พัฒนาโปรแกรม Image Measurement Viewer (IMV) ด้วยภาษา C# เพื่อตรวจสอบการเหลื่อมล้ำลำรังสีกับลำแสงไฟในแต่ละด้านของอุปกรณ์จำกัดลำรังสี ด้านซ้าย ด้านขวา ด้านบน และด้านล่าง โดยเปรียบเทียบการวัดผลความเหลื่อมล้ำด้วยวิธีการอ่านผลด้วยตาเปล่าเทียบกับการอ่านผลด้วยโปรแกรม IMV ที่พัฒนาขึ้น ผลการศึกษา พบว่ามีความแตกต่างสูงสุดอยู่ที่ร้อยละ 75.44 และความแตกต่างต่ำสุดอยู่ที่ร้อยละ 0.17 เมื่อเปรียบเทียบวิธีการอ่านผลด้วยตาเปล่ากับวิธีการอ่านผลด้วยโปรแกรม IMV ในแต่ละด้าน พบว่าด้านขวาไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ส่วนการอ่านผลที่เหลืออีก 3 ด้านนั้นผลที่ได้จากการอ่านผลด้วยโปรแกรม IMV มีความแม่นยำมากกว่าการอ่านผลด้วยตาเปล่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ผลการศึกษาแสดงว่าลำรังสีเอกซ์ที่ปรากฏบนภาพรังสีที่อยู่ระหว่างสเกลที่ไม่ละเอียด เมื่ออ่านค่าด้วยโปรแกรมที่พัฒนาขึ้นมีความถูกต้องของการอ่านค่ามากกว่าการอ่านด้วยตาเปล่า

คำสำคัญ: การตรวจสอบคุณภาพเครื่องเอกซเรย์, ลำรังสีเอกซ์, ลำแสงไฟ, โปรแกรมภาษา C#

Corresponding author E-mail: surachai.t@dmsc.mail.go.th

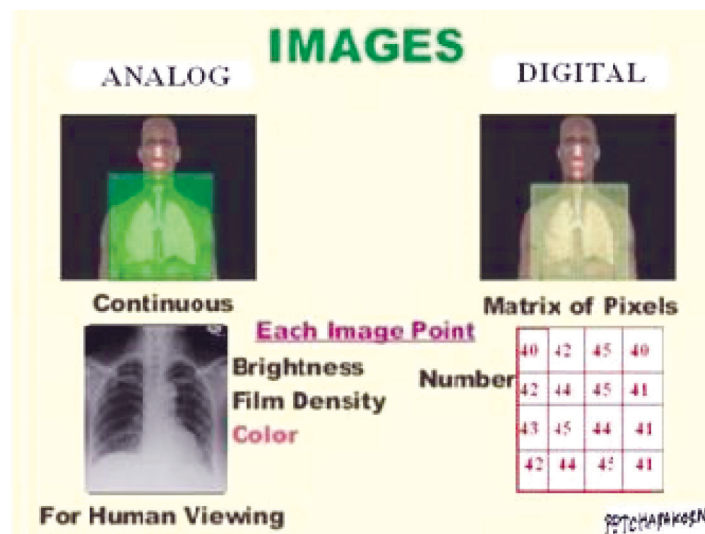
Received: 5 October 2020

Revised: 8 January 2021

Accepted: 16 March 2021

บทนำ

ในการนำรังสีเอกซ์มาช่วยในการวินิจฉัยโรคนั้น ภาพรังสีที่มีคุณภาพดีจะช่วยให้การวินิจฉัยโรคได้ถูกต้องซึ่งจะส่งผลต่อการรักษาผู้ป่วย การสร้างภาพรังสีมีวัตถุประสงค์เพื่อให้เห็นขนาดและรูปร่างของอวัยวะและพยาธิสภาพที่สนใจได้ชัดเจนและถูกต้อง คุณภาพของภาพรังสีจึงเป็นสิ่งสำคัญที่สามารถบอกถึงความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับผู้ป่วย โดยที่ภาพรังสี (Radiographic image) เป็นภาพเงาของวัตถุที่เกิดจากการฉายรังสีเอกซ์ผ่านตัวผู้ป่วยไปกระทบกับอุปกรณ์รับภาพ ได้แก่ DR (Digital Radiography) และ CR (Computed Radiography) โดยเป็นภาพบนคอมพิวเตอร์ที่ใช้ข้อมูลตัวเลขมาสร้างเป็นภาพดิจิทัล หลักการทำงานของ DR คือ เมื่อฉายรังสีเอกซ์ผ่านผู้ป่วยไปกระทบแผ่นรับภาพที่อยู่ตรงกันข้ามทำด้วยสารกึ่งตัวนำ (solid stage image plate) ซึ่งทำหน้าที่ดูดกลืนพลังงานรังสีแล้วแปลงพลังงานที่ได้รับเป็นสัญญาณไฟฟ้า (สัญญาณแอนะล็อก) และแปลงเป็นสัญญาณดิจิทัลเข้าสู่ระบบคอมพิวเตอร์เพื่อสร้างเป็นภาพดิจิทัลสำหรับการใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรค ดังแสดงในภาพที่ 1 เป็นการเปรียบเทียบภาพรังสีแอนะล็อกและดิจิทัล สำหรับหลักการทำงานของ CR คือ เมื่อมีการฉายรังสีเอกซ์ผ่านอวัยวะของผู้ป่วยเข้ามากระทบแผ่นรับภาพ (Photostimulable phosphor หรือ image plate หรือ receptor) มีลักษณะคล้ายกับฟิล์มลบหรือที่เรียกกันทั่วไปว่า คาสเซต (Cassette) สำหรับการถ่ายภาพรังสีทั่วไป ภายในคาสเซตมีแผ่นพลาสติกบาง ฉาบด้วยสารเรืองแสงที่จะทำหน้าที่เป็นตัวเก็บพลังงานรังสีที่ตกกระทบไว้ภายในแผ่นสารเรืองแสงชั่วระยะเวลาหนึ่ง จากนั้นเมื่อต้องการสร้างภาพจะต้องทำการกระตุ้นสารเรืองแสงที่ค้างอยู่ในแผ่นรับภาพด้วยเครื่องอ่านภาพโดยเฉพาะที่เรียกว่า CR Reader⁽¹⁾

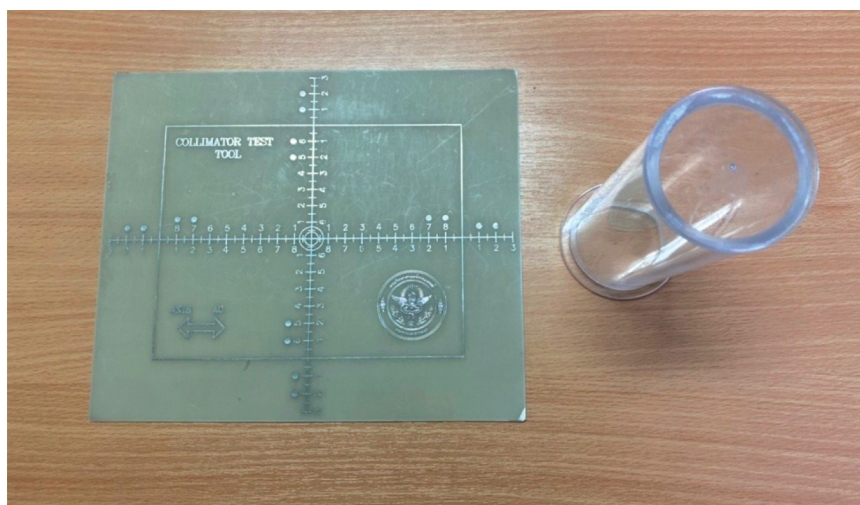


ภาพที่ 1 เปรียบเทียบภาพรังสีแอนะล็อกและดิจิทัล⁽¹⁾

คอลลิเมเตอร์ (Collimator) เป็นส่วนประกอบหนึ่งในเครื่องเอกซเรย์ เป็นอุปกรณ์ที่ทำหน้าที่ควบคุมการปรับขนาดของลำรังสีเอกซ์ ถ้าขนาดของอวัยวะที่ถ่ายภาพเอกซเรย์มีขนาดเพิ่มขึ้น หรือขนาดร่างกายผู้ป่วยใหญ่ขึ้น รังสีกระเจิงจะเพิ่มขึ้น และถ้าผู้ป่วยร่างกายขนาดใหญ่การกำหนดพื้นที่หรือบริเวณถ่ายภาพเอกซเรย์ (x-ray field size) ก็จะต้องเพิ่มขึ้น โอกาสเกิดรังสีกระเจิงก็จะมากขึ้นด้วย การจำกัดพื้นที่รับรังสีจะช่วยลดปริมาณรังสีกระเจิงลงได้ และยังช่วยลดปริมาณรังสีที่ผู้ป่วยได้รับ (Patient dose) การกำหนดขนาดของพื้นที่ลำแสงเอกซเรย์จะสามารถกำหนดได้จากแสงไฟจากหลอดไฟฟ้าในคอลลิเมเตอร์ ซึ่งสะท้อนจากกระจกที่เอียงทำมุมประมาณ 45 องศา ซึ่งสัมพันธ์กับขนาดของแสงเอกซเรย์ที่ออกมาจากปากของหลอดเอกซเรย์ คอลลิเมเตอร์สามารถบอกกึ่งกลางพื้นที่ลำแสงเอกซเรย์ได้

โดยใช้เครื่องหมายกากบาท (x) บนแผ่นพลาสติกที่อยู่ปลายของคอลลิเมเตอร์ เมื่อเปิดแสงไฟส่องแสดงพื้นที่แล้วยังแสดงถึงจุดกึ่งกลางพื้นที่ลำแสงเอกซเรย์ด้วย⁽²⁾

การตรวจสอบเครื่องเอกซเรย์ตามมาตรฐานคุณภาพเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทางการแพทย์ (Quality Standards of Medical Diagnostic X-ray Machines) มีข้อกำหนดในการตรวจสอบอุปกรณ์จำกัดลำรังสี (Beam limiting device) โดยการตรวจสอบความเหลื่อมล้ำระหว่างลำรังสีกับลำแสงไฟในแต่ละด้านของอุปกรณ์จำกัดลำรังสี (ด้านซ้าย ด้านขวา ด้านบน และด้านล่าง โดยกำหนดด้านซ้ายและด้านขวา คือ ด้านมือของผู้ทำการทดสอบ) ต้องมีค่าไม่เกิน 1% ของระยะจากตำแหน่งอ้างอิงจุดโฟกัสของหลอดเอกซเรย์ถึงตัวรับภาพ (Source to Image receptor Distance: SID)⁽³⁾ เครื่องมือที่ใช้ทำการทดสอบอุปกรณ์จำกัดลำรังสี ดังแสดงในภาพที่ 2

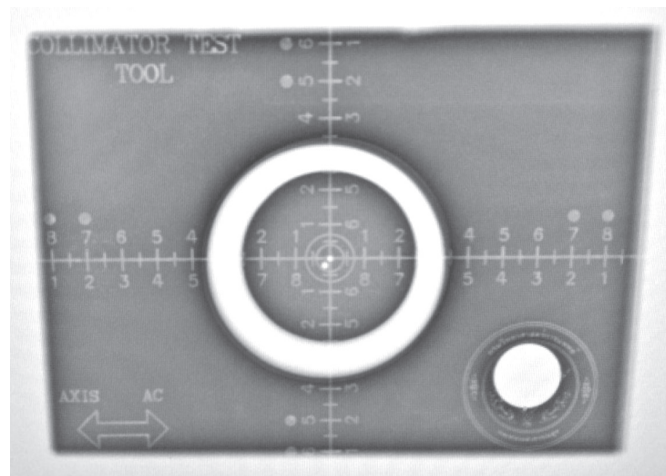


ภาพที่ 2 เครื่องมือทดสอบอุปกรณ์จำกัดลำรังสี (Collimator test tool and beam alignment test tool)

เมื่อถ่ายภาพรังสีลงบนแผ่นเอกซเรย์แบบดิจิทัลโดยการจัดเครื่องมือ ดังแสดงในภาพที่ 3 จะได้ภาพจากการถ่ายภาพรังสี ดังแสดงในภาพที่ 4

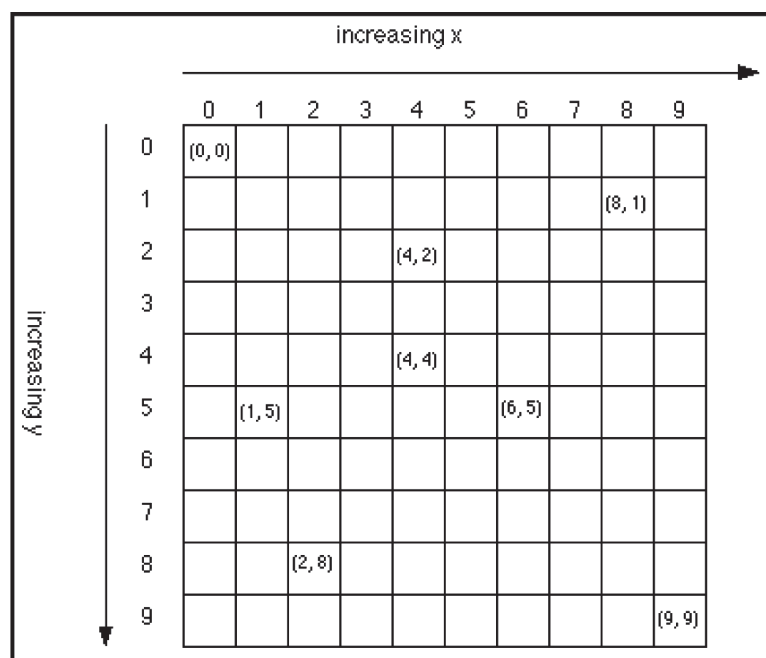


ภาพที่ 3 การทดสอบอุปกรณ์จำกัดลำรังสี (Beam limiting device)



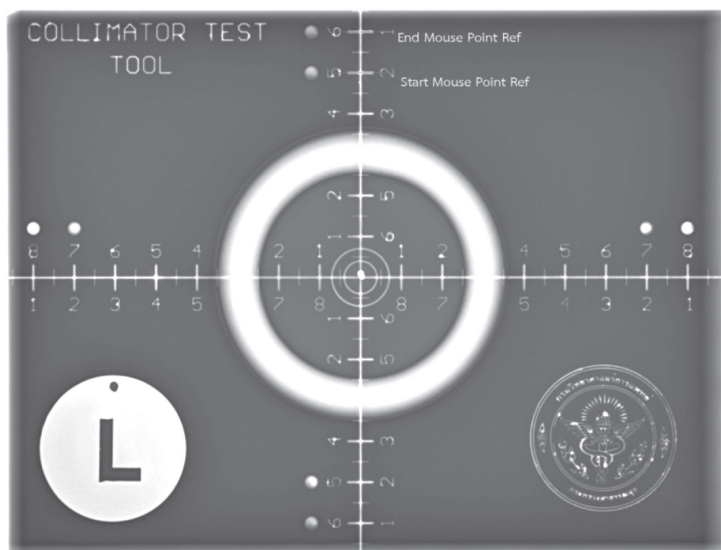
ภาพที่ 4 ภาพถ่ายจากการทดสอบอุปกรณ์จำกัดลำรังสี (Beam limiting device)

ภาพรังสีที่ได้และนำมาประเมินตามมาตรฐานคุณภาพเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทางการแพทย์โดยการเหลื่อมล้ำระหว่างลำรังสีกับลำแสงไฟ ในแต่ละด้านของอุปกรณ์จำกัดลำรังสีต้องมีค่าไม่เกิน 1% ของระยะจากตำแหน่งอ้างอิงจุดโฟกัสของหลอดเอกซเรย์ถึงตัวรับภาพ ซึ่งจะเห็นได้ว่าความละเอียดของสเกลในการวัดมีค่าสูงสุดเพียง 0.5 เซนติเมตร ทำให้อ่านค่าละเอียดได้ค่อนข้างยาก ดังนั้นจึงได้พัฒนาโปรแกรมช่วยในการวัดค่าด้วยภาษา C# โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้สามารถวัดค่าการเหลื่อมล้ำระหว่างลำรังสีกับลำแสงไฟได้ละเอียดยิ่งขึ้น และให้ความแม่นยำค่อนข้างสูง ในการออกแบบโปรแกรมให้วัดค่าโดยใช้หลักการจุดภาพ หรือพิกเซล (Pixel) ซึ่งเป็นหน่วยพื้นฐานของภาพ คือ จุดภาพบนจอแสดงผล หรือจุดภาพในรูปภาพที่รวมกันเป็นภาพขึ้น โดยภาพจะประกอบไปด้วยจุดภาพหรือพิกเซลมากมาย และแต่ละภาพที่สร้างขึ้นจะมีความหนาแน่นของจุดภาพที่เรียกว่า ความละเอียด (Resolution) ที่แตกต่างกันไป จึงใช้ในการบอกคุณสมบัติของภาพ จอภาพ หรืออุปกรณ์แสดงผลภาพได้ จอภาพที่มีจำนวนพิกเซลมากจะมีความละเอียดของภาพมาก โดยมากจะระบุจำนวนพิกเซลเป็นค่าแนวนอน (แกน x) คูณแนวตั้ง (แกน y) เช่น 1600×900 พิกเซล ดังแสดงในภาพที่ 5 ตารางพิกเซลที่ทำให้เกิดภาพบนจอแสดงผล



ภาพที่ 5 ตารางพิกเซล⁽⁶⁾

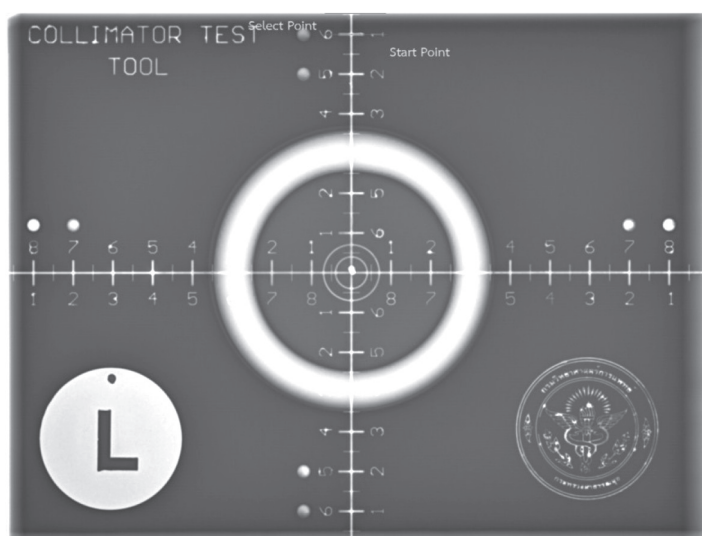
การวัดจำนวนพิกเซลในแนวแกน x และในแนวแกน y จะสามารถคำนวณหาค่าระยะที่ถูกต้องการเลื่อนลำระหว่างลำรังสีกับลำแสงไฟที่อยู่บนภาพถ่ายรังสีได้ โดยค่าสเกลตัวเลขที่อยู่บนภาพถ่ายรังสีจะเป็นตัวอ้างอิงจากการวัด โดยให้จำนวนพิกเซลตั้งแต่ Start Mouse Point Ref ถึงจำนวนพิกเซล End Mouse Point Ref คิดเป็นค่าสเกล 100% ดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 การวัดจุดอ้างอิงบนภาพถ่ายรังสีของตำแหน่ง Start Mouse Point Ref และ End Mouse Point Ref

จำนวนพิกเซลตั้งแต่ Start Point ถึงจำนวนพิกเซล Select Point (ตำแหน่งที่ต้องการวัด) คือ ผลการวัดเมื่อเทียบกับค่าอ้างอิงจากการวัด (End Mouse Point Ref-Start Mouse Point Ref คือ 1 เซนติเมตร จากในภาพ) ดังแสดงในภาพที่ 7 ดังนั้นระยะในการวัดมีค่าเท่ากับผลต่างพิกเซลจากการวัด Start Point ถึง Select Point โดยเทียบกับจุดอ้างอิง (End Mouse Point Ref - Start Mouse Point Ref) จะได้ดังสมการที่ (1)

$$\text{ระยะในการวัด} = \frac{\text{Select Point} - \text{Start Point}}{(\text{End Mouse Point Ref} - \text{Start Mouse Point Ref})} \text{-----(1)}$$



ภาพที่ 7 การวัดบนภาพถ่ายรังสี

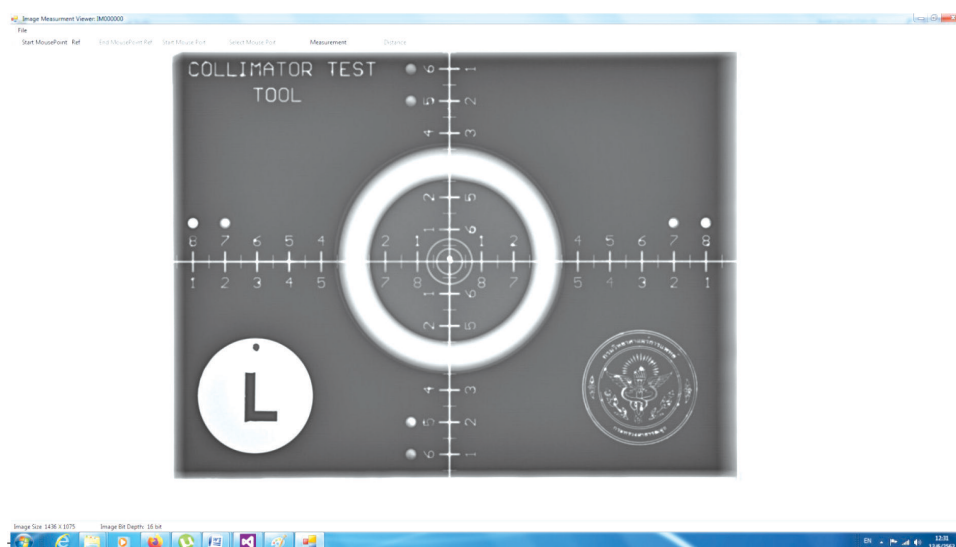
วัสดุและวิธีการ

วัสดุและเครื่องมือ

- ชุดอุปกรณ์ทดสอบจำกัดลำรังสี
 - แผ่น Collimator Test Tool
 - กระบอกร Beam Alignment Test Tool
- แผ่น plate DR/CR ถ่ายภาพรังสีขนาด 15 × 18 นิ้ว ยี่ห้อ Canon รุ่น CXDI-710C Wireless
- ตลับเมตร
- ระดับน้ำ
- เครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทั่วไป ยี่ห้อ SHIMADZU รุ่น MobileDaRt Evolution
- โปรแกรมภาษา C# เพื่อใช้พัฒนา Image Measurement Viewer

วิธีการ

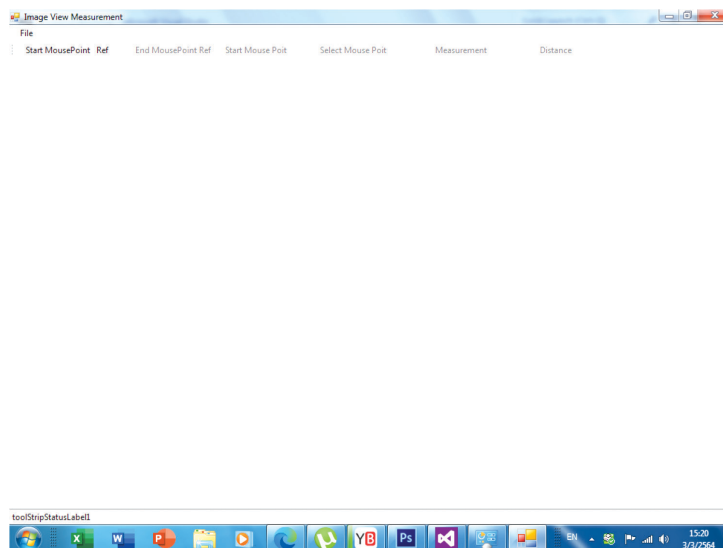
การพัฒนาโปรแกรม Image Measurement Viewer (IMV) ด้วยโปรแกรมภาษา C# โดยทำการบันทึกภาพ Dicom จากเครื่องเอกซเรย์ ยี่ห้อ SHIMADZU รุ่น MobileDaRt Evolution โดยทำการเปิดไฟที่คอลลิเมเตอร์ของหลอดเอกซเรย์เพื่อตรวจสอบการปรับขอบเขตของลำแสงไฟ ให้นำแผ่น Plate DR/CR วางบนเตียงเอกซเรย์ จักระยะจากจุดโฟกัสของหลอดเอกซเรย์ถึงตัวรับภาพ (Source to Image Receptor Distance: SID) ให้เท่ากับ 100 เซนติเมตร แล้ววางชุดทดสอบ Collimator Test Tool บนกึ่งกลางแผ่น plate DR/CR เปิดไฟที่คอลลิเมเตอร์และปรับแสงไฟจากคอลลิเมเตอร์ โดยกำหนดขนาด Field Size ของคอลลิเมเตอร์ให้ได้ขนาด 18 × 14 เซนติเมตร ทำการถ่ายภาพรังสี โดยตั้งค่าเทคนิคการถ่ายภาพรังสี 50 kV 100 mA 32 mSec และบันทึกภาพ Dicom ที่ได้จากการถ่ายภาพรังสี จากนั้นนำภาพ Dicom ดังแสดงในภาพที่ 8 ที่ได้จากการฉายรังสีมาทำการอ่านผลที่ได้ด้วยตาเปล่าทั้ง 4 ด้าน คือ ด้านซ้าย ด้านขวา ด้านบน และด้านล่าง จดบันทึก และนำภาพดังกล่าวมาอ่านผลที่ได้ด้วยโปรแกรมที่พัฒนาขึ้น (IMV) แล้วจดบันทึก เปลี่ยนเจ้าหน้าที่ทำการตรวจสอบเครื่องเอกซเรย์ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (จำนวนเจ้าหน้าที่ทำการอ่านผลทั้งหมด 18 คน) โดยอ่านซ้ำทั้งการอ่านผลด้วยตาเปล่าและอ่านผลด้วยโปรแกรมที่พัฒนาขึ้น (IMV) 6 ครั้ง นำมาหาค่าเฉลี่ย



ภาพที่ 8 โปรแกรม Image Measurement Viewer ที่พัฒนาขึ้น

ขั้นตอนการพัฒนาโปรแกรม Image Measurement Viewer

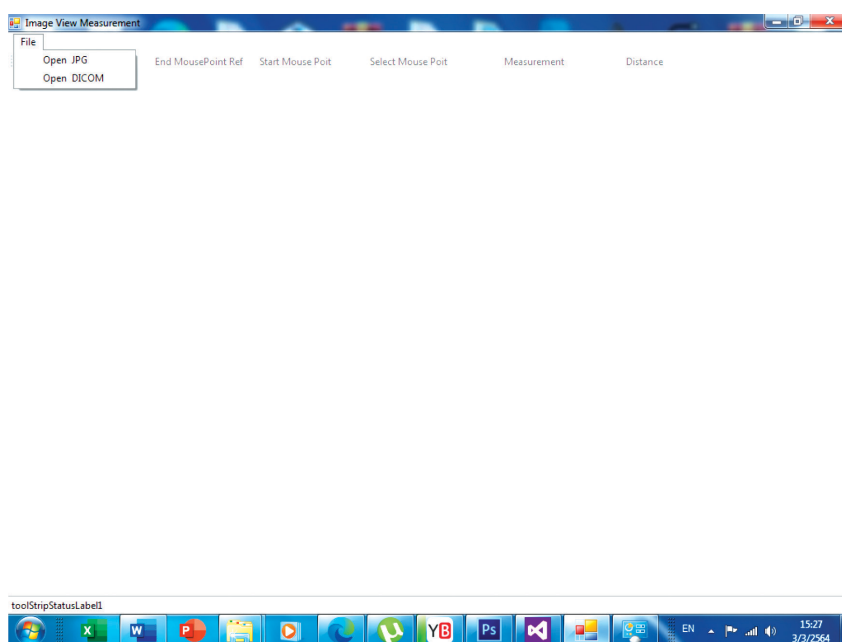
พัฒนาโปรแกรม Image Measurement Viewer ด้วยโปรแกรมภาษา C# ซึ่งโปรแกรมสามารถอ่านไฟล์ภาพถ่ายรังสี (DICOM) ได้ชัดเจน สามารถปรับความคมชัด (Contrast) และความสว่าง (Brightness) ได้ เพื่อให้สามารถวัดภาพที่มีความคมชัดที่สุดสำหรับเจ้าหน้าที่ทำการวัดภาพ รวมทั้งโปรแกรมยังสามารถอ่านไฟล์ภาพต่างๆ ได้ เช่น File นามสกุล *.JPG, *.PNG เมื่อเปิดโปรแกรมขึ้นมาจะได้ดังแสดงในภาพที่ 9



ภาพที่ 9 หน้าโปรแกรมเมื่อเปิดใช้งาน

ขั้นตอนการใช้งานโปรแกรม Image Measurement Viewer

1. ทำการเลือกเมนู File เพื่อเปิดไฟล์ DICOM ดังแสดงในภาพที่ 10



ภาพที่ 10 การเลือกไฟล์ภาพที่ต้องการเปิด

2. เมื่อเปิดไฟล์ภาพที่ต้องการ โปรแกรมจะแสดงภาพถ่ายรังสี (DICOM) ดังแสดงในภาพที่ 11



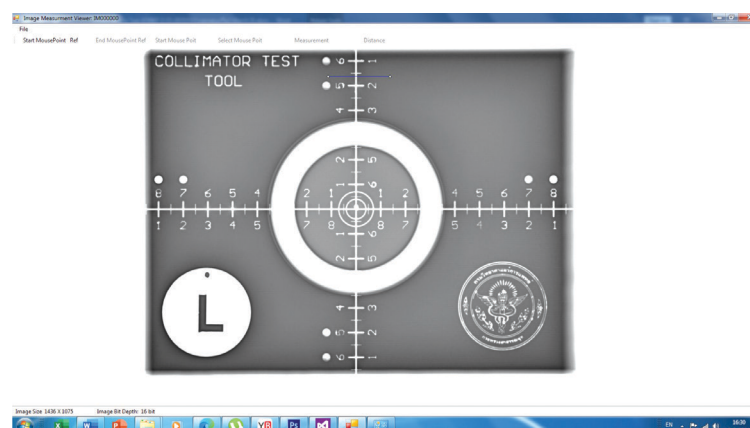
ภาพที่ 11 ภาพถ่ายรังสี ชนิดภาพเป็นไฟล์ DICOM

3. จากนั้นสามารถคลิกเมาส์ขวาเพื่อปรับความคมชัด (Contrast) และปรับความสว่าง (Brightness) ซึ่งควรปรับให้เห็นดังแสดงในภาพที่ 12



ภาพที่ 12 ภาพถ่ายรังสีหลังทำการปรับความคมชัด (Contrast) และปรับความสว่าง (Brightness)

4. เลือกเมนู Measurement เพื่อทำการวัด คลิกเมาส์ซ้ายเพื่อเพิ่มเส้น และทำการวัดดังแสดงในภาพที่ 13 เส้นที่ทำการวัดต้องตรง หากเส้นไม่ตรงสามารถวางเมาส์ไว้ที่ปลายสุดด้านใดก็ได้ให้เมาส์แสดงเป็นลูกศร แล้วปรับเส้นให้ตรง



ภาพที่ 13 เส้นที่ทำการวัด

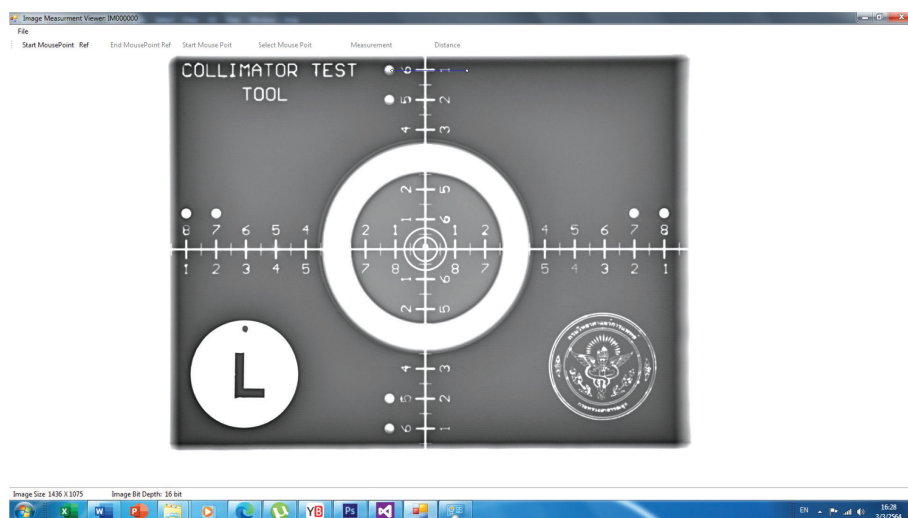
5. เมื่อได้เส้นตรงแล้ว สามารถเลื่อนเส้นไปยังตำแหน่งที่ต้องการวัดโดยเลื่อนเมาส์ไปที่เส้น ให้เมาส์เปลี่ยนเป็นรูปมือ จากนั้นคลิกเมาส์ค้างไว้และเลื่อนไปยังตำแหน่งที่ต้องการ

6. ทำการวัดจุด Start Mouse Point Ref โดยเลื่อนเส้นตรงไปยังตำแหน่งการอ้างอิงเริ่มต้น คลิกเลือก Start Mouse Point Ref ดังแสดงในภาพที่ 14



ภาพที่ 14 เส้นที่ทำกรวัด Start Mouse Point Ref

7. ทำการวัดจุด End Mouse Point Ref โดยเลื่อนเส้นตรงไปยังตำแหน่งการอ้างอิงสุดท้าย คลิกเลือก End Mouse Point Ref จะทำการวัดแค่ครั้งเดียว ดังแสดงในภาพที่ 15



ภาพที่ 15 เส้นที่ทำกรวัด End Mouse Point Ref

8. เมื่อได้ตำแหน่งอ้างอิงจากการวัดข้อ 6 และข้อ 7 ให้ทำการวัด Start Mouse Point โดยเลื่อนเส้นตรงไปยังตำแหน่งที่สนใจวัดการวัดตำแหน่งเริ่มต้น จากนั้นคลิกเลือก Start Mouse Point

9. ทำการวัด Select Mouse Point โดยเลื่อนเส้นตรงไปยังตำแหน่งที่สนใจวัดตำแหน่งสุดท้าย แล้วคลิกเลือก Select Mouse Point

10. ทำซ้ำตามข้อ 8 และข้อ 9 โดยเปลี่ยนตำแหน่งที่ต้องการวัดจนครบทั้ง 4 ด้าน
สำหรับการเขียนโปรแกรมใช้ภาษา C#^(4,5)

ในการพัฒนาโปรแกรม Image Measurement Viewer (IMV)⁽⁶⁾

สถิติที่ใช้ในการศึกษา

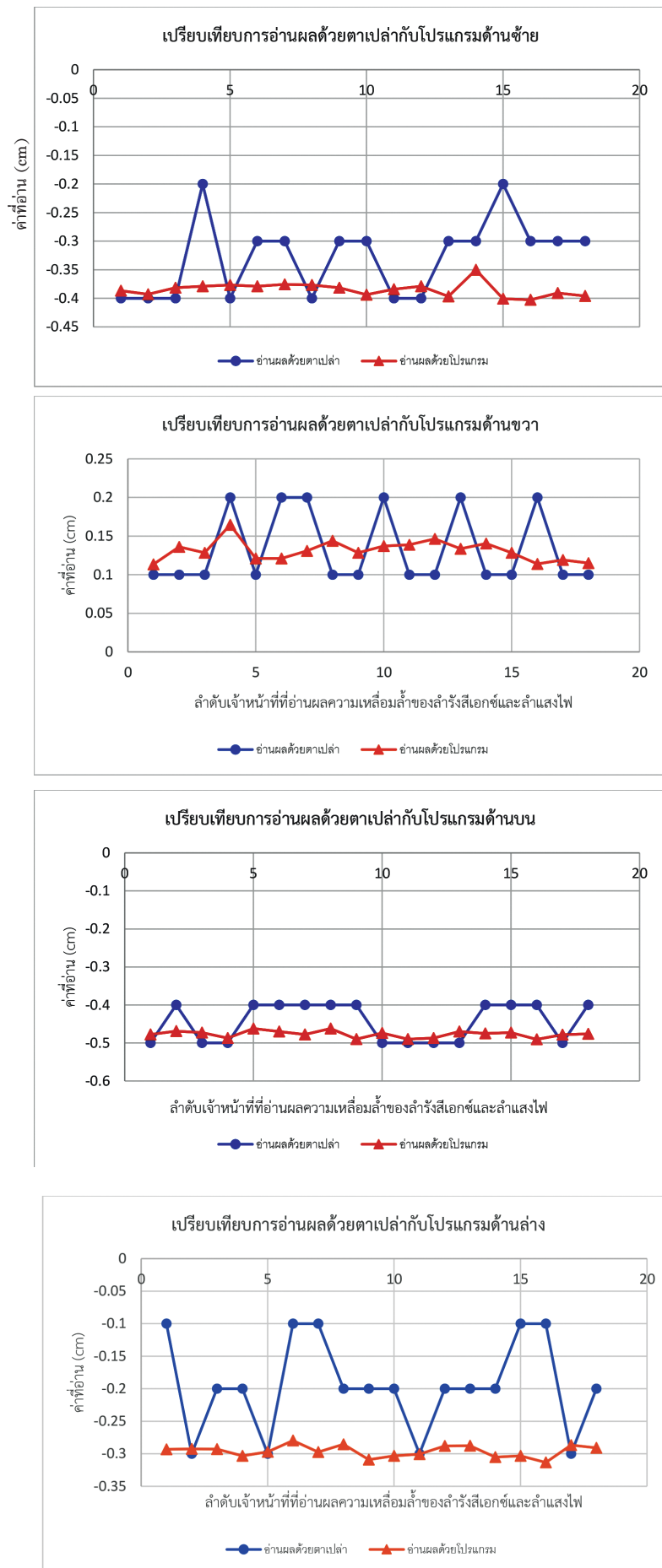
นำข้อมูลที่ได้จากการวัดแต่ละด้านมาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม excel ทดสอบหาความแตกต่างทางสถิติโดยใช้การทดสอบ t-test แบบ Dependent ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p = 0.05$)

ผล

เมื่อให้เจ้าหน้าที่แต่ละคนทำการอ่านภาพจากการถ่ายภาพรังสีด้วยตาเปล่าและอ่านผลด้วยโปรแกรม Image Measurement Viewer ที่พัฒนาขึ้นจากการถ่ายภาพรังสีภาพเดียวกัน ข้อมูลที่ได้มีทั้งค่าบวกและค่าลบ เมื่อเครื่องหมายบวก (+) แสดงทิศทางด้านมากกว่าเส้นขอบเขตของลำแสงไฟที่กำหนด ส่วนเครื่องหมายลบ (-) แสดงทิศทางด้านน้อยกว่าเส้นขอบเขตของลำแสงไฟที่เรากำหนด จากผลที่ได้ พบว่าการอ่านผลด้วยตาเปล่ามีความละเอียดในการวัดได้ทศนิยม 1 ตำแหน่ง ส่วนการอ่านผลด้วยโปรแกรมจะสามารถอ่านผลได้ทศนิยมถึง 3 ตำแหน่ง ดังแสดงในตารางที่ 1 เมื่อนำข้อมูลมาเปรียบเทียบผลการอ่านค่าด้วยตาเปล่ากับด้วยโปรแกรมในแต่ละด้าน แสดงดังในตารางที่ 1 และภาพที่ 16

ตารางที่ 1 ผลการวัดความเหลื่อมล้ำของลำแสงเอกซเรย์กับลำแสงไฟโดยอ่านผลด้วยตาเปล่ากับอ่านผลด้วยโปรแกรม Image Measurement Viewer

ลำดับ (คนที่)	อ่านผลด้วยตาเปล่า (cm)				อ่านผลด้วยโปรแกรม (cm)				ค่า %ความแตกต่างของการอ่านผล			
	ซ้าย	ขวา	บน	ล่าง	ซ้าย	ขวา	บน	ล่าง	ซ้าย	ขวา	บน	ล่าง
1	-0.4	0.1	-0.5	-0.1	-0.387	0.114	-0.478	-0.293	3.49	11.89	4.71	65.87
2	-0.4	0.1	-0.4	-0.3	-0.393	0.136	-0.469	-0.292	1.78	26.47	14.71	2.62
3	-0.4	0.1	-0.5	-0.2	-0.382	0.129	-0.473	-0.293	4.85	22.18	5.82	31.70
4	-0.2	0.2	-0.5	-0.2	-0.379	0.165	-0.487	-0.303	47.23	21.58	2.60	33.99
5	-0.4	0.1	-0.4	-0.3	-0.377	0.121	-0.462	-0.297	6.24	17.36	13.42	1.01
6	-0.3	0.2	-0.4	-0.1	-0.379	0.121	-0.470	-0.280	20.84	65.29	14.89	64.24
7	-0.3	0.2	-0.4	-0.1	-0.375	0.131	-0.478	-0.297	20.11	52.75	16.24	66.37
8	-0.4	0.1	-0.4	-0.2	-0.377	0.144	-0.462	-0.286	6.24	30.48	13.42	29.95
9	-0.3	0.1	-0.4	-0.2	-0.382	0.129	-0.490	-0.309	21.36	22.18	18.40	35.24
10	-0.3	0.2	-0.5	-0.2	-0.394	0.137	-0.474	-0.303	23.79	45.99	5.49	33.99
11	-0.4	0.1	-0.5	-0.3	-0.384	0.139	-0.490	-0.301	4.17	27.88	2.01	0.17
12	-0.4	0.1	-0.5	-0.2	-0.379	0.147	-0.487	-0.288	5.54	31.74	2.60	30.52
13	-0.3	0.2	-0.5	-0.2	-0.397	0.134	-0.470	-0.288	24.34	49.81	6.38	30.48
14	-0.3	0.1	-0.4	-0.2	-0.350	0.141	-0.475	-0.305	14.33	28.83	15.73	34.43
15	-0.2	0.1	-0.4	-0.1	-0.401	0.129	-0.473	-0.303	50.10	22.18	15.34	67.00
16	-0.3	0.2	-0.4	-0.1	-0.403	0.114	-0.491	-0.313	25.50	75.44	18.45	68.09
17	-0.3	0.1	-0.5	-0.3	-0.391	0.119	-0.478	-0.287	23.18	15.97	4.60	4.71
18	-0.3	0.1	-0.4	-0.2	-0.396	0.115	-0.476	-0.291	24.24	13.04	15.93	31.27
ค่าเฉลี่ย	-0.33	0.13	-0.44	-0.19	-0.38	0.13	-0.48	-0.30	14.77	1.68	6.77	34.30
SD	0.067	0.049	0.051	0.073	0.012	0.013	0.009	0.009				



ภาพที่ 16 การอ่านผลด้วยตาเปล่าเปรียบเทียบกับอ่านผลด้วยโปรแกรมในแต่ละด้าน

เมื่อเปรียบเทียบการวัดผลความเหลื่อมล้ำของลำแสงเอกซ์เรย์กับลำแสงไฟ โดยการอ่านผลด้วยตาเปล่ากับการอ่านผลด้วยโปรแกรม IMV จะได้ความแตกต่างสูงสุดร้อยละ 75.44 และร้อยละของความแตกต่างต่ำสุดอยู่ที่ 0.17 เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติ พบว่าการอ่านผลด้วยตาเปล่ากับการอ่านผลด้วยโปรแกรมด้านขวาไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ส่วนผลอีกสามด้านนั้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

วิจารณ์

การอ่านผลของภาพถ่ายรังสีจากการทดลองนี้ใช้จอภาพมอมิเตอร์ที่มีความละเอียด 1920×1080 ซึ่งความละเอียดน้อย หากหน้าจอภาพที่สามารถแสดงผลได้ดีกว่าจะสามารถลดความผิดพลาดจากการอ่านของโปรแกรมได้ ความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้นจากการอ่านผลด้วยโปรแกรม IMV อาจเกิดจากสายตาของผู้ทำการวัด นอกจากนั้นในตัวโปรแกรม IMV ออกแบบให้เส้นเมอส์มีขนาดเล็กเพื่อให้ง่ายในการวางตำแหน่งได้ถูกต้อง เมื่อใช้งานจริงปัญหาที่เกิดขึ้น คือ พบว่าเส้นสเกลที่ภาพถ่ายรังสีมีขนาดใหญ่กว่าเส้นเมอส์ทำให้เกิดความผิดพลาดจากการวางตำแหน่งเมอส์ให้ตรงจุดกึ่งกลางสเกลที่ภาพถ่ายรังสี เป็นผลทำให้เกิดความผิดพลาดมากขึ้น การทดลองครั้งนี้ไม่ได้รวมถึงเครื่องเอกซเรย์ที่มีคอลลิเมเตอร์ที่ให้ภาพขอบเขตไม่ชัดเจน เพราะการประเมินและการพัฒนาด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ทำได้ค่อนข้างยาก และในอนาคตอาจสร้างโปรแกรมวิเคราะห์ภาพเพื่อชดเชยความคมชัดของขอบภาพได้

ถ้าสามารถอ่านหรือวัดความเหลื่อมล้ำของคอลลิเมเตอร์ได้ถูกต้อง แล้วนำค่าที่ได้ไปปรับแต่งคอลลิเมเตอร์ของเครื่องเอกซเรย์ให้มีความเหลื่อมล้ำระหว่างลำรังสีกับลำแสงไฟมีค่าน้อยๆ เพื่อให้ภาพถ่ายทางรังสีอยู่ในขอบเขตที่ต้องการวินิจฉัย จะช่วยลดการถ่ายภาพรังสีซ้ำ ลดปริมาณรังสีสะท้อน และปริมาณรังสีที่ผู้ป่วยได้รับจากการเปิดคอลลิเมเตอร์ที่เกินขนาด ซึ่งจะเป็นอันตรายต่อผู้ป่วยและเจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงานได้

สรุป

การอ่านผลด้วยตาเปล่ามีความละเอียดในการวัดค่อนข้างต่ำ คือ อ่านได้ทศนิยม 1 ตำแหน่ง ส่วนการอ่านผลด้วยโปรแกรม Image Measurement Viewer (IMV) จะสามารถอ่านผลได้ทศนิยม 3 ตำแหน่ง หรือมากกว่า ดังนั้นการอ่านผลด้วยโปรแกรมสามารถให้ความถูกต้องได้ดีกว่าอ่านผลด้วยตาเปล่า สามารถช่วยลดความผิดพลาดในการอ่านได้อย่างมาก

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัย สำนักรังสีและเครื่องมือแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่ให้ความร่วมมือในการเก็บข้อมูล ขอคุณ นางสาวพิมานมาศ ตังตังพิงษ์ และนางสาวอรินญา พงศธรพิศุทธิ์ ที่ให้คำแนะนำแนวทางศึกษาค้นคว้า และผู้ร่วมงานทุกท่านที่ให้ความคิดเห็น ทำให้งานนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Digital radiography system. ใน: เพชรกร หาญพานิชย์, วัลลภ เหล่าไพบูลย์. ระบบสื่อสารและการเก็บข้อมูลภาพทางการแพทย์. [ออนไลน์]. 2550; [สืบค้น 12 ม.ค. 2564]; [3 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://sites.google.com/site/medicaldigitalimage/home/digital-radiography-systems>.
2. จิตต์ชัย สุริยะไชยากร และคณะ. การควบคุมคุณภาพของภาพเอกซเรย์. กรุงเทพฯ: ภาควิชารังสีเทคนิค คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล; 2538. หน้า 111-119.

3. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. มาตรฐานคุณภาพเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทางการแพทย์. กรุงเทพฯ: บริษัท ปิยอนด์ พับลิชชิง จำกัด; 2562.
 4. Code Project. DICOM image viewer. [online]. 2020; [cited 2020 Jun 23]; [8 screens]. Available from: URL: <https://www.codeproject.com/Articles/36014/DICOM-Image-Viewer>.
 5. Gonzalez RC, Woods RE. Digital image processing. 2nd ed. New Jersey: Prentice-Hall; 2002.
 6. คำสั่งโปรแกรม Image Measurement Viewer (IMV). [online]. 2563; เข้าถึงได้ที่: URL: <https://drive.google.com/drive/folders/1DkH51tNIwwGyiNzUjY-jqkdfLmPNa1Ar?usp=sharing>
-

Development of Image Measurement Viewer (IMV) Program to Measure Difference between X-ray Beam and Light Beam of X-ray Machine

Surachai Tuiduang

Bureau of Radiation and Medical Devices, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Testing of X-ray machines according to the quality standards of medical diagnostic tomography have requirement to check light beam. By the overlap between the beam and the light beam each side of the beam limiter shall not exceed 1% of the distance from the x-ray tube focal reference position to the image receiver. If the light beam and the beam do not match or exceed the standard will flatten the results of radiographic diagnosis. Hence, a computer program was written in C# to examine the beam and beam distortion. By comparing the measurement of the X-ray beam with the light beam. By reading results visually and programmatically, the maximum difference% is 75.44% and the minimum difference% is 0.17%.

The data were obtained from the Dependent t-test to compare the reading results with the naked eye compared with the programmed reading (left, right, top and bottom) that each area was different significance statistically or not. Found that reading results with the naked eye and reading results with the program on the right no difference for the remaining three areas of reading, the result is a more accurate reading. This shows that in reading the results with the naked eye, if X-ray beams appear on the radiographs between the imperfect scales, making them more error-prone and different than reading results with a program.

Keywords: X-ray quality control, X-ray beam, Light beam, Program C#

การประเมินการได้รับสัมผัสไนไตรต์และไนเตรต จากการบริโภคผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์

กิตติมา โสนะมิตร และเอกสิทธิ์ เตชานูวัตติ

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ไนไตรต์และไนเตรตเป็นวัตถุเจือปนอาหารใช้เป็นสารกันเสีย ช่วยในการตรึงสี และป้องกันการเกิดกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ แต่สารกลุ่มนี้สามารถก่อผลเสียต่อสุขภาพหากได้รับเข้าสู่ร่างกายในปริมาณมาก ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เลขที่ 389 (พ.ศ. 2561) กำหนดปริมาณสูงสุดของไนไตรต์ที่อนุญาตให้ตกค้างในอาหาร 80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และห้ามใช้ในเนตรต การศึกษานี้ดำเนินการในช่วงปี พ.ศ. 2559-2561 มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินการได้รับสัมผัสไนไตรต์และไนเตรตจากการบริโภคผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปที่เป็นข้อมูลปัจจุบัน ทำให้ทราบถึงสถานการณ์การตกค้างของไนไตรต์และไนเตรต และทราบถึงความเสี่ยงจากการได้รับสารทั้ง 2 ชนิดนี้ โดยตัวอย่างที่ศึกษารวม 1,231 ตัวอย่าง แยกเป็น 15 ประเภท ผลการศึกษาพบปริมาณตกค้างไนไตรต์ในไส้กรอกไก่ ไส้กรอกหมู แหนมหมู หมูแผ่น เนื้อแดดเดียว หมูยอ และลูกชิ้นเนื้อ คิดเป็นจำนวนตัวอย่างที่เกินหรือผิดมาตรฐานร้อยละ 1.6, 3.4, 5.7, 11.1, 40.0, 1.4 และ 1.3 ตามลำดับ ส่วนไนเตรตพบในทุกผลิตภัณฑ์ ยกเว้นลูกชิ้นเนื้อ ปริมาณการได้รับสัมผัสไนไตรต์และไนเตรตเฉลี่ยจากการบริโภคผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่ต่ำ ค่ากลาง และค่าสูงสุดของกลุ่มประชากรทั้งหมด และกลุ่มเฉพาะผู้บริโภค พบว่าการได้รับไนเตรตมีความปลอดภัย แต่การได้รับไนไตรต์ในกลุ่มเฉพาะผู้บริโภค พบว่าสูงกว่าค่าความปลอดภัย จึงจัดว่ามีความเสี่ยงต่อผู้บริโภค ดังนั้นผู้ผลิตควรควบคุมการใช้สารดังกล่าวเพื่อให้ผู้บริโภคปลอดภัย หน่วยงานรัฐที่รับผิดชอบควรมีการเฝ้าระวังโดยการสุ่มเก็บตัวอย่างตรวจวิเคราะห์อย่างต่อเนื่อง และมีการบังคับใช้กฎหมายที่เข้มงวด

คำสำคัญ: การประเมินการได้รับสัมผัส, ไนไตรต์, ไนเตรต, ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์, ค่าความปลอดภัย

Corresponding author E-mail: kittima.s@dmasc.mail.go.th

Received: 22 November 2019

Revised: 19 September 2020

Accepted: 7 January 2021

บทนำ

ในอุตสาหกรรมการผลิตเนื้อสัตว์แปรรูป อาจมีการเติมสารไนไตรต์และไนเตรต หรือเกลือของไนไตรต์ และเกลือของไนเตรต โดยมีวัตถุประสงค์ใช้เป็นสารกันเสียเพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรียคลอสทริเดียม โบทูลินัม (*Clostridium botulinum*) ที่สามารถสร้างสารพิษที่มีความเป็นพิษรุนแรงต่อมนุษย์^(1,2) ไนไตรต์ช่วยป้องกันการเกิดกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ นอกจากนี้ยังใช้ในอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก (cured meat) เพื่อทำให้เกิดสีแดงอมชมพูจากการรวมตัวของไนไตรต์กับไมโอโกลบิน (myoglobin) ในเลือดเป็นโมโนไนโตรซิลฮีโมโครม (mono-nitrosylhaemochrome)⁽²⁾

ไนเตรตสามารถเปลี่ยนไปเป็นไนไตรต์ได้ทั้งจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย หรือระหว่างการเก็บรักษาที่ไม่เหมาะสม หากมนุษย์รับประทานอาหารที่มีไนเตรตเข้าไปในร่างกายมากเกินไป อาจทำให้เป็นอันตรายต่อสุขภาพได้ ซึ่งไนเตรตจะถูกเปลี่ยนเป็นไนไตรต์โดยแบคทีเรียในปากและกระเพาะอาหาร ไนไตรต์จะเปลี่ยนฮีโมโกลบิน (hemoglobin; Hb) เป็นเมทฮีโมโกลบิน (methemoglobin) ทำให้เกิดภาวะขาดออกซิเจนในเซลล์ จนเกิดอาการตัวเขียว อ่อนเพลีย หายใจหอบถี่ ปวดศีรษะ หัวใจเต้นเร็ว โดยเฉพาะเด็กเล็กมีความเป็นพิษรุนแรงมากกว่าผู้ใหญ่⁽³⁾ นอกจากนี้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมของร่างกายภายในระบบทางเดินอาหาร สารไนไตรต์และไนเตรตอาจทำให้เกิด Endogenous N-nitroso Compounds (ENOCs) ซึ่งเป็นสารที่อาจก่อมะเร็ง ปี ค.ศ. 2006 หน่วยงาน International Agency for Research on Cancer (IARC) จัดให้อยู่ใน Group 2A คือ น่าจะเป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ (probably carcinogenic to humans)^(4,5)

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) ได้กำหนดค่า Acceptable Daily Intake (ADI) คือ ค่าปริมาณการได้รับไนเตรตและไนไตรต์ต่อวันโดยไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพตลอดช่วงชีวิตไว้ที่ 0-3.7 และ 0-0.07 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัวต่อวัน^(6,7) ตามลำดับ ในปี 2554 เวณิกา เบ็ญจพงษ์ และคณะ ประเมินการได้รับไนเตรตและไนไตรต์จากการบริโภคเนื้อสัตว์แปรรูปของประชากรไทย สรุปได้ว่า การได้รับสัมผัสไนไตรต์และไนเตรตที่ระดับเฉลี่ยของการบริโภคเนื้อสัตว์แปรรูปในประชากรทั่วไปทุกกลุ่มอายุ มีค่าต่ำกว่า ADI โดยกลุ่มประชากรอายุ 3-5.9 ปี เป็นกลุ่มที่มีระดับความเสี่ยงสูงกว่ากลุ่มอายุอื่น⁽³⁾ ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เลขที่ 389 (พ.ศ. 2561)⁽⁸⁾ ได้ปรับเปลี่ยนกำหนดให้ใช้และปริมาณการตกค้างสำหรับไนไตรต์ไม่เกิน 80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ ได้แก่ ไส้กรอก แฮม เบคอน แหนม กุนเชียง เป็นต้น ส่วนไนเตรตไม่ได้กำหนดมาตรฐาน และห้ามใช้ไนไตรต์ในผลิตภัณฑ์หมูยอ ลูกชิ้น หมูหรือเนื้อสวรรค์ หมูหยอง หมูหรือเนื้อทุบ อย่างไรก็ตามยังคงตรวจพบการตกค้างของไนไตรต์และไนเตรตในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ปริมาณสูงเกินมาตรฐาน นอกจากนั้นยังพบในผลิตภัณฑ์อาหารที่ไม่ระบุปริมาณการใช้ หากร่างกายได้รับในปริมาณมากหรือได้รับเป็นประจำอาจทำให้เกิดอันตราย สำนักรักษาสุขภาพและความปลอดภัยอาหาร จึงได้ศึกษาการประเมินการได้รับสัมผัสไนไตรต์และไนเตรตจากการบริโภคผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ โดยใช้ปริมาณการตกค้างของไนไตรต์และไนเตรตในตัวอย่างที่ส่งวิเคราะห์ ในปีงบประมาณ พ.ศ. 2559-2561 เพื่อทราบสถานการณ์ปริมาณการตกค้างของไนไตรต์และไนเตรต ประเมินการได้รับสัมผัสสารดังกล่าวจากการบริโภคผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ และคำนวณความเสี่ยงโดยนำมาเปรียบเทียบกับค่า ADI และข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้พิจารณา กำหนดมาตรฐานเพื่อคุ้มครองประชาชนจากการบริโภคอาหารกลุ่มเสี่ยงได้

วัสดุและวิธีการ

การประเมินการได้รับสัมผัส (exposure assessment)

การประเมินการได้รับสัมผัสสารจากการบริโภค เป็นการประเมินเชิงปริมาณถึงความเป็นไปได้ที่ผู้บริโภคหนึ่งคนจะได้รับสารไนไตรต์และไนเตรตเข้าไปในร่างกาย ซึ่งต้องใช้ข้อมูลสำคัญ 2 ส่วน คือ 1) ข้อมูลการบริโภคอาหาร

ประจำวันของคนไทย ซึ่งได้จากข้อมูลการบริโภคอาหารของประเทศไทยของสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช.)⁽⁹⁾ 2) ข้อมูลปริมาณไนไตรต์และไนเตรตได้จากการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แต่ละชนิด นำข้อมูลมาคำนวณปริมาณการได้รับสัมผัสของสารไนไตรต์และไนเตรตที่บริโภคต่อวัน โดยใช้การประเมินแบบจุด (point estimation) ตามสมการที่ 1⁽¹⁰⁾

$$\text{การได้รับสัมผัสทางการบริโภค (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัวต่อวัน)} \\ = \frac{\text{ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม อาหาร)} \times \text{ปริมาณการบริโภค (กรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัวต่อวัน)} \dots \text{สมการที่ 1}}{1000}$$

การศึกษาการประเมินการได้รับสัมผัสนี้ ใช้ข้อมูลปริมาณไนไตรต์และไนเตรตที่ตรวจวิเคราะห์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ในปี พ.ศ. 2559-2561 ปริมาณที่คำนวณได้ตามสมการที่ 2 มีการรายงานผลดังนี้ ค่าที่วิเคราะห์ได้ต่ำกว่า LOD จะรายงานไม่พบ ค่าที่วิเคราะห์ได้ต่ำกว่า LOQ จะรายงานน้อยกว่า LOQ ส่วนค่าที่วิเคราะห์ได้เท่ากับและสูงกว่า LOQ จะรายงานค่าที่ตรวจพบ และใช้แนวทางการคำนวณการได้รับสัมผัส 3 แบบ⁽¹¹⁾ ได้แก่

- ค่าต่ำ (lower bound) คือ ผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีค่าต่ำกว่า LOD และค่าต่ำกว่า LOQ จะแทนค่าด้วย “0”
- ค่ากลาง (middle bound) คือ ผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีค่าต่ำกว่า LOD แทนค่าด้วย “1/2 LOD” แต่หากต่ำกว่า LOQ แทนค่าด้วย “1/2 LOQ”
- ค่าสูงสุด (upper bound) คือ ผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีค่าต่ำกว่า LOD แทนค่าด้วย “LOD” แต่หากต่ำกว่า LOQ แทนค่าด้วย “LOQ”

ทั้งนี้เพื่อให้ได้ข้อมูลที่นำมาประเมินการได้รับสัมผัสครอบคลุมช่วงความคลาดเคลื่อนของค่าที่ต่ำกว่า LOD หรือ LOQ ซึ่งไม่สามารถระบุปริมาณที่แน่นอนได้

คำนวณปริมาณการได้รับไนไตรต์และไนเตรตจากแต่ละผลิตภัณฑ์ โดยใช้ค่าเฉลี่ยของปริมาณสารแต่ละผลิตภัณฑ์ และปริมาณการบริโภคสำหรับประชากรทั้งหมด (per capita) และเฉพาะผู้ที่บริโภค (eater only) อายุ 3 ปีขึ้นไป รายงานเป็นปริมาณอาหารต่อน้ำหนักตัวผู้บริโภคต่อวัน นำปริมาณการได้รับสารจากทุกผลิตภัณฑ์มารวมเป็นปริมาณการได้รับสารทั้งหมด (total exposure) จากการบริโภคผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ จากนั้นนำไปเปรียบเทียบกับค่า ADI ของไนไตรต์และไนเตรต โดยคำนวณเป็น margin of safety (MOS)

การเปรียบเทียบการได้รับสัมผัสกับค่า ADI

เพื่อให้ทราบถึงความเสี่ยงของการได้รับไนไตรต์และไนเตรตจากการบริโภคผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ โดยใช้ค่า MOS ซึ่งคำนวณได้ดังนี้⁽¹⁰⁾

$$\text{MOS} = \frac{\text{Total exposure}}{\text{HBGV}}$$

Health-based guidance value (HBGV) แทนด้วยค่า ADI สำหรับไนไตรต์และไนเตรต คือ 0.07 และ 3.7 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมของผู้บริโภคต่อวัน ตามลำดับ

ถ้า MOS น้อยกว่า 1 แสดงว่าปริมาณสารที่ร่างกายได้รับไม่ก่อให้เกิดผลที่ไม่พึงประสงค์, MOS มากกว่า 1 แสดงว่าปริมาณสารที่ร่างกายได้รับเกินค่าความปลอดภัย

วิธีวิเคราะห์

สารมาตรฐานและสารเคมี

สารมาตรฐาน: potassium nitrate และ sodium nitrite มีความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 99.0%

สารเคมี: acetonitrile (HPLC grade), glycerol (AR grade), lithium hydroxide anhydrous หรือ lithium hydroxide monohydrate (AR grade), boric acid (AR grade), hydrochloric acid (AR grade), gluconic acid solution 50% v/v (AR grade)

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่อง HPLC พร้อมด้วย Photodiode Array Detector โดยมีส่วนประกอบอื่น ๆ ของระบบ HPLC เช่น quaternary pump, auto injector และ column: IC-Pak™ Anion HC (150 × 4.6 mm), เครื่องซั่ง 4 ตำแหน่ง, กระดาษกรอง Whatman No.1, syringe filter (nylon ชนิด GMF ขนาด 0.45 หรือ 0.2 µm, dia. 13 mm) และเครื่องแก้ว class A

ตัวอย่าง

ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่ศึกษาเป็นผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปจากเนื้อสัตว์ในขบวนการผลิต ผู้ผลิตอาจมีการเติมไนไตรต์หรือไนเตรตเพื่อใช้เป็นสารกันเสีย จึงมีโอกาสเสี่ยงสูงเมื่อเปรียบเทียบกับสารกันเสียที่ไม่ผ่านการแปรรูป โดยตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปที่ศึกษานี้ จำนวน 1,231 ตัวอย่าง แบ่งเป็น 15 ประเภท ประกอบด้วย ไส้กรอกไก่ ไส้กรอกหมู (เช่น มินิค็อกเทล โบโลน่า) ไส้กรอกอีสาน แหนมหมู หมูยอ กุนเชียง แฮม เบคอน หมูแผ่น หมูแดดเดียว เนื้อแดดเดียว ลูกชิ้นหมู ลูกชิ้นเนื้อ ลูกชิ้นปลา และลูกชิ้นไก่ เก็บตัวอย่างและส่งตรวจโดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา สำนักงานสาธารณสุขจังหวัด และบริษัทเอกชนต่าง ๆ ในช่วงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2558 ถึง กันยายน พ.ศ. 2561

วิธีวิเคราะห์ปริมาณไนไตรต์หรือไนเตรต

ซั่งตัวอย่างที่บดแล้วประมาณ 10 กรัม (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) เติมน้ำร้อน (50–60 °C) จำนวน 50 มิลลิลิตร กวนให้เข้ากัน แล้วถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 200 มิลลิลิตร เติม acetonitrile จำนวน 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้ถึงอุณหภูมิห้อง และปรับปริมาตรด้วยน้ำก่จัดไอออน (DI) กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 จากนั้นกรองผ่าน syringe filter ชนิด nylon ขนาด 0.45 µm หากตัวอย่างไม่ใสให้กรองผ่าน syringe filter ขนาด 0.2 µm ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC ทำการวิเคราะห์ blank โดยใช้ DI แทนตัวอย่าง จำนวน 10 มิลลิลิตร

$$\text{ปริมาณไนไตรต์หรือไนเตรต (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)} = \frac{c \times v \times F}{w} \quad \dots\dots\dots \text{สมการที่ 2}$$

เมื่อ c = ปริมาณไนเตรตหรือไนไตรต์ในตัวอย่างที่อ่านจากกราฟ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

v = ปริมาตรของตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

w = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

F = dilution factor

วิธีวิเคราะห์ปริมาณไนไตรต์และไนเตรตในงานวิจัยครั้งนี้ใช้วิธีมาตรฐาน BS EN 12014-4: 2005⁽¹²⁾ เป็นวิธีที่ใช้ในงานประจำ ประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์สำหรับไนไตรต์และไนเตรตได้ผลดังนี้ ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection: LOD) เท่ากับ 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation: LOQ) เท่ากับ 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ การควบคุมคุณภาพทุกชุดของการตรวจวิเคราะห์พบ %RPD ของการวิเคราะห์ซ้ำ (duplicate) ไม่เกิน 5% วิเคราะห์ control sample (เนื้อหมูปด)

โดยค่าที่ได้อยู่ในช่วง $\pm 3SD$ และมีการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing) กับหน่วยงาน Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS) ต่อเนื่องเป็นประจำทุกปี ผลอยู่ในเกณฑ์น่าพอใจ ($z\text{-score} < 2$) และเป็นรายการทดสอบที่ได้รับการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025: 2017

ผล

ปริมาณไนไตรต์และไนเตรตในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป

ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณไนไตรต์และไนเตรตในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ ในช่วงปีงบประมาณ พ.ศ. 2559–2561 จำนวน 1,231 ตัวอย่าง จำแนกได้เป็น 15 ชนิด ได้แก่ ไส้กรอกไก่ ไส้กรอกหมู แหนมหมู แฮม เบคอน หมูแผ่น เนื้อแดดเดียว หมูแดดเดียว ไส้กรอกอีสาน หมูยอ กุนเชียงหมู ลูกชิ้นเนื้อ ลูกชิ้นหมู ลูกชิ้นปลา และลูกชิ้นไก่ จำนวน 121, 293, 140, 39, 10, 18, 10, 13, 14, 71, 164, 76, 150, 78 และ 34 ตัวอย่าง ตามลำดับ พบไนไตรต์ ในไส้กรอกไก่ ไส้กรอกหมู แหนมหมู แฮม เบคอน หมูแผ่น และเนื้อแดดเดียว จำนวน 78, 173, 17, 18, 6, 2 และ 4 ตัวอย่าง ตามลำดับ โดยพบไนไตรต์เกินหรือผิดมาตรฐานในตัวอย่างไส้กรอกไก่ 2 ตัวอย่าง ไส้กรอกหมู 10 ตัวอย่าง แหนมหมู 8 ตัวอย่าง หมูแผ่น 2 ตัวอย่าง และเนื้อแดดเดียว 4 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 1.6, 3.4, 5.7, 11.1, 40.0 ตามลำดับ สำหรับไส้กรอกอีสาน หมูยอ กุนเชียงหมู และลูกชิ้นเนื้อ ตรวจพบไนไตรต์ผลิตภัณฑ์ละ 1 ตัวอย่าง ซึ่งหมูยอและลูกชิ้นเนื้อ พบผิดมาตรฐานผลิตภัณฑ์ละ 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 1.4 และ 1.3 ตามลำดับ สำหรับไนเตรต ตรวจพบในตัวอย่างทุกประเภท ยกเว้นลูกชิ้นเนื้อ ดังแสดงในตารางที่ 1

การประเมินการได้รับสัมผัส (exposure assessment)

จากข้อมูลปริมาณเฉลี่ยของไนไตรต์และไนเตรต และปริมาณการบริโภคของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ประเภทต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 2 นั้น สามารถนำมาคำนวณปริมาณการได้รับสัมผัสไนไตรต์และไนเตรตจากผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่บริโภคประจำวัน พบว่าปริมาณการได้รับสัมผัสสารไนไตรต์จากการบริโภคผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ทั้งหมด (total exposure) ของกลุ่มประชากรทั้งหมด (per capita) ที่ lower bound, middle bound และ upper bound ที่ปริมาณการบริโภคเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 0.0044, 0.0061 และ 0.0077 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัวต่อวัน ตามลำดับ ส่วนปริมาณการบริโภคที่ 97.5 เปอร์เซ็นไทล์ มีค่าเท่ากับ 0.0417, 0.0549 และ 0.0682 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัวต่อวัน ตามลำดับ สำหรับไนเตรตที่ปริมาณการบริโภคเฉลี่ย มีค่าเท่ากับ 0.0064, 0.0103 และ 0.0139 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัวต่อวัน และปริมาณการบริโภคที่ 97.5 เปอร์เซ็นไทล์ มีค่าเท่ากับ 0.0617, 0.0934 และ 0.1249 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัวต่อวัน ดังแสดงในตารางที่ 3

สำหรับปริมาณการได้รับสัมผัสสารไนไตรต์จากการบริโภคผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ทั้งหมดของกลุ่มเฉพาะผู้บริโภค (eater only) ที่ lower bound, middle bound และ upper bound ที่ปริมาณการบริโภคเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 0.1141, 0.1409 และ 0.1678 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัวต่อวัน ตามลำดับ ส่วนปริมาณการบริโภคที่ 97.5 เปอร์เซ็นไทล์ มีค่าเท่ากับ 0.3444, 0.4191 และ 0.4934 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัวต่อวัน ตามลำดับ สำหรับไนเตรตที่ปริมาณการบริโภคเฉลี่ย มีค่าเท่ากับ 0.1961, 0.2610 และ 0.3256 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัวต่อวัน และปริมาณการบริโภคที่ 97.5 เปอร์เซ็นไทล์ มีค่าเท่ากับ 0.5461, 0.7289 และ 0.9119 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัวต่อวัน ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 1 ปริมาณไนไตรต์และไนเตรตในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป

ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบ (%)		ปริมาณที่ตรวจพบ (มก./กก.) ค่าเฉลี่ย* ค่าต่ำสุด-ค่าสูงสุด		จำนวนตัวอย่างที่เกินหรือผิดมาตรฐาน (%)	
		ไนไตรต์	ไนเตรต	ไนไตรต์	ไนเตรต	ไนไตรต์	ไนเตรต
ไส้กรอกไก่	121	78 (64.5%)	46 (38.0%)	33.9 น้อยกว่า 10-103	17.3 น้อยกว่า 20-53.9	2 (1.6%)	46 (38.0%)
ไส้กรอกหมู	293	173 (59.0%)	132 (45.0%)	39.7 น้อยกว่า 10-258	42.2 น้อยกว่า 20-2532	10 (3.4%)	132 (45.0%)
แฮมหมู	140	17 (12.1%)	79 (56.4%)	126.2 น้อยกว่า 10-607	162.4 น้อยกว่า 20-2800	8 (5.7%)	79 (56.4%)
แฮม	39	18 (46.2%)	16 (41.0%)	47.8 18.6-78.7	31.8 น้อยกว่า 20-116	-	16 (41.0%)
เบคอน	10	6 (60.0%)	4 (40.0%)	34.8 14.0-62.3	15.1 น้อยกว่า 20-30.3	-	4 (40.0%)
หมูแผ่น	18	2 (11.1%)	4 (22.2%)	16.6 น้อยกว่า 10-28.1	15.2 น้อยกว่า 20-30.8	2 (11.1%)	4 (22.2%)
เนื้อแดดเดียว	10	4 (40.0%)	4 (40.0%)	109.4 99.4-124	58.0 52.5-65.6	4 (40.0%)	4 (40.0%)
หมูแดดเดียว	13	-	8 (61.5%)	-	278.0 น้อยกว่า 20-1691	-	8 (61.5%)
ไส้กรอกอีสาน	14	1 (7.1%)	8 (57.1%)	47.4	18.1 น้อยกว่า 20-49.4	-	8 (57.1%)
หมูยอ	71	1 (1.4%)	3 (4.2%)	33.2	17.7 น้อยกว่า 20-33.2	1 (1.4%)	3 (4.2%)
กุนเชียงหมู	164	1 (0.6%)	55 (33.5%)	47.4	55.3 น้อยกว่า 20-708	-	55 (33.5%)
ลูกชิ้นเนื้อ	76	1 (1.3%)	-	223.0	-	1 (1.3%)	-
ลูกชิ้นหมู	150	-	4 (0.7%)	-	39.6 น้อยกว่า 20-75.0	-	4 (2.7%)
ลูกชิ้นปลา	78	-	2 (2.6%)	-	50.4 44.7-56.0	-	2 (2.6%)
ลูกชิ้นไก่	34	-	2 (2.9%)	-	26.7 น้อยกว่า 20-43.4	-	2 (5.9%)

หมายเหตุ * ค่าเฉลี่ย คำนวณเฉพาะตัวอย่างที่ตรวจพบ โดยที่ค่าน้อยกว่า LOQ แทนด้วย 1/2 LOQ
- หมายถึง ตรวจไม่พบไนไตรต์ หรือไนเตรตหรือไม่พบตัวอย่างที่เกินหรือผิดมาตรฐาน

ตารางที่ 2 ปริมาณเฉลี่ยของไนไตรต์และไนเตรต และปริมาณการบริโภคของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ประเภทต่างๆ

ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์	ปริมาณเฉลี่ย (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)				ปริมาณการบริโภค* (กรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน)			
	ไนไตรต์		ไนเตรต		ประชากรทั้งหมด (per capita)		เฉพาะผู้บริโภค (eater only)	
	lower bound**	middle bound**	upper bound**	lower bound**	middle bound**	upper bound**	ค่าเฉลี่ย	เปอร์เซ็นต์ไทล์
ไส้กรอกไก่	21.4983	22.7587	24.0190	3.8463	9.6727	15.4992	0.06	0.58
ไส้กรอกหมู	23.0990	24.3362	25.5734	15.9932	21.7440	27.4949	0.1	0.89
แฮมหมู	15.2903	17.5224	19.7546	89.7971	93.8329	97.8686	0.02	0.24
แฮม	22.0615	23.4077	24.7538	12.6359	16.9949	21.3538	0.003	0.01
เบคอน	20.8800	21.8800	22.8800	3.0300	9.0300	15.0300	0.002	0.02
หมูแผ่น	1.5611	4.0611	6.5611	1.7111	7.2667	12.8222	0.001	0.01
เนื้อแดดเดียว	43.7600	45.2600	46.7600	23.2000	26.2000	29.2000	0.005	0.05
หมูแดดเดียว	0.0000	2.5000	5.0000	170.3154	173.0077	175.7000	0.01	0.08
ไส้กรอกอีสาน	3.3857	5.7071	8.0286	6.0429	12.4714	18.9000	0.02	0.23
หมูยอ	0.4676	2.9324	5.3972	0.4676	5.5380	10.6085	0.07	0.54
กุนเชียงหมู	0.2890	2.7738	5.2585	17.4622	21.8829	26.3037	0.03	0.24
ลูกชิ้นเนื้อ	1.0000	3.4888	5.9776	0.0000	5.0000	10.0000	0.09	0.85
ลูกชิ้นหมู	0.0000	2.5000	5.0000	0.9213	5.9213	10.9213	0.19	1.14
ลูกชิ้นปลา	0.0000	2.5000	5.0000	1.2923	6.1641	11.0359	0.06	0.6
ลูกชิ้นไก่	0.0000	2.5000	5.0000	1.2765	6.2765	11.2765	0.06	0.69

หมายเหตุ * ปริมาณการบริโภคของกลุ่มประชากรทั้งหมด (per capita) และกลุ่มเฉพาะผู้บริโภค (eater only) สำหรับอายุ 3 ปีขึ้นไป

** lower bound คือ ข้อมูลที่มีค่าต่ำกว่า LOD และ LOQ ใช้ค่าเท่ากับ “0”

middle bound คือ ข้อมูลที่มีค่าต่ำกว่า LOD หรือ LOQ ใช้ค่าเท่ากับ “1/2 LOD หรือ 1/2 LOQ”

upper bound คือ ข้อมูลที่มีค่าต่ำกว่า LOD หรือ LOQ ใช้ค่าเท่ากับ “LOD หรือ LOQ” (คำนวณจากข้อมูลทั้งหมดที่พบและไม่พบ)

ตารางที่ 3 ปริมาณการได้รับสัมผัสไนไตรต์และไนเตรตจากการบริโภคผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ของกลุ่มประชากรทั้งหมด(per capita) และค่า MOS

	ปริมาณการบริโภคเฉลี่ย*			ปริมาณการบริโภคที่ 97.5 เปอร์เซ็นไทล์*		
	Lower bound**	Middle bound**	Upper bound**	Lower bound**	Middle bound**	Upper bound**
Total exposure (mg/kg bw/day)	MOS	Total exposure (mg/kg bw/day)	MOS	Total exposure (mg/kg bw/day)	MOS	Total exposure (mg/kg bw/day)
ไนไตรต์	0.0044	0.0061	0.0077	0.0417	0.0549	0.0682
ไนเตรต	0.0064	0.0103	0.0139	0.0617	0.0934	0.1249

หมายเหตุ * ปริมาณการบริโภคของกลุ่มประชากรทั้งหมด (per capita) สำหรับอายุ 3 ปีขึ้นไป
** lower bound คือ ข้อมูลที่มีค่าต่ำกว่า LOD และ LOQ ใช้ค่าเท่ากับ “0”
middle bound คือ ข้อมูลที่มีค่าต่ำกว่า LOD หรือ LOQ ใช้ค่าเท่ากับ “1/2 LOD หรือ 1/2 LOQ”
upper bound คือ ข้อมูลที่มีค่าต่ำกว่า LOD หรือ LOQ ใช้ค่าเท่ากับ “LOD หรือ LOQ” (คำนวณจากข้อมูลทั้งหมดทั้งที่พบและไม่พบ)

ตารางที่ 4 ปริมาณการได้รับสัมผัสไนไตรต์และไนเตรตจากการบริโภคผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ของกลุ่มเฉพาะที่บริโภค (eater only) และค่า MOS

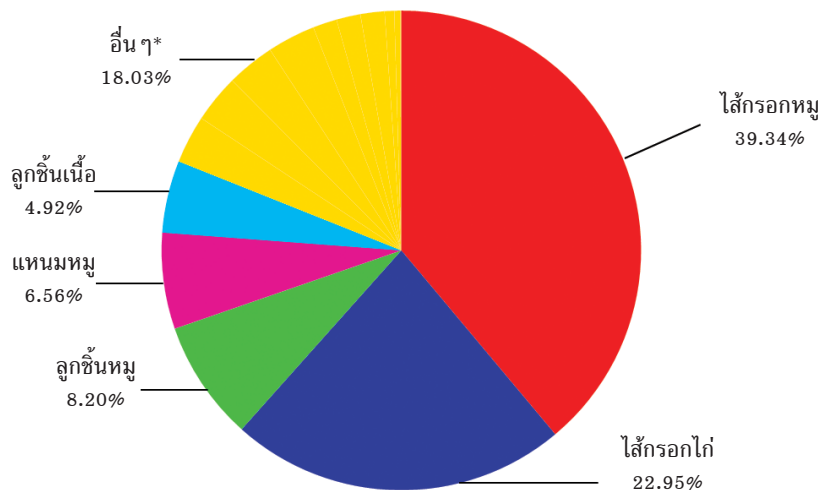
	ปริมาณการบริโภคเฉลี่ย*			ปริมาณการบริโภคที่ 97.5 เปอร์เซ็นไทล์*		
	Lower bound**	Middle bound**	Upper bound**	Lower bound**	Middle bound**	Upper bound**
Total exposure (mg/kg bw/day)	MOS	Total exposure (mg/kg bw/day)	MOS	Total exposure (mg/kg bw/day)	MOS	Total exposure (mg/kg bw/day)
ไนไตรต์	0.1141	0.1409	0.1678	0.3444	0.4191	0.4934
ไนเตรต	0.1961	0.2610	0.3256	0.5461	0.7289	0.9119

หมายเหตุ * ปริมาณการบริโภคของกลุ่มเฉพาะผู้บริโภค (eater only) สำหรับอายุ 3 ปีขึ้นไป
** lower bound คือ ข้อมูลที่มีค่าต่ำกว่า LOD และ LOQ ใช้ค่าเท่ากับ “0”
middle bound คือ ข้อมูลที่มีค่าต่ำกว่า LOD หรือ LOQ ใช้ค่าเท่ากับ “1/2 LOD หรือ 1/2 LOQ”
upper bound คือ ข้อมูลที่มีค่าต่ำกว่า LOD หรือ LOQ ใช้ค่าเท่ากับ “LOD หรือ LOQ” (คำนวณจากข้อมูลทั้งหมดทั้งที่พบและไม่พบ)

การเปรียบเทียบปริมาณการได้รับสัมผัสสารกับค่า ADI

ผลการเปรียบเทียบปริมาณการได้รับสัมผัสไนไตรต์กับค่า ADI โดยแสดงเป็นค่า MOS พบว่าในกลุ่มประชากรทั้งหมดที่การบริโภคเฉลี่ย และ 97.5 เปอร์เซ็นไทล์ ที่ lower bound, middle bound และ upper bound มีค่า MOS น้อยกว่า 1 ดังแสดงในตารางที่ 3 ส่วนในกลุ่มประชากรเฉพาะที่บริโภค พบว่าค่า MOS มากกว่า 1 ดังแสดงในตารางที่ 4 สำหรับปริมาณการได้รับสัมผัสไนไตรต์ที่การบริโภคเฉลี่ย และ 97.5 เปอร์เซ็นไทล์ ที่ lower bound, middle bound และ upper bound ทั้งในกลุ่มประชากรทั้งหมด และกลุ่มที่บริโภคเฉพาะ พบว่าค่า MOS น้อยกว่า 1 ดังแสดงในตารางที่ 3 และ 4

เมื่อพิจารณาการได้รับสัมผัสสารไนไตรต์ที่ middle bound ของกลุ่มประชากรทั้งหมด ที่คำนวณโดยใช้ค่าเฉลี่ยของปริมาณสาร และปริมาณการบริโภคของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ประเภทต่างๆ พบว่าไส้กรอกหมู เป็นผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่ทำให้ปริมาณการได้รับสัมผัสไนไตรต์สูงเมื่อเทียบกับผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ชนิดอื่น รองลงมา ได้แก่ ไส้กรอกไก่ ลูกชิ้นหมู แหนมหมู และลูกชิ้นเนื้อ คิดเป็นร้อยละของการได้รับสัมผัสทั้งหมด เท่ากับ 39.34, 22.95, 8.20, 6.56 และ 4.92 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 1



* หมูยอ, เนื้อแดดเดียว, ลูกชิ้นปลา, ลูกชิ้นไก่, ไส้กรอกอีสาน, กุนเชียง, แฮม, เบคอน, หมูแดดเดียว และหมูแผ่น

ภาพที่ 1 ร้อยละของการได้รับสัมผัสไนไตรต์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แต่ละประเภทที่ middle bound ที่ปริมาณการบริโภคเฉลี่ยของกลุ่มประชากรทั้งหมด (per capita)

วิจารณ์

จากผลการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ในช่วงปีงบประมาณ พ.ศ. 2559-2561 จำนวน 1,231 ตัวอย่าง พบว่ามีการนำไนไตรต์มาใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์เหล่านี้เกือบทุกผลิตภัณฑ์ ยกเว้นลูกชิ้นเนื้อ ซึ่งไนไตรต์ไม่ได้อนุญาตการใช้ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 381 (พ.ศ. 2559)⁽¹³⁾ ซึ่งต่อมาปรับเป็นฉบับที่ 389 (พ.ศ. 2561) ในขณะที่ไนไตรต์ตามกฎหมายดังกล่าวอนุญาตให้ตกค้างได้ไม่เกิน 80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ ได้แก่ เบคอน แฮม แหนม ไส้กรอก กุนเชียง และไส้กรอกอีสาน จากผลการวิเคราะห์ พบว่ามีสารไนไตรต์ตกค้างในหมูยอ หมูแผ่น เนื้อแดดเดียว และลูกชิ้นเนื้อ นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ประเภทหมูยอและลูกชิ้น หากมีการใช้ร่วมกับวัตถุกันเสียชนิดกรดซอร์บิกในผลิตภัณฑ์ด้วยจะทำให้ผิดมาตรฐานเพิ่ม เนื่องจากประกาศฯ ระบุไว้ว่าห้ามใช้ไนไตรต์ร่วมกับสารกันเสีย

กลุ่มซอร์เบต แต่อย่างไรก็ตามตรวจพบไนไตรต์ในหมูยอและลูกชิ้นเพียงผลิตภัณฑ์ละ 1 ตัวอย่างเท่านั้น ทั้งนี้ไนไตรต์และไนเตรตที่ตรวจพบการตกค้างในผลิตภัณฑ์มีปริมาณเกินหรือผิดมาตรฐาน สาเหตุอาจเนื่องมาจากผู้ประกอบการยังขาดความรู้ ความเข้าใจ ถึงข้อกำหนดที่มีการปรับเปลี่ยนใหม่ โดยเฉพาะไนเตรตจากเดิมตามประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา⁽¹⁴⁾ ที่เคยอนุญาตให้ใช้ได้ไม่เกิน 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แต่ได้มีประกาศฉบับใหม่ฉบับที่ 389 (พ.ศ. 2561) ไม่ระบุให้ใช้ไนเตรต ซึ่งผู้ประกอบการอาจยังไม่ได้ปรับสูตรการผลิตเนื่องจากผลิตภัณฑ์ได้รับอนุญาตก่อนที่ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 381 (พ.ศ. 2559) และฉบับที่ 389 (พ.ศ. 2561) ประกาศใช้

การประเมินปริมาณการได้รับสัมผัสไนไตรต์และไนเตรตจากการบริโภคผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ทั้ง 15 ประเภทพบว่าในกลุ่มประชากรทั้งหมด เมื่อรับประทานผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์เหล่านี้ ความเสี่ยงที่จะได้รับสารดังกล่าวอยู่ในระดับต่ำ ถือว่ามีความปลอดภัย หากพิจารณาในผลิตภัณฑ์แต่ละประเภทไส้กรอกหมูและไส้กรอกไก่มีความเสี่ยงต่อการได้รับไนไตรต์สูงเมื่อเทียบกับผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ทั้งหมด หากบริโภคผลิตภัณฑ์ประเภทนี้เป็นประจำมีโอกาสเสี่ยงสูงที่จะได้รับไนไตรต์โดยเฉพาะเด็กซึ่งส่วนใหญ่ชอบรับประทานผลิตภัณฑ์ไส้กรอกที่ซื้อจากร้านค้าบริเวณหน้าโรงเรียนหรือในโรงเรียนอาจทำให้ได้รับไนไตรต์มากกว่าผู้ใหญ่ ดังนั้นในกลุ่มเด็กควรมีการเฝ้าระวังเป็นพิเศษ ผู้ปกครองควรให้ความใส่ใจในการเลือกรับประทานอาหาร ส่วนปริมาณการได้รับสัมผัสไนเตรตที่ 97.5 เปอร์เซ็นต์ไทล์ (worst case) มีค่า MOS ต่ำกว่า 1 ซึ่งอยู่ในระดับไม่เกินค่า ADI สอดคล้องกับการศึกษาโดย เวณิกา เบ็ญจพงษ์ และคณะ⁽³⁾ ประเมินการได้รับไนเตรตจากการบริโภคไส้กรอกไก่ ไส้กรอกหมู กุนเชียงหมู หมูยอ และแฮมหมู โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป @RISK[®] ในประชากรทั้งหมด พบว่ามีความเสี่ยงในระดับต่ำกว่าค่า ADI ทั้งที่ระดับเฉลี่ย และที่ 97.5 เปอร์เซ็นต์ไทล์ อย่างไรก็ตามแม้ว่าปริมาณการได้รับสัมผัสไนเตรตจากการบริโภคอยู่ในเกณฑ์ปลอดภัย แต่ไนเตรตเป็นสารซึ่งไม่อนุญาตให้ใช้กับผลิตภัณฑ์กลุ่มเนื้อสัตว์ และสามารถถูกเปลี่ยนเป็นไนไตรต์ได้โดยแบคทีเรียในปากและกระเพาะอาหาร นอกจากนี้การได้รับไนไตรต์หรือไนเตรตอาจมาจากแหล่งอื่นได้ เช่น ผักที่ปลูกโดยใช้ปุ๋ยเคมีสูตรที่มีธาตุไนโตรเจนสูง เช่น แอมโมเนียไนเตรต และยูเรีย จะถูกเปลี่ยนเป็นไนเตรต ทำให้มีการตกค้างปริมาณสูงในผัก^(15,16) การได้รับไนเตรตสะสมเป็นเวลานานๆ อาจเกิดอันตรายได้ อีกทั้งการปรุงประกอบอาหารโดยใช้ความร้อนสูงมาก เช่น ปิ้ง ย่าง จะทำให้ไนไตรต์เกิดการเปลี่ยนแปลงรวมกับเอมีนในเนื้อสัตว์โดยมีค่า pH ในสภาวะที่เป็นด่าง เกิดเป็นสารประกอบไนโตรซามีนซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง⁽¹⁷⁾

การประเมินการได้รับสัมผัสไนไตรต์และไนเตรตจากการบริโภคผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์นี้ เป็นการประเมินจากตัวอย่างที่ส่งตรวจโดยหน่วยงานราชการ (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา สำนักงานสาธารณสุขจังหวัด) และเอกชนเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผลิตมาจากหลายๆ แหล่ง แม้ว่าตัวอย่างยังไม่ครอบคลุมทั่วประเทศ แต่หน่วยงานที่เกี่ยวข้อง เช่น สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา สามารถนำข้อมูลนี้ใช้เป็นแนวทางประกอบการพิจารณาปรับแก้มาตรฐานให้เหมาะสมและปลอดภัย และสามารถใช้เป็นข้อมูลในการสื่อสารและแจ้งเตือนภัยให้กับประชาชน

สรุป

ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ส่วนมากมีการใช้ในเตรต ซึ่งเป็นสารห้ามใช้ ส่วนการใช้ไนไตรต์ ถึงแม้ว่าจะพบตัวอย่างที่เกินหรือผิดมาตรฐานจำนวนน้อย แต่อาจมีผลกระทบต่อสุขภาพ โดยเฉพาะกลุ่มที่นิยมบริโภค มีปริมาณการได้รับสัมผัสเกินค่าความปลอดภัยเมื่อเปรียบเทียบกับค่า ADI ดังนั้นเพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภค ผู้ผลิตควรใช้ตามความจำเป็น และต้องไม่เกินปริมาณที่กฎหมายกำหนด ซึ่งปัจจุบันได้มีประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 418) พ.ศ. 2563 เรื่อง กำหนดหลักเกณฑ์เงื่อนไข วิธีการใช้และอัตราส่วนของวัตถุเจือปนอาหาร ซึ่งอนุญาตให้ใช้ในเตรตในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บางประเภท ดังนั้นผู้ประกอบการควรมีการติดตามข้อกำหนดของทางราชการอย่างสม่ำเสมอ สำนักงานคณะกรรมการ

อาหารและยา และสำนักงานสาธารณสุขจังหวัด ควรมีการเฝ้าระวังโดยการสุ่มตรวจผลิตภัณฑ์ต่างๆ อย่างต่อเนื่อง มีการบังคับใช้กฎหมายอย่างเข้มงวด จะช่วยให้ประชาชนบริโภคผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่ปลอดภัย ผู้บริโภคควรรู้จักป้องกันหรือเลือกรับประทานอาหารให้หลากหลาย และรับประทานแต่พอดี จะสามารถช่วยลดความเสี่ยงต่อสุขภาพได้อีกทางหนึ่ง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นางอุมา บริบูรณ์ นักวิทยาศาสตร์การแพทย์เชี่ยวชาญ และนางสาวพนาวลัย กลิ่งกลางดอน สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ที่ให้คำปรึกษา แนะนำในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการวัตถุเจือปนอาหารทุกท่าน ที่มีส่วนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Siddiqui MR, Wabaidur SM, ALOthman ZA, Rafiquee MZA. Rapid and sensitive method for analysis of nitrate in meat samples using ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Spectrochimica Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2015; 151: 861-6.
2. Cammack R, Joannou CL, Cui XY, Torres Martinez C, Maraj SR, Hughes MN. Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411: 475-88.
3. เวนิกา เบ็ญจพงษ์, วีรยา การพานิช, จิรรัตน์ เทศศิลป์, จุติมา ลิขิตรัตน์พร, ปิยนุช วิเศษชาติ, นริศรา ม่วงศรีจันทร์ และคณะ. การประเมินการได้รับไนเตรตและไนไตรต์จากการบริโภคเนื้อสัตว์แปรรูปของประชากรไทย. *วารสารวิจัย มช.* 2554; 16(8): 931-41.
4. European Food Safety Authority. Re-evaluation of sodium nitrate (E251) and potassium nitrate (E 252) as food additives. *EFSA J* [online]. 2017; [cited 2019 July 1]; 15(6): [123 screens]. Available from: URL: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2017.4787>.
5. Agency classified by the IARC monographs, volumes 1-123. [online]. 2018; [cited 2019 Oct 10]; [37 screens]. Available from: URL: <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/09/ClassificationsAlphaOrder.pdf>.
6. The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Nitrate. [online]. 2002; [cited 2019 Aug 31]. Available from: URL: http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecval/jec_1701.htm.
7. The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Nitrite. [online]. 2002 [cited 2019 Aug 31]. Available from: URL: http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecval/jec_1702.htm.
8. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เลขที่ 389 (พ.ศ. 2561) เรื่องวัตถุเจือปนอาหาร (ฉบับที่ 5). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 135 ตอนพิเศษ 178 ง (วันที่ 25 กรกฎาคม 2561).
9. สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. ข้อมูลการบริโภคอาหารของประเทศไทย. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย; 2559.
10. Food and Agriculture Organization of the United Nations Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food. Geneva: World Health Organization; 2009.

11. พนาวัลย์ กลิ่งกลางดอน, ลัดดาวัลย์ โรจนพรหมทิพย์, กรรณิกา จิตติยศรา, นนทรรัตน์ พรทรัพย์มณี, ปิ่นนรี ชินวรรณรงค์, เขมิกา เหมโลหะ. การประเมินความเสี่ยงแคดเมียมจากการบริโภคประจำวันของคนไทย. ว.กรมวิทย์ พ 2560; 59(3): 181-98.
12. BS EN 12014-4:2005. Foodstuffs – Determination of nitrate and/or nitrite content – Part 4: ion-exchange chromatographic (IC) method for the determination of nitrate and nitrite content of meat products. United Kingdom: British Standards Institution; 2005.
13. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 381 (พ.ศ. 2559) เรื่อง วัตถุเจือปนอาหาร (ฉบับที่ 4). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 133 ตอนพิเศษ 298 ง (วันที่ 20 ธันวาคม 2559).
14. ประกาศสำนักคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง ข้อกำหนดการใช้วัตถุเจือปนอาหาร. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 122 ตอนพิเศษ 9 ง (วันที่ 31 มกราคม 2548).
15. วรณวรารักษ์ พัฒนะโพธิ์, ศุภลักษณ์ ชิตวรกุล, วลัยพร มูลพุ่มสาย, ศิโรรัตน์ เขียนแมน, ธนะชัย พันธุ์เกษมสุข. การประเมินความเสี่ยงของปริมาณไนเตรดตกค้างในผักไฮโดรโปนิกส์. ว.วิทยาศาสตร์เกษตร 2558; 46 (พิเศษ 3/1): 331-4.
16. Hongsisong S, Polyiem W, Narksen W, Kerdnoi T, Prapamontol T. Determination of nitrate in the edible part of vegetables from markets around Chiang Mai city, Northern Thailand by using high performance liquid chromatography. Asian J Agric Res 2014; 8(4): 204-10.
17. สำนักหอสมุดและศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กรมวิทยาศาสตร์บริการ. ประมวลสารสนเทศพร้อมใช้ เรื่อง อันตรายจากสารไนโตรซามีน. [ออนไลน์]. 2553; [สืบค้น 31 ส.ค. 2562]; [18 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: <http://siweb.dss.go.th/repack/fulltext/IR23.pdf>.

Exposure Assessment of Nitrite and Nitrate from the Meat Products Consumption

Kittima Sonamit and Ekkasit Dechanuwat

*Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road,
Nonthaburi 11000, Thailand*

ABSTRACT Nitrite and nitrate are food additives used as preservative and color fixative agent to prevent offensive odor in meat products. However, these chemicals can exhibit adverse effects on human health if a person is exposed to their high levels. The notification of the Ministry of Public Health (No.389) B.E. 2561 (2018) has permitted the residues of nitrite in meat products not more than 80 mg/kg; and the use of nitrate has not been permitted. This study aimed to assess the updated exposures of nitrite and nitrate from the consumption of processed meat products, in order to understand the situation of the residues of nitrite and nitrate, and the risk from intake of these chemicals. In this study, 1,231 samples from 15 types of meat products were analyzed during the fiscal years 2016–2018. The percentages of samples with residues of nitrite that did not comply with the legal regulation were found in chicken sausage, pork sausage, fermented pork, crispy pork, jerky meat, Moo yor and meat ball at 1.6, 3.4, 5.7, 11.1, 40.0, 1.4 and 1.3% respectively. In addition, nitrate was found in all products, except meat ball. The exposure assessment of nitrite and nitrate from the meat products consumption at lower, middle and upper bound of all population groups and eater only groups from the national consumption survey demonstrated that the exposures of nitrate were safe. However, the eater only groups were found to be exposed to nitrite higher than the margin of safety (MOS), implying that it might pose health risks to consumers. Therefore, the producers should limit the use to ensure the safety of consumers. Moreover, the responsible government agencies shall have surveillance by continuously sampling the meat products and strictly enforcing the law.

Keywords: Exposure assessment, Nitrite, Nitrate, Meat products, Margin of safety

การสำรวจวัดค่าความเข้มสนามแม่เหล็กไฟฟ้า จากสถานีฐานระบบโทรศัพท์เคลื่อนที่ ในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล

อรินญา พงศธรพิศุทธิ์ และอภิชนันท์ คงชนะ

สำนักวิจัยและเครื่องมือแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ สำนักวิจัยและเครื่องมือแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้รับเรื่องร้องเรียนจากประชาชนเกี่ยวกับข้อวิตกกังวลเรื่องผลกระทบต่อสุขภาพจากสนามแม่เหล็กไฟฟ้าของสถานีฐานระบบโทรศัพท์เคลื่อนที่ ซึ่งในปัจจุบันมีการใช้เทคโนโลยี 4G ที่ต้องติดตั้งสถานีฐานระบบโทรศัพท์เคลื่อนที่เพิ่มมากขึ้น ดังนั้นเพื่อคลายความกังวลจากการสัมผัสสนามแม่เหล็กไฟฟ้าจากสถานีฐานระบบโทรศัพท์เคลื่อนที่ของประชาชน ทีมผู้วิจัยจึงได้ทำการสำรวจวัดค่าความเข้มสนามแม่เหล็กไฟฟ้าจากสถานีฐานระบบโทรศัพท์เคลื่อนที่ 1,656 สถานี ในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล ในปีงบประมาณ 2562 เพื่อให้ทราบว่าค่าความเข้มสนามแม่เหล็กไฟฟ้าจากสถานีฐานระบบโทรศัพท์เคลื่อนที่มีค่าเกินจากค่ามาตรฐานสากลกำหนดหรือไม่ และส่งผลอันตรายเพียงใด โดยการประเมินค่าความเข้มสนามแม่เหล็กไฟฟ้า ใช้การเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานการสัมผัสสนามแม่เหล็กไฟฟ้าของประชาชนทั่วไปตามมาตรฐานสากล (ICNIRP) พบว่าค่าความเข้มสนามแม่เหล็กไฟฟ้าในเขตกรุงเทพมหานคร 50 เขต และอำเภอเมืองในเขตปริมณฑล 5 จังหวัด มีค่าต่ำกว่าค่ามาตรฐานสากลอย่างมาก โดยเขตปทุมวันมีค่าความเข้มสนามแม่เหล็กไฟฟ้าสูงที่สุดประมาณ 0.005741 W/m^2 รองลงมา ได้แก่ เขตบางนา มีค่าประมาณ 0.004590 W/m^2 สำหรับปริมณฑล อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรปราการ มีค่าความเข้มสนามแม่เหล็กไฟฟ้าสูงที่สุดประมาณ 0.002723 W/m^2 รองลงมา ได้แก่ อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสาคร มีค่าประมาณ 0.001533 W/m^2 และค่าดังกล่าวต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานเป็นพันเท่า แสดงว่าคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มาจากสถานีฐานระบบโทรศัพท์เคลื่อนที่มีค่าต่ำมาก นั่นคือคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าจากสถานีฐานระบบโทรศัพท์เคลื่อนที่ที่ตรวจวัดมีความเสี่ยงหรือผลกระทบต่อประชาชนค่อนข้างต่ำ

คำสำคัญ: สนามแม่เหล็กไฟฟ้า, สถานีฐานระบบโทรศัพท์เคลื่อนที่, กรุงเทพมหานครและปริมณฑล

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

Received: 12 November 2019

Revised: 9 October 2020

Accepted: 7 January 2021

บทนำ

สำนักวิจัยและเครื่องมือแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้รับเรื่องร้องเรียนจากประชาชนเกี่ยวกับข้อวิตกกังวลเรื่องผลกระทบต่อสุขภาพจากสนามแม่เหล็กไฟฟ้าของสถานีฐานระบบโทรศัพท์เคลื่อนที่ ซึ่งในปัจจุบันมีการใช้เทคโนโลยี 4G ที่ต้องติดตั้งสถานีฐานระบบโทรศัพท์เคลื่อนที่เพิ่มมากขึ้นโดยเฉพาะในเมือง เป็นเหตุให้มีจำนวนสถานีฐานระบบโทรศัพท์เคลื่อนที่เพิ่มมากขึ้นตามความต้องการใช้งานที่เพิ่มขึ้น จึงมักได้รับเรื่องร้องเรียนดังกล่าวเพิ่มมากขึ้น ซึ่งอาจเกิดจากการที่ผู้ร้องเรียนได้อ่านบทความในสื่อต่างๆ ที่กล่าวถึงอันตรายจากสนามแม่เหล็กไฟฟ้า เช่น บางบทความชี้ให้เห็นว่าสนามแม่เหล็กไฟฟ้าอาจก่อให้เกิดมะเร็งหรือการกลายพันธุ์^(1, 2) ในขณะที่บางบทความกล่าวว่าสนามแม่เหล็กไฟฟ้าหรือคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าก่อให้เกิดอาการที่ไม่เจาะจงหลายชนิด (Non-Specific Health Symptoms: NSHS) เช่น ความจำเสื่อม ปวดศีรษะ วิงเวียน เป็นต้น⁽³⁾

หน่วยงานสากล International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection (ICNIRP)⁽⁴⁾ ได้ศึกษาผลกระทบที่เกิดจากสนามแม่เหล็กไฟฟ้าชนิดที่ไม่ก่อให้เกิดการแตกตัวเป็นประจุไฟฟ้าของอะตอม (Non-Ionizing) โดยกำหนดค่าการสัมผัสสนามแม่เหล็กไฟฟ้าเพื่อป้องกันความเสี่ยงจากการสัมผัสสนามแม่เหล็กไฟฟ้าที่จะส่งผลกระทบต่อประชาชนทั่วไป ซึ่งในประเทศไทยก็ได้ใช้ข้อกำหนดของ ICNIRP ในการเฝ้าระวังและตรวจวัดค่าความเข้มสนามแม่เหล็กไฟฟ้า หากการตรวจวัดค่าความเข้มสนามแม่เหล็กไฟฟ้าไม่เกินจากค่าที่ ICNIRP กำหนด ถือว่ามีความปลอดภัย

ในปี พ.ศ. 2548 สำนักวิจัยและเครื่องมือแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้ร่วมกับหน่วยงานสาธารณสุขของประเทศแคนาดา (Health Canada) เพื่อศึกษาสำรวจความเข้มสนามแม่เหล็กไฟฟ้าจากสถานีฐานระบบโทรศัพท์เคลื่อนที่ในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล พบว่าค่าความเข้มสนามแม่เหล็กไฟฟ้าต่ำกว่าค่ามาตรฐานของ ICNIRP เป็นพันเท่า⁽⁵⁾ และยังมีหน่วยงานหลายหน่วยงานที่ได้สำรวจตรวจวัดความเข้มสนามแม่เหล็กไฟฟ้า ได้แก่ สำนักงานกิจการกระจายเสียง กิจการโทรทัศน์ และกิจการโทรคมนาคมแห่งชาติ (กสทช.) ที่ได้ทำการสำรวจในเขตพื้นที่ภาคกลาง 22 จังหวัด จำนวน 232 สถานี ในปี พ.ศ. 2556⁽⁶⁾

ในปัจจุบันนี้ ค่าความถี่ของสนามแม่เหล็กไฟฟ้าหรือคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าจากสถานีฐานระบบโทรศัพท์เคลื่อนที่ และจากโทรศัพท์เคลื่อนที่ที่มีค่าความถี่ที่สูงกว่าในอดีต (ในปี พ.ศ. 2548 ที่ได้ทำการสำรวจ)⁽⁵⁾ ดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2 ดังนั้น เพื่อคลายความกังวลจากการสัมผัสสนามแม่เหล็กไฟฟ้าจากสถานีฐานระบบโทรศัพท์เคลื่อนที่ของประชาชน ทีมผู้วิจัยจึงได้ทำการสำรวจวัดค่าความเข้มสนามแม่เหล็กไฟฟ้าจากสถานีฐานระบบโทรศัพท์เคลื่อนที่ตามมาตรฐานสถาบัน Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE)⁽⁷⁾ ในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล ในปีงบประมาณ 2562 เพื่อให้ทราบว่าค่าความเข้มสนามแม่เหล็กไฟฟ้าจากสถานีฐานระบบโทรศัพท์เคลื่อนที่มีค่าเกินจากค่ามาตรฐานสากลกำหนดหรือไม่ และส่งผลอันตรายมากน้อยเพียงใด

ตารางที่ 1 ความถี่คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าจากสถานีฐานระบบโทรศัพท์เคลื่อนที่และจากโทรศัพท์เคลื่อนที่ในปี พ.ศ. 2548

System	Uplink (MHz)	Downlink (MHz)
AIS	897.5-905.0	942.5-950.0
Orange	1710.0-1722.16	1805.0-1817.6
GSM-1800	1747.9-1760.5	1842.9-1855.5
DTAC	1722.6-1747.9	1817.6-1842.9
	1760.5-1785.0	1855.5-1880.0
Thai Mobile	1885.0-1900.0	1965.0-1980.0
	1965.0-1980.0	2155.0-2170.0
CDMA	824-835	869-880
	845-846.5	890-891.5

AIS = Advance Info Service

Orange = Name of the Mobile Phone Company

GSM-1800 = Global System for Mobile

DTAC = Total Access Communication

CDMA = Code Division Multiple Access

ตารางที่ 2 ความถี่คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าจากสถานีฐานระบบโทรศัพท์เคลื่อนที่และจากโทรศัพท์เคลื่อนที่ในปี พ.ศ. 2562

System	Uplink	Downlink
Police	814-819 MHz	859-864 MHz
RealMove	-	869-884 MHz
DTAC	839-849 MHz	884-894 MHz
	895-905 MHz	940-950 MHz
AWN	1950-1965 MHz	1820-1840 MHz
	-	2140-2155 MHz
DTN	1745-1750 MHz	1840-1845 MHz
	1920-1935 MHz	2110-2125 MHz
	905-915 MHz	950-960 MHz
TUC	1935-1950 MHz	1805-1820 MHz
	-	2125-2140 MHz
TOT	1965-1980 MHz	2155-2170 MHz
TOT (TDD)	2310-2370 MHz	-

Real move = บริษัท เรียลมูฟ จำกัด

DTAC = บริษัท โทเทิล แอ็คเซ็ส คอมมูนิเคชั่น จำกัด (มหาชน)

AWN = บริษัท แอดวานซ์ ไวร์เลส เน็ทเวอร์ค จำกัด

DTN = ดีแทค ไตร เน็ต จำกัด

TUC = บริษัท ทูรูฟเอช ยูนิเวอร์แซล คอมมิวนิเคชั่น จำกัด

TOT = บริษัท ทีโอที จำกัด (มหาชน)

TDD = Time Division Duplex (ระบบจัดสรรการใช้ช่องสัญญาณตามช่วงเวลา)

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือและกลุ่มเป้าหมาย

1. สถานีฐานระบบโทรศัพท์เคลื่อนที่จำนวน 1,656 สถานี ในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล 5 จังหวัด เฉพาะในเขตอำเภอเมือง (โดยมีระยะการวัด 50-500 เมตร ในแต่ละสถานีฐาน)
2. เครื่องวัดค่าความเข้มสนามแม่เหล็กไฟฟ้า ยี่ห้อ Narda รุ่น SRM-3006 หมายเลขเครื่อง P-0345 ใช้หัววัด 3 แกน (Three-Axis) ขนาดความถี่ 27 MHz-3 GHz หมายเลขหัววัด M-0519

วิธีการ

ดำเนินการสำรวจวัดค่าความเข้มสนามแม่เหล็กไฟฟ้าจากสถานีฐานของระบบโทรศัพท์เคลื่อนที่ในเขตกรุงเทพมหานครจำนวน 50 เขต โดยสำรวจสถานีฐานของระบบโทรศัพท์เคลื่อนที่เขตละอย่างน้อย 20 สถานี รวมประมาณ 1,000 สถานี และสำรวจสถานีฐานของระบบโทรศัพท์เคลื่อนที่ในเขตอำเภอเมือง จังหวัดปริมณฑล จำนวน 5 จังหวัด จังหวัดละอย่างน้อย 20 สถานี รวม 100 สถานี แล้วนำค่าที่วัดได้มาประเมินผลเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานสากล ICNIRP ในแต่ละความถี่ของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่วัดได้ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 วิธีได้มาของค่ามาตรฐานสากล ICNIRP ในแต่ละความถี่คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า

ความถี่คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (MHz)	ค่ามาตรฐาน (W/m ²)	วิธีการคำนวณจาก ICNIRP
850	4.25	$f/200 = 850/200 = 4.25$
900	4.50	$f/200 = 900/200 = 4.50$
950	4.75	$f/200 = 950/200 = 4.75$
1800	9.00	$f/200 = 1800/200 = 9.00$
2100	10.00	10

เมื่อ f คือ ความถี่คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า

ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. ศึกษาเอกสารอ้างอิง เอกสารการสำรวจวัดค่าความเข้มสนามแม่เหล็กไฟฟ้าในปี พ.ศ. 2548 และมาตรฐานสากล
2. วางแผนการวัดค่าความเข้มสนามแม่เหล็กไฟฟ้าในเขตกรุงเทพมหานคร 50 เขต และปริมณฑล 5 จังหวัด โดยทำการวัดค่าในรัศมี 50-500 เมตรต่อสถานีฐานระบบโทรศัพท์เคลื่อนที่
3. สำรวจวัดค่าความเข้มสนามแม่เหล็กไฟฟ้าของสถานีฐานระบบโทรศัพท์เคลื่อนที่ตามแผนงาน
4. วิเคราะห์และประเมินผลค่าความเข้มสนามไฟฟ้าจากสถานีฐานระบบโทรศัพท์เคลื่อนที่ที่วัดได้
5. วิจัยและสรุปผล

ผล

ค่าความเข้มสนามแม่เหล็กไฟฟ้าที่วัดได้ในเขตกรุงเทพมหานครจำนวน 50 เขต และปริมาณ 5 จังหวัด เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานสากล ซึ่งแสดงค่าสูงสุดที่ตรวจวัดได้ในแต่ละเขต ดังแสดงในตารางที่ 4 และจังหวัด ในปริมาณ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 4 ค่าความเข้มสนามแม่เหล็กไฟฟ้าที่วัดได้ในเขตกรุงเทพมหานครจำนวน 50 เขต เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานสากล

ลำดับ	เขต	ค่าสูงสุดที่วัดได้ (W/m^2)	ความถี่ (MHz)	เครือข่าย (DL)	วันที่ตรวจวัด	จำนวนสถานีฐาน (สถานี)	ค่ามาตรฐาน (W/m^2)	เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน (ได้ต่ำกว่าจำนวนเท่า)
1	บางนา	0.004590	1805-1820	TUC	13/6/2562	34	9.00	1960.78
2	หลักสี่	0.000733	940-950	AWN	1/4/2562	12	4.75	6479.33
3	บางพลัด	0.002877	1820-1840	AWN	4-5/4/2562	32	9.00	3128.26
4	บางซื่อ	0.001408	1820-1840	AWN	4/4/2562	34	9.00	6392.05
5	บางกอกน้อย	0.001487	2110-2125	DTN	5,9/4/2562	17	10.00	6724.95
6	บางเขน	0.001198	1805-1820	TUC	6/4/2562	29	9.00	7512.52
7	สายไหม	0.000994	1805-1820	TUC	7/4/2562	44	9.00	9056.15
8	หนองจอก	0.000393	1820-1840	AWN	8/4/2562	41	9.00	22906.59
9	ห้วยขวาง	0.001263	1805-1820	TUC	15-16/4/2562	32	9.00	7125.89
10	พญาไท	0.000527	1820-1840	AWN	15,10/4/2562	20	9.00	17081.04
11	ดินแดง	0.002018	2125-2140	TUC	15/4/2562, 10/5/2562	24	10.00	4955.40
12	จตุจักร	0.000451	2110-2125	DTN	6,15/4/2562	20	10.00	22172.95
13	วังทองหลาง	0.000340	1805-1820	TUC	16/4/2562	13	9.00	26439.48
14	ตลิ่งชัน	0.000518	1805-1820	TUC	20/4/2562	14	9.00	17367.81
15	ทวีวัฒนา	0.000776	1820-1840	AWN	20/4/2562	21	9.00	11594.95
16	ดอนเมือง	0.000354	1805-1820	TUC	30/4/2562	33	9.00	25438.10
17	บางแค	0.001086	1820-1840	AWN	14/5/2562	31	9.00	8287.29
18	หนองแขม	0.000463	2110-2125	DTN	14/5/2562	28	10.00	21616.95
19	บางกอกใหญ่	0.000873	1805-1820	TUC	15/5/2562	15	9.00	10314.00
20	ภาษีเจริญ	0.001023	2140-2155	AWN	16/5/2562	24	10.00	9775.17
21	บางบอน	0.002268	884-894	DTAC	16/5/2562	54	4.50	1984.13
22	มีนบุรี	0.000732	1820-1840	AWN	17/5/2562	44	9.00	12298.44
23	คลองสาน	0.001521	2125-2140	TUC	6/4/2562	23	9.00	6574.62
24	สัมพันธวงศ์	0.003027	2125-2140	TUC	4/6/2562	14	9.00	3303.60
25	ลาดกระบัง	0.001379	1805-1820	TUC	5/6/2562	24	9.00	6526.47

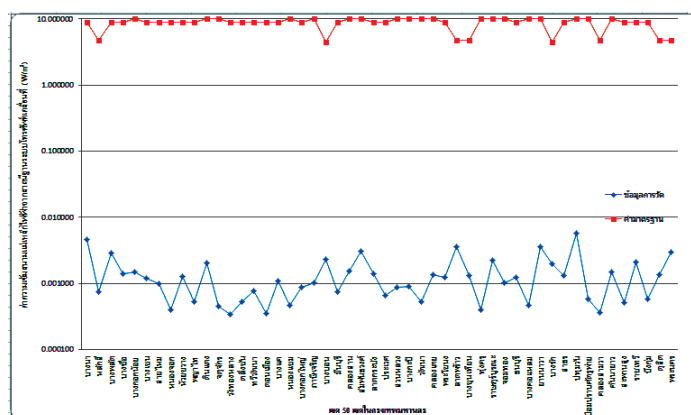
ตารางที่ 4 ค่าความเข้มสนามแม่เหล็กไฟฟ้าที่วัดได้ในเขตกรุงเทพมหานครจำนวน 50 เขต เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานสากล (ต่อ)

ลำดับ	เขต	ค่าสูงสุดที่วัดได้ (W/m^2)	ความถี่ (MHz)	เครือข่าย (DL)	วันที่ตรวจวัด	จำนวนสถานีฐาน (สถานี)	ค่ามาตรฐาน (W/m^2)	เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน (ได้ต่ำกว่าจำนวนเท่า)
26	ประเวศ	0.000653	1820-1840	AWN	6/6/2562	43	9.00	13793.10
27	สวนหลวง	0.000868	2135-2140	TUC	6/7/2562	37	10.00	11516.76
28	บางกะปิ	0.000896	2110-2125	DTN	6/7/2562	40	10.00	11165.70
29	วัฒนา	0.000520	2110-2125	DTN	6/10/2562	30	10.00	19241.87
30	คลองเตย	0.001339	2125-2140	TUC	6/10/2562	35	10.00	7468.26
31	พระโขนง	0.001243	1805-1820	TUC	6/12/2562	24	9.00	7240.55
32	ลาดพร้าว	0.003546	950-960	TUC	6/4,7/5/2562	27	4.50	1339.54
33	บางขุนเทียน	0.001301	950-960	TUC	14/6/2562	51	4.75	3651.04
34	ทุ่งครุ	0.000398	2155-2170	TOT	17/6/2562	26	10.00	25144.58
35	ราษฎร์บูรณะ	0.002243	2125-2140	TUC	17/6/2562	26	10.00	4458.31
36	จอมทอง	0.001029	2125-2140	TUC	18/6/2562	37	10.00	9718.17
37	ธนบุรี	0.001218	1805-1820	TUC	18/6/2562	23	9.00	7389.16
38	บางคอแหลม	0.000461	2140-2155	AWN	19/6/2562	23	10.00	21706.10
39	ยานนาวา	0.003517	2110-2125	DTN	19/6/2562	32	10.00	2843.33
40	บางรัก	0.001953	869-884	realmove	20/6/2562	26	4.40	2252.94
41	สาทร	0.001291	1820-1840	AWN	20/6/2562	20	9.00	6971.34
42	ปทุมวัน	0.005741	2125-2140	TUC	4/6//2562	29	10.00	1741.86
43	ป้อมปราบศัตรูพ่าย	0.000587	2125-2140	TUC	4,21/6/2562	21	9.00	17050.30
44	คลองสามวา	0.000356	940-950	AWN	30/5/2562	32	4.75	13353.95
45	คันนายาว	0.001485	2125-2140	TUC	30-31/5/2562	31	4.50	6734.01
46	สะพานสูง	0.000516	1820-1840	AWN	31/5/2562	35	9.00	17458.78
47	ราชเทวี	0.002112	1820-1840	AWN	5/10/2562	15	9.00	4261.36
48	บึงกุ่ม	0.000574	1820-1840	AWN	5/7/2562	20	9.00	15668.52
49	ดุสิต	0.001349	940-950	AWN	13/5/2562	22	4.75	3521.13
50	พระนคร	0.002932	950-960	TUC	13/5/2562	21	4.75	1620.05

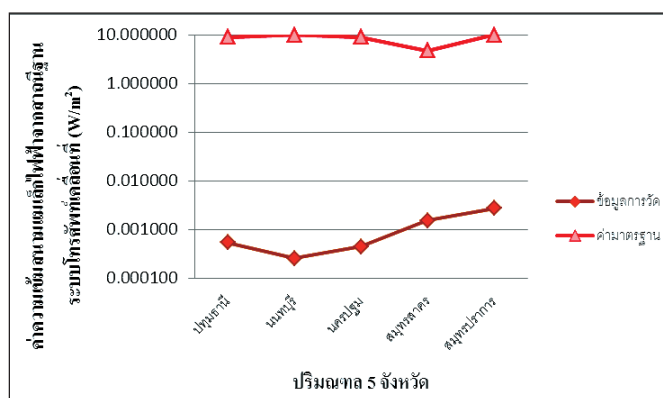
ตารางที่ 5 ค่าความเข้มสนามแม่เหล็กไฟฟ้าที่วัดได้ในอำเภอเมือง เขตปริมณฑล 5 จังหวัด เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานสากล

ลำดับ	เขต	ค่าสูงสุดที่วัดได้ (W/m^2)	ความถี่ (MHz)	เครือข่าย (DL)	วันที่ตรวจวัด	จำนวนสถานีฐาน (สถานี)	ค่ามาตรฐาน (W/m^2)	เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน (ได้ต่ำกว่าจำนวนเท่า)
1	ปทุมธานี	0.000538	1805-1820	TUC	26/3/2562	43	9.00	16722.41
2	นนทบุรี	0.000255	2140-2155	AWN	27/3/2562	51	10.00	39169.60
3	นครปฐม	0.000447	1820-1840	AWN	21/5/2562	38	9.00	20147.75
4	สมุทรสาคร	0.001533	950-960	TUC	22/5/2562	47	4.75	3098.50
5	สมุทรปราการ	0.002723	2125-2140	TUC	24/6/2562	74	10.00	3672.42

สามารถวาดกราฟค่าความเข้มสนามแม่เหล็กไฟฟ้าที่วัดได้ในเขตกรุงเทพมหานคร 50 เขต เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานสากล ดังแสดงในภาพที่ 1 และวาดกราฟค่าความเข้มสนามแม่เหล็กไฟฟ้าที่วัดได้ในเขตปริมณฑล 5 จังหวัด เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานสากล ดังแสดงในภาพที่ 2 พบว่ากราฟที่ได้ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานสากลมาก อย่างเห็นได้ชัดเจน



ภาพที่ 1 กราฟแสดงค่าความเข้มสนามแม่เหล็กไฟฟ้าที่วัดได้ในเขตกรุงเทพมหานคร 50 เขต เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานสากล ในรัศมีการวัดไม่เกิน 500 เมตรต่อสถานีฐานระบบโทรศัพท์เคลื่อนที่



ภาพที่ 2 กราฟแสดงค่าความเข้มสนามแม่เหล็กไฟฟ้าที่วัดได้ในเขตปริมณฑล 5 จังหวัด เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานสากล ในรัศมีการวัดไม่เกิน 500 เมตรต่อสถานีฐานระบบโทรศัพท์เคลื่อนที่

วิจารณ์

การวัดค่าความเข้มสนามแม่เหล็กไฟฟ้าจากสถานีฐานระบบโทรศัพท์เคลื่อนที่ เลือกวัดในช่วงระยะ 50–500 เมตร เพราะในการวัดความเข้มสนามแม่เหล็กไฟฟ้าดังกล่าวเป็นการวัดคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าประเภทห่างจากแหล่งกำเนิดที่เรียกว่า “บริเวณสนามไกล หรือ far-field region”⁽⁸⁾ และค่าที่วัดได้มีปริมาณค่อนข้างต่ำ ทำให้การวัดในช่วงระยะ 50–500 เมตร ไม่มีความแตกต่างของระดับความเข้มสนามแม่เหล็กไฟฟ้าตามเอกสารเผยแพร่ของสำนักงานคณะกรรมการการกระจายเสียง กิจการโทรทัศน์และกิจการโทรคมนาคมแห่งชาติ (กสทช.) ที่แสดงการวัดค่าในช่วงระยะ 50–500 เมตร จะได้ค่าระดับความแรงหรือความเข้มสนามแม่เหล็กไฟฟ้าใกล้เคียงกัน⁽⁸⁾

การประเมินค่าความเข้มสนามแม่เหล็กไฟฟ้า ใช้การเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานการสัมผัสสนามแม่เหล็กไฟฟ้าของประชาชนทั่วไป ตามมาตรฐาน ICNIRP ดังแสดงในภาพที่ 3

Frequency range	E-field strength (V m ⁻¹)	H-field strength (A m ⁻¹)	B-field (μT)	Equivalent plane wave power density S_{eq} (W m ⁻²)
up to 1 Hz	—	3.2×10^4	4×10^4	—
1–8 Hz	10,000	$3.2 \times 10^4 f^{1/2}$	$4 \times 10^4 f^{1/2}$	—
8–25 Hz	10,000	$4,000/f$	$5,000/f$	—
0.025–0.8 kHz	$250/f$	$4/f$	$5/f$	—
0.8–3 kHz	$250/f$	5	6.25	—
3–150 kHz	87	5	6.25	—
0.15–1 MHz	87	$0.73/f$	$0.92/f$	—
1–10 MHz	$87/f^{1/2}$	$0.73/f$	$0.92/f$	—
10–400 MHz	28	0.073	0.092	2
400–2,000 MHz	$1.375 f^{1/2}$	$0.0037 f^{1/2}$	$0.0046 f^{1/2}$	$f/200$
2–300 GHz	61	0.16	0.20	10

^a Note:

1. f as indicated in the frequency range column.
2. Provided that basic restrictions are met and adverse indirect effects can be excluded, field strength values can be exceeded.
3. For frequencies between 100 kHz and 10 GHz, S_{eq} , E^2 , H^2 , and B^2 are to be averaged over any 6-min period.
4. For peak values at frequencies up to 100 kHz see Table 4, note 3.
5. For peak values at frequencies exceeding 100 kHz see Figs. 1 and 2. Between 100 kHz and 10 MHz, peak values for the field strengths are obtained by interpolation from the 1.5-fold peak at 100 kHz to the 32-fold peak at 10 MHz. For frequencies exceeding 10 MHz it is suggested that the peak equivalent plane wave power density, as averaged over the pulse width does not exceed 1,000 times the S_{eq} restrictions, or that the field strength does not exceed 32 times the field strength exposure levels given in the table.
6. For frequencies exceeding 10 GHz, S_{eq} , E^2 , H^2 , and B^2 are to be averaged over any $68/f^{1.05}$ -min period (f in GHz).
7. No E-field value is provided for frequencies <1 Hz, which are effectively static electric fields. perception of surface electric charges will not occur at field strengths less than 25 kV m⁻¹. Spark discharges causing stress or annoyance should be avoided.

ภาพที่ 3 แสดงค่าขีดจำกัดของการสัมผัสสนามแม่เหล็กไฟฟ้าของ ICNIRP

โดยที่ความถี่ 850 MHz จะได้ค่ามาตรฐาน 4.25 W/m² ความถี่ 900 MHz จะได้ค่ามาตรฐาน 4.5 W/m² ความถี่ 950 MHz จะได้ค่ามาตรฐาน 4.75 W/m² และความถี่ 1,800 MHz จะได้ค่ามาตรฐาน 9.0 W/m²

ในการเลือกค่าแสดงจะใช้ค่าความเข้มสนามแม่เหล็กไฟฟ้าสูงสุดที่วัดได้ในแต่ละเขตพื้นที่ตามความถี่ของเครือข่าย (system) ที่ให้ค่าความเข้มสูงสุด และเป็นสัญญาณ downlink ซึ่งเป็นสัญญาณจากสถานีฐานระบบโทรศัพท์เคลื่อนที่⁽⁹⁾ แม้ว่าจะมีเครือข่ายมากมายในการให้บริการในแต่ละพื้นที่ แต่เครื่องมือที่ใช้วัดสามารถแยกรายละเอียดเครือข่ายและช่วงความถี่คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าทำให้ทราบค่าความเข้มสนามแม่เหล็กไฟฟ้าสูงสุดที่วัดได้เป็นของเครือข่ายใดในแต่ละพื้นที่นั้น

การตรวจวัดค่าความเข้มสนามแม่เหล็กไฟฟ้าในเขตกรุงเทพมหานคร พบว่ามีค่าต่ำกว่าค่ามาตรฐานมากที่สุดประมาณ 29,377 เท่า และในเขตปริมณฑลมีค่าต่ำกว่าค่ามาตรฐานมากที่สุดประมาณ 39,170 เท่า แสดงว่ามีความเสี่ยงหรืออันตรายต่อประชาชนค่อนข้างต่ำ จึงควรศึกษาวิจัยทางระบาดวิทยาด้วยระยะเวลาที่ยาวนานจึงจะสามารถยืนยันด้วยข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ได้

สรุป

จากการตรวจวัดค่าความเข้มสนามแม่เหล็กไฟฟ้าในเขตกรุงเทพมหานครทั้ง 50 เขต และในอำเภอเมืองเขตปริมณฑล 5 จังหวัด พบว่ามีค่าต่ำกว่าค่ามาตรฐานสาทลงอย่างมาก โดยในเขตปทุมวันมีค่าความเข้มสนามแม่เหล็กไฟฟ้าสูงสุดประมาณ 0.005741 W/m² รองลงมา ได้แก่ เขตบางนา มีค่าประมาณ 0.004590 W/m² สำหรับปริมณฑล

อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรปราการ มีค่าความเข้มสนามแม่เหล็กไฟฟ้าสูงสุดประมาณ 0.002723 W/m^2 รองลงมา ได้แก่ อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสาคร มีค่าประมาณ 0.001533 W/m^2 แต่ค่าดังกล่าวก็ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานเป็นพันเท่า ซึ่งแสดงว่าคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มาจากสถานีฐานระบบโทรศัพท์เคลื่อนที่มีค่าต่ำมาก การที่มาตรฐานสากลกำหนดเกณฑ์ขึ้นเพื่อไม่ให้ประชาชนได้รับหรือสัมผัสคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มากเกินไปและทำให้เกิดอันตรายต่อร่างกาย หากค่าความเข้มสนามแม่เหล็กไฟฟ้าที่วัดได้เกินเกณฑ์มาตรฐานอาจส่งผลทำให้เกิดความเสี่ยงหรืออันตรายต่อร่างกาย แต่จากงานวิจัยนี้ค่าที่วัดได้นั้นต่ำมาก นั่นคือคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าจากสถานีฐานระบบโทรศัพท์เคลื่อนที่ที่ตรวจวัดมีความเสี่ยงหรือผลกระทบต่อประชาชนค่อนข้างต่ำ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นายศิริ ศรีมนโรธ ผู้อำนวยการสำนักรังสีและเครื่องมือแพทย์ ที่ให้การสนับสนุนในการสำรวจตรวจวัดข้อมูล และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่จากฝ่ายบริหารงานทั่วไป สำนักรังสีและเครื่องมือแพทย์ ได้แก่ คุณจินตภาณี วัฒนพุทธิเลิศ และคุณชาริณี ปานประเสริฐ ที่ช่วยประสานงาน รวมทั้งจัดซื้อวัสดุอุปกรณ์ และขอขอบคุณ คุณศักดิ์พัฒน์ วัชรโรทัย และคุณอุทัยวรรณ ชูแดง ที่ช่วยดำเนินการเก็บข้อมูล

เอกสารอ้างอิง

1. Gómez-Perretta C, Navarro EA, Segura J, Portolés M. Subjective symptoms related to GSM radiation from mobile phone base stations: a cross-sectional study. *BMJ Open* 2013; 3(12): e003836. (9 pages).
2. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Non-ionizing radiation, part 2: radiofrequency electromagnetic fields volume 102. [online]. 2013; [cited 2019 Apr 16]. Available from: URL: <https://monographs.iarc.fr/iarc-monographs-on-the-evaluation-of-carcinogenic-risks-to-humans-14/>.
3. Mild KH, Repacholi M, van Deventer E, Ravazzani P, editors. Electromagnetic hypersensitivity: proceedings, International workshop on EMF hypersensitivity, Prague, Czech Republic, October 25–27, 2004. Geneva: World Health Organization; 2006.
4. International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection: ICNIRP. Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic, and electromagnetic fields (up to 300 GHz). *Health Phys* 1998; 74(4): 494–522.
5. Manatarakul N, Thansandote A, Gajda G, Lemay E, Chancunapas P, McNamee JP. Measurements of ground-level emissions from mobile phone base stations in Bangkok using a low-cost RF field measurement system. *ASEAN J Radiol* 2005; XI(III): 181–8.
6. สำนักงานคณะกรรมการกิจการกระจายเสียง กิจการโทรทัศน์ และกิจการโทรคมนาคมแห่งชาติ (กสทช.). สนามแม่เหล็กไฟฟ้าความถี่วิทยุ และสุขภาพ คำถามที่พบบ่อย. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: บริษัท ศิริชัยการพิมพ์ จำกัด; 2559. หน้า 33.
7. Institute of Electrical and Electronic Engineers (IEEE). IEEE Std C95.3–2002 (R2008) recommended practice for measurements and computations of radio frequency electromagnetic fields with respect to human exposure to such fields, 100 kHz–300 GHz. New York, USA: IEEE; 2003.

8. สำนักงานคณะกรรมการกิจการกระจายเสียง กิจการโทรทัศน์ และกิจการโทรคมนาคมแห่งชาติ (กสทช.). สนามแม่เหล็กไฟฟ้าความถี่วิทยุ และสุขภาพ คำถามที่พบบ่อย. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: บริษัท ศิริชัยการพิมพ์ จำกัด; 2559. หน้า 3, 4 และ 58.
 9. Zeleke BM, Brzozek C, Bhatt CR, Abramson MJ, Croft RJ, Freudenstein F, et al. Personal exposure to radio frequency electromagnetic fields among Australian adults. *Int J Environ Res Public Health* 2018; 15: 2234. (10 pages).
-

Surveying to the Measurement of Electromagnetic Field Intensity from Mobile Phone Base Stations in Bangkok and Perimeter

Arinya Pongsathornpisuth and Apichanan Kongthana

*Bureau of Radiation and Medical Devices, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road,
Nonthaburi 11000, Thailand*

ABSTRACT According to Bureau of Radiation and Medical Devices, Department of Medical Sciences often received complaints about people health concerns from Electromagnetic field of Mobile phone basestation. Mobile phone basestation density must increase follow demand. In the present, 4G technology that requires the installation of more mobile phone basestations. Therefore, to relieve the concern from exposure the electromagnetic field from the mobile phone basestations. The research team therefore conducted a survey to measure the electromagnetic field intensity from the 1,656 mobile phone basestations in Bangkok and in Mueang district of Perimeter in 2019. In order to know whether the magnetic field intensity value from mobile phone basestations is higher than the international standard and how dangerous. By evaluating the electromagnetic field intensity use comparison with the standard values of the electromagnetic field exposure of the general public according to ICNIRP standards. It was found that the electromagnetic field intensity all 50 districts of Bangkok and 5 Mueang district of , were significantly lower than the international standards. The area of Pathumwan has the highest electromagnetic field intensity of about 0.005741 W/m^2 . The second, Bang Na District has the approximate value of 0.004590 W/m^2 . For the metropolitan area Mueang District of Samut Prakan Province has the highest electromagnetic field intensity about 0.002723 W/m^2 . The second area, Mueang District of Samut Sakhon Province with the value of 0.001533 W/m^2 . The value is thousand times below the standard criteria. Which shows that the electromagnetic waves from mobile phone base stations are very low, that is, the electromagnetic waves from the measured mobile phone base stations pose a relatively low risk or impact on people.

Keywords : Electromagnetic field, Mobile phone base station, Bangkok and Perimeter

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและ Related Proteins ในยาฟิลแกรสติม โดยโครมาโตกราฟีเหลวความดันสูงแบบผันกลับ

สุรินทร์ หลานวงศ์ สายรุฬ จตุรจิตตินันท์ และสุภาพร ภูมิอมร

สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ยาฟิลแกรสติมใช้รักษาผู้ป่วยที่มีภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญ ซึ่งปริมาณโปรตีนและ related proteins ในยามีผลต่อประสิทธิภาพของยาและอาจก่ออาการที่ไม่พึงประสงค์ ดังนั้นการตรวจปริมาณโปรตีนและ related proteins ในยาจึงมีความสำคัญ วัตถุประสงค์การศึกษานี้เพื่อทดสอบความถูกต้องของวิธีตรวจปริมาณโปรตีนและ related proteins ที่อยู่ในรูปออกซิไดซ์และรีดิวซ์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีเหลวความดันสูงแบบผันกลับตามวิธีของตำรายาสากลของยุโรป โดยผลการศึกษาพบว่าวิธีมีความจำเพาะต่อการวิเคราะห์ยาฟิลแกรสติม มีความเป็นเส้นตรงระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นของยาในช่วง 0.1 ถึง 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสนใจเท่ากับ 0.9998 ค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของการทำซ้ำในครั้งเดียวกันและต่างครั้งกันเท่ากับ 0.92 และ 0.65 ตามลำดับ มีค่าร้อยละการคืนกลับเท่ากับ 102.45 สามารถตรวจวัดเชิงปริมาณได้ถึง 0.0250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีขีดจำกัดของการตรวจพบยาฟิลแกรสติมที่ 0.0125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และวิธีมีความคงทนเมื่อเปลี่ยนเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ สรุปได้ว่าวิธีที่ศึกษานี้มีความถูกต้องเชื่อถือได้และเหมาะสมนำมาใช้ในการตรวจปริมาณโปรตีนและ related proteins เพื่อควบคุมคุณภาพของยาฟิลแกรสติม

คำสำคัญ : ยาฟิลแกรสติม, ปริมาณโปรตีน, โครมาโตกราฟีเหลวความดันสูงแบบผันกลับ

Corresponding author E-mail: surintra.l@dmsc.mail.go.th

Received: 30 April 2020

Revised: 15 October 2020

Accepted: 7 January 2021

บทนำ

ยาฟิลแกรสตีม (filgrastim) มีชื่อสามัญ คือ granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) เป็นไซโตไคน์ (cytokine) ที่ทำหน้าที่กระตุ้นการอยู่รอดของเซลล์ (survival) การเพิ่มจำนวน (proliferation) การเปลี่ยนสภาพ (differentiation) และการเจริญเต็มวัย (maturation) ของเซลล์ต้นกำเนิดนิวโทรฟิล (neutrophil progenitor cells) นอกจากนี้ยังส่งเสริมการรอดชีวิตและกระตุ้นการทำงานของนิวโทรฟิลที่เจริญเต็มที่อีกด้วย⁽¹⁾ โดยยาฟิลแกรสตีมใช้รักษาผู้ป่วยที่ใช้เคมีบำบัดและพบปัญหาเม็ดเลือดขาวต่ำกว่าปกติ

ยาฟิลแกรสตีมถูกผลิตด้วยเทคนิคการตัดต่อทางพันธุกรรม (recombinant methionyl human G-CSF หรือ rhG-CSF)⁽²⁾ โปรตีนที่เป็นสารสำคัญในยาฟิลแกรสตีมต้องมีปริมาณตามเกณฑ์ที่กำหนด⁽³⁾ เพื่อประสิทธิภาพในการรักษาโรคตามที่ระบุไว้ นอกจากนี้อาจมี related proteins ซึ่งเป็น product-related impurity ที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายและอาจก่อให้เกิดอาการที่ไม่พึงประสงค์ จึงจำเป็นต้องตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ related proteins⁽⁴⁾ โดยตำรายาสากลของยุโรป (European Pharmacopoeia, Ph. Eur. (2018)) ระบุว่า related proteins ที่ตรวจพบในยาฟิลแกรสตีม ได้แก่ oxidised filgrastim form 1, oxidised filgrastim form 2 และ reduced filgrastim แต่ละชนิดต้องมีปริมาณไม่เกิน 1% และต้องมีปริมาณสารปนเปื้อนรวมทั้งหมด (total impurities) ไม่เกิน 2%⁽⁵⁾

การวิเคราะห์ปริมาณ related proteins ในยาฟิลแกรสตีมตามสภาวะการทดสอบของ Ph. Eur. (2018) ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีเหลวความดันสูงแบบผันกลับ หรือเป็นที่รู้จักในชื่อ Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) เป็นเทคนิคโครมาโตกราฟีที่อาศัยคุณสมบัติการกระจายตัวของสารใน 2 เฟส (phases) คือ เฟสอยู่กับที่ (stationary phase) และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) โดยเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้มักเป็นชนิดสารละลายอินทรีย์ (organic solvent)⁽⁶⁾ สารที่มีการกระจายตัวในเฟสเคลื่อนที่ที่ดีจะเคลื่อนที่ไปกับเฟสเคลื่อนที่ไวกว่า ส่วนสารที่กระจายตัวได้ดีในเฟสอยู่กับที่จะเคลื่อนที่ช้ากว่า การหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างสามารถทำได้โดยการเปรียบเทียบอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีค (peak area) ของตัวอย่างกับพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณโปรตีนที่แน่นอนแล้ว สำหรับการหาปริมาณ related proteins สามารถคำนวณได้โดยตรงจากค่าร้อยละของพื้นที่ใต้พีค (%area) ของโครมาโตแกรมที่วิเคราะห์ได้

สถาบันชีววัตถุ มีวิธีมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพของยาฟิลแกรสตีม ซึ่งเดิมอ้างอิงวิธีวิเคราะห์จาก Ph. Eur. (2009)⁽⁴⁾ ปัจจุบันวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวใน Ph. Eur. (2018) ได้มีการปรับเปลี่ยนสภาวะการทดสอบและเพิ่มเติมในส่วนของการเตรียมสารมาตรฐานเพื่อทดสอบ system suitability โดยนำสารมาตรฐานมาทำปฏิกิริยา methionine oxidation และปฏิกิริยา reduction ด้วย dithiothreitol⁽⁵⁾ โดยวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ คือ เพื่อทดสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและ related proteins ของยาฟิลแกรสตีม โดยวิธี RP-HPLC ด้วยสภาวะการทดสอบของวิธีวิเคราะห์ตาม Ph. Eur. (2018) ดำเนินการทดสอบความถูกต้องของวิธีตามข้อกำหนดของ ICH guideline⁽⁷⁾ และแนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียวของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์⁽⁸⁾ เพื่อนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพของยาฟิลแกรสตีมต่อไป

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่าง

ยาฟิลแกรสตีมจำนวน 3 ตัวอย่าง ได้แก่ ยาฟิลแกรสตีม 1, 2 และ 3

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบเป็น HPLC grade ได้แก่ น้ำ (Ligand Scientific CO., LTD.) และ acetonitrile (J.T. Baker) และสารเคมี AR grade (Sigma-Aldrich) ได้แก่ hydrogen peroxide, trifluoroacetic acid (TFA), methionine, และ dithiothreitol (DTT)

สารมาตรฐานฟิลแกรสตีม (CRS Filgrastim, Ph. Eur. Reference Standard, Catalogue Code Y0001173)

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่อง HPLC Shimadzu รุ่น Prominence ที่มีเครื่องตรวจวัดสารแบบไดโอดอะเรย์ (Photo Diode Array, PDA) วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม LabSolutions คอลัมน์ชนิด reversed-phase VertiSep™ BIO C4 (4.6 × 150 mm ขนาด 5 ไมโครเมตร) ตู้บ่มอุณหภูมิ 20 – 25 องศาเซลเซียส ตู้บ่มอุณหภูมิ 30 – 35 องศาเซลเซียส เครื่องซั่ง 4 ตำแหน่ง และแผ่นกรองไนลอนขนาด 0.2 ไมโครเมตร

การเตรียมเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase)

เฟสเคลื่อนที่ A เจือจาง TFA ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในน้ำปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยแผ่นกรองไนลอนขนาด 0.2 ไมโครเมตร

เฟสเคลื่อนที่ B เจือจาง TFA ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในน้ำปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติม acetonitrile ปริมาตร 900 มิลลิลิตร แล้วนำไปกรองด้วยแผ่นกรองไนลอนขนาด 0.2 ไมโครเมตร

การเตรียมสารมาตรฐานสำหรับการทดสอบ System Suitability

การเตรียมสารมาตรฐานฟิลแกรสตีมสำหรับการวิเคราะห์ **oxidised filgrastim form 1** และ **oxidised filgrastim form 2**

เติมสารละลาย hydrogen peroxide ความเข้มข้น 4.5 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร ลงในสารมาตรฐานฟิลแกรสตีมความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 20 – 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม methionine 1.9 มิลลิกรัม ผสมให้เข้ากัน กรองด้วยแผ่นกรองไนลอนขนาด 0.2 ไมโครเมตร

การเตรียมสารมาตรฐานฟิลแกรสตีมสำหรับการวิเคราะห์ reduced filgrastim

เติม DTT ปริมาตร 3.25 ไมโครลิตร ลงในสารมาตรฐานฟิลแกรสตีมความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 30 – 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที กรองด้วยแผ่นกรองไนลอนขนาด 0.2 ไมโครเมตร

การเตรียมตัวอย่างและสารมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์

เจือจางตัวอย่างฟิลแกรสตีมและสารมาตรฐานฟิลแกรสตีมด้วยน้ำให้ได้ความเข้มข้นที่ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กรองด้วยแผ่นกรองไนลอนขนาด 0.2 ไมโครเมตร

วิธีวิเคราะห์

นำ blank, สารมาตรฐานฟิลแกรสตีมสำหรับ system suitability, สารมาตรฐานฟิลแกรสตีมความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และตัวอย่างฟิลแกรสตีมนิตเข้าเครื่อง HPLC ตามลำดับ โดยตั้งค่าอัตราการไหล

0.8 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิคอลัมน์ 60 องศาเซลเซียส ปริมาตรการฉีด 50 ไมโครลิตร ความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวัดสารที่ 215 นาโนเมตร เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ต่อการฉีดสาร 1 ครั้ง เท่ากับ 45 นาที โหมด gradient elution มีสภาวะการชะของ LC ดังนี้

เวลา (นาที)	เฟสเคลื่อนที่ A (%)	เฟสเคลื่อนที่ B (%)
0	60	40
30	20	80
35	20	80
45	60	40

นำผลการวิเคราะห์มาคำนวณปริมาณโปรตีนในตัวอย่างฟิลเกรสติมได้โดยการเทียบพื้นที่ใต้พีคของตัวอย่างเทียบกับพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานฟิลเกรสติม สำหรับการหาปริมาณ related proteins สามารถคำนวณได้จากค่าร้อยละของพื้นที่ใต้พีคจากโครมาโตแกรมที่วิเคราะห์ได้

การทดสอบ System Suitability

การวิเคราะห์ **oxidised filgrastim form 1** และ **oxidised filgrastim form 2** โดยวิเคราะห์ 8 ซ้ำ ผลวิเคราะห์ที่ได้ คือ พีคของ oxidised filgrastim form 1 และพีคของ oxidised filgrastim form 2 ต้องมีค่า relative retention time (RRT) เมื่อเทียบกับพีคหลักประมาณ 0.84 และ 0.98 ตามลำดับ เมื่อคำนวณค่า symmetry factor ของพีคหลักต้องมีค่าไม่เกิน 1.8 และค่า peak-to-valley ratio ระหว่างพีคหลักและพีคของ oxidised filgrastim form 2 ต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 2.0

การวิเคราะห์ **reduced filgrastim** โดยวิเคราะห์ 8 ซ้ำ ผลวิเคราะห์ที่ได้ คือ พีคของ reduced filgrastim ต้องมีค่า RRT เมื่อเทียบกับพีคหลักประมาณ 1.04 และค่า symmetry factor ของพีคหลักต้องมีค่าไม่เกิน 1.8 และค่า resolution ต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 1.5

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

ความจำเพาะของวิธี (specificity) วิเคราะห์สารมาตรฐานฟิลเกรสติมความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, ยาฟิลเกรสติมจำนวน 3 ตัวอย่าง, formulation buffer ของยาฟิลเกรสติม, ตัวอย่าง monoclonal antibody, ตัวอย่าง interferon และ blank (น้ำ) ผลวิเคราะห์ของสารมาตรฐานและตัวอย่างฟิลเกรสติมที่ได้ต้องให้ผลไปในทิศทางเดียวกัน คือ chromatographic profile ที่คล้ายคลึงกัน โดยไม่มีการรบกวนของสารอื่นในตัวอย่าง

ความเป็นเส้นตรงของวิธี (linearity) วิเคราะห์สารมาตรฐานฟิลเกรสติมความเข้มข้น 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 3 ซ้ำ นำผลวิเคราะห์ที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานและพื้นที่ใต้พีคหลัก ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2) ที่ได้ควรมีค่าใกล้เคียง 1

ความเที่ยงของวิธี (precision) วิเคราะห์ตัวอย่างฟิลเกรสติมจำนวน 6 ซ้ำ ในวันเดียวกัน (repeatability) และวิเคราะห์ตัวอย่างฟิลเกรสติมซ้ำ 3 วัน (intermediate precision) ค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%relative standard deviation, %RSD) ของพื้นที่ใต้พีคหลักต้องไม่เกิน 2

ความถูกต้องของวิธี (accuracy) เติมสารมาตรฐานฟิลเกรสติมความเข้มข้น 0.25, 0.50 และ 0.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในตัวอย่างฟิลเกรสติม วิเคราะห์ 3 ซ้ำ คำนวณหาค่าร้อยละของการกลับคืน (%recovery) ซึ่งควรมีค่าอยู่ในช่วง 90 – 110%

ขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) เจือจางสารมาตรฐานฟิลเกรสติมแล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC ค่า LOD คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่ให้ค่าสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (signal-to-noise ratio, S/N) เท่ากับ 3:1 และ LOQ คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่ให้ค่า S/N เท่ากับ 10:1

ความคงทนของวิธี (robustness) เปลี่ยนเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างฟิลเกรสติม 2 ระหว่างเครื่อง HPLC 1 (Thermo, AS3000) และเครื่อง HPLC 2 (Shimadzu, Prominence) แล้วนำพื้นที่ใต้พีคหลักที่ได้ไปคำนวณเปรียบเทียบโดยใช้สถิติ t-Test

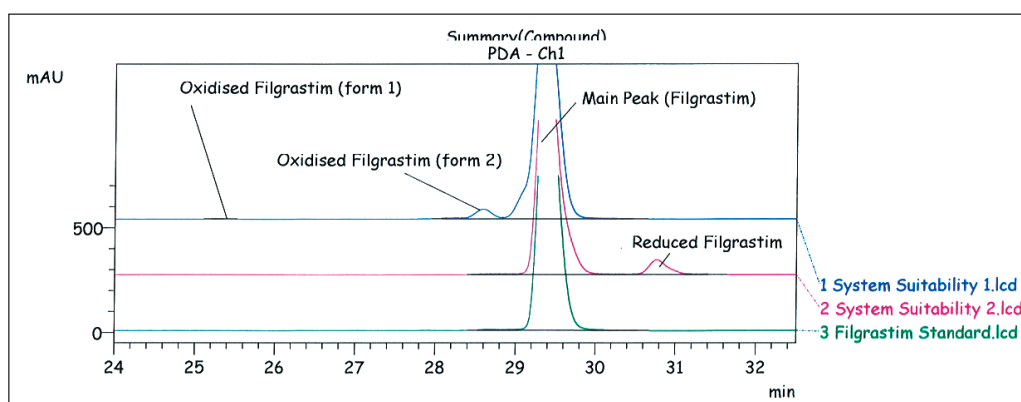
ความไม่แน่นอนของการวัด (measurement uncertainty) แหล่งที่มาของความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนและ related protein โดยวิธี RP-HPLC ได้แก่ ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐานฟิลเกรสติม ความไม่แน่นอนที่ได้จากการวิเคราะห์สารมาตรฐานฟิลเกรสติม ปีเปตที่ใช้ในการเตรียมสารมาตรฐานและตัวอย่างฟิลเกรสติม ความเที่ยงของวิธี (intermediate precision) จากการทดสอบความถูกต้องของวิธี นำมาหาค่าความไม่แน่นอนรวม (combined uncertainty, uc) และค่าความไม่แน่นอนขยาย (expanded uncertainty: U) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ค่า coverage factor (k) เท่ากับ 2

ผล

ผลการทดสอบ system suitability

ผลวิเคราะห์ oxidised filgrastim พบว่าโครมาโตแกรมที่ได้ประกอบด้วยพีคหลักและพีคของ oxidised filgrastim form 1 และ oxidised filgrastim form 2 ซึ่งถูกชะออกมาก่อนพีคหลัก มีค่า RRT เท่ากับ 0.86 และ 0.98 ตามลำดับ โดยพีคของ oxidised filgrastim form 2 ไม่สามารถแยกออกจากพีคหลักได้อย่างชัดเจน ดังแสดงในภาพที่ 1 ผลวิเคราะห์ค่า symmetry factor ของพีคหลักเท่ากับ 0.87 ผ่านเกณฑ์ที่กำหนด คือ มีค่าไม่เกิน 1.8 และค่า peak-to-valley ratio ระหว่างพีคหลักและพีคของ oxidised filgrastim form 2 มีค่าเท่ากับ 7.74 ผ่านเกณฑ์ที่กำหนด คือ มีค่าไม่น้อยกว่า 2.0

ผลวิเคราะห์ reduced filgrastim พบว่าโครมาโตแกรมที่ได้ประกอบด้วยพีคหลักและพีคของ reduced filgrastim ซึ่งถูกชะออกมาทีหลังพีคหลัก โดยมีค่า RRT เท่ากับ 1.05 ดังแสดงในภาพที่ 1 ผลการคำนวณค่า symmetry factor ของพีคหลักได้เท่ากับ 1.71 และค่า resolution ที่วิเคราะห์ได้เท่ากับ 2.86 ผ่านเกณฑ์ที่กำหนด คือ มีค่าไม่เกิน 1.8 และมีค่าไม่น้อยกว่า 1.5 ตามลำดับ



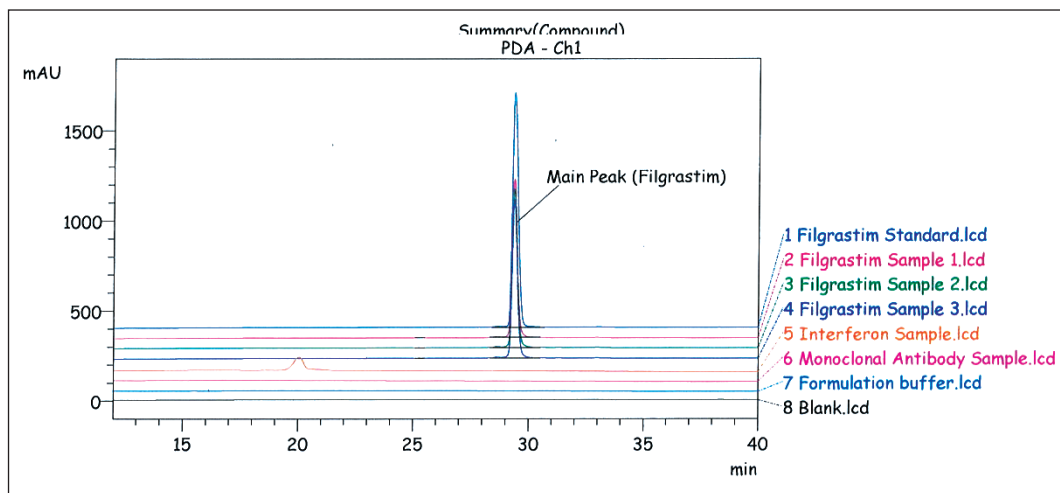
ภาพที่ 1 โครมาโตแกรมแสดงผลการทดสอบ system suitability

ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธี

ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและ related proteins ในยาฟิลเกรสติม โดยวิธี RP-HPLC รายละเอียดดังนี้

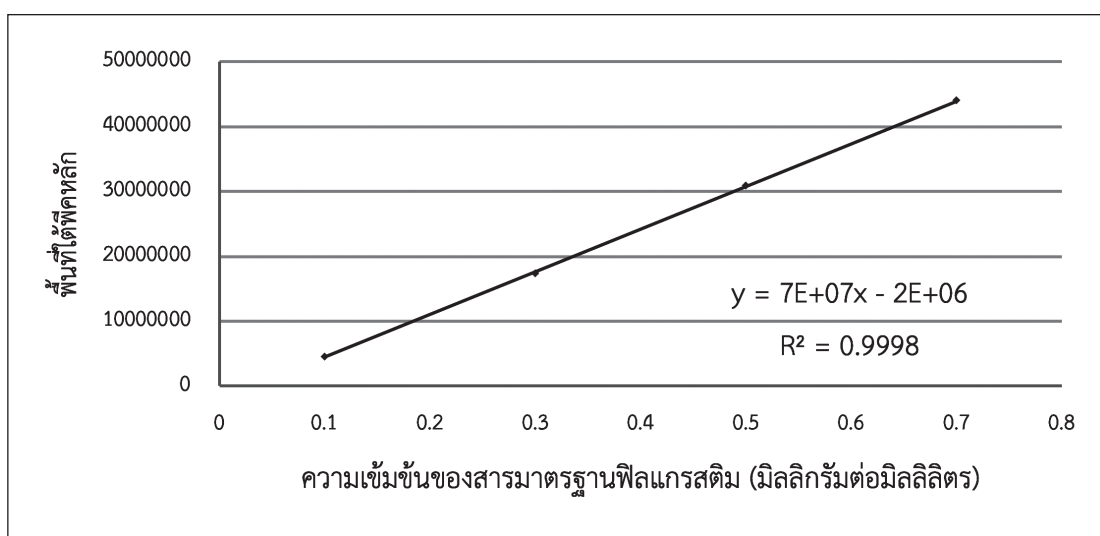
ความจำเพาะของวิธี ผลวิเคราะห์สารมาตรฐานฟิลเกรสติมและตัวอย่างฟิลเกรสติมทั้ง 3 ตัวอย่าง โครมาโตแกรมที่ได้ปรากฏพีคหลักที่ค่า RT ใกล้เคียงกันที่ประมาณ 29.37 นาที ในขณะที่ตัวอย่าง monoclonal

antibody และตัวอย่าง interferon ไม่มีพีคปรากฏที่ค่า RT เดียวกันกับพีคหลักของสารมาตรฐานและตัวอย่างฟิลเกรสติม เช่นเดียวกับ formulation buffer ของตัวอย่างฟิลเกรสติมและ blank ที่ไม่พบพีคบริเวณ พีคของตัวอย่างฟิลเกรสติม ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 โครมาโตแกรมแสดงผลการทดสอบ Specificity

ความเป็นเส้นตรง กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานฟิลเกรสติมที่ 0.1 – 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และพื้นที่ใต้พีคหลัก แสดงกราฟเส้นตรงดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานฟิลเกรสติมและพื้นที่ใต้พีคหลัก

ความเที่ยงของวิธี ผลวิเคราะห์ตัวอย่างฟิลเกรสติม 1 ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 6 ซ้ำ ในวันเดียวกัน (repeatability) ได้ค่า %RSD เท่ากับ 0.92 และผลการทดสอบความเที่ยงระหว่างวัน (intermediate precision) โดยทดสอบซ้ำ 3 วัน ได้ค่า %RSD เท่ากับ 0.41 ดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 ผลวิเคราะห์ตัวอย่างฟิลแกรสติม 1 จำนวน 6 ซ้ำ ในวันเดียวกัน

ครั้งที่	พื้นที่ใต้พีคหลัก
1	27368324
2	27516930
3	27479649
4	27512770
5	27943015
6	27959771
%RSD	0.92

ตารางที่ 2 ผลวิเคราะห์ตัวอย่างฟิลแกรสติม 1 เมื่อทดสอบซ้ำ 3 วัน

วันที่	พื้นที่ใต้พีคของพีคหลัก			%RSD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
1	34196436	34550036	34867978	0.65
2	31804264	31949238	31635829	
3	33780542	33583345	33916357	

ความถูกต้องของวิธี ผลวิเคราะห์ %recovery ที่ได้อยู่ในช่วง 90 - 110% เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด
ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ค่า %recovery ที่ได้จากการทดสอบความถูกต้องของวิธี

ทดสอบครั้งที่	%Recovery		
	Spiked by 0.25 mg/ml Filgrastim Standard	Spiked by 0.50 mg/ml Filgrastim Standard	Spiked by 0.75 mg/ml Filgrastim Standard
1	95.65	96.20	97.73
2	101.45	103.80	106.82
3	107.25	106.33	106.82
Mean	101.45	102.11	103.79
Overall Mean	102.45		

LOD และ LOQ ผลการทดสอบที่ได้ พบว่าความเข้มข้นของสารมาตรฐานฟิลแกรสติมที่น้อยที่สุดที่ยังคงปรากฏพีคหลักและให้ค่า S/N รบกวนใกล้เคียง 3 คือ 0.0125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ค่า S/N เท่ากับ 8.14 โดยมี %RSD เท่ากับ 3.26) และความเข้มข้นของสารมาตรฐานฟิลแกรสติมที่ให้ค่า S/N ใกล้เคียง 10 คือ 0.0250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ค่า S/N เท่ากับ 23.72 โดยมี %RSD เท่ากับ 0.20) ดังนั้นค่า LOD เท่ากับ 0.0125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า LOQ เท่ากับ 0.0250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ความคงทนของวิธี เมื่อเปลี่ยนเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างฟิลเกรสตีม 2 ที่ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พื้นที่ใต้พีคที่ได้แสดงในตารางที่ 4 เมื่อคำนวณเปรียบเทียบพื้นที่ใต้พีคหลักโดยใช้สถิติ t-Test พบว่า ค่า t Stat เท่ากับ -1.31 มีค่าน้อยกว่า t Critical two-tail ซึ่งเท่ากับ 4.30 ดังนั้นผลวิเคราะห์ตัวอย่างโดยเครื่อง HPLC ทั้ง 2 เครื่อง มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 4 พื้นที่ใต้พีคหลักของตัวอย่างฟิลเกรสตีม 2 ที่วิเคราะห์ได้เมื่อเปลี่ยนเครื่อง HPLC

ครั้งที่	พื้นที่ใต้พีคหลัก	
	HPLC 1	HPLC 2
1	15487548	15405350
2	15674064	15532550
3	15362500	15533461
Mean	15508037	15490454
%RSD	1.01	0.48

ความไม่แน่นอนของการวัด ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($k = 2$) ค่าความไม่แน่นอนรวมและค่าความไม่แน่นอนขยายของการหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างฟิลเกรสตีมเท่ากับ 0.012 และ 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ค่าความไม่แน่นอนรวมและค่าความไม่แน่นอนขยายของการหาปริมาณ related proteins ในตัวอย่างฟิลเกรสตีมเท่ากับ 0.007 และ 0.01% ตามลำดับ

วิจารณ์

การวิเคราะห์ related proteins โดยวิธี RP-HPLC ใน Ph. Eur. (2009) เน้นเฉพาะการหา oxidised filgrastim เท่านั้น ต่อมาใน Ph. Eur. (2018) ได้มีการพัฒนาความสามารถของวิธีโดยการปรับสภาวะการทดสอบเพื่อให้สามารถวิเคราะห์ related proteins ชนิด oxidised filgrastim form 1, oxidised filgrastim form 2 และ reduced filgrastim ในสารมาตรฐานฟิลเกรสตีมได้ ดังที่เห็นได้จากการทดสอบ system suitability เมื่อต้องการวิเคราะห์ related proteins ในตัวอย่างฟิลเกรสตีมจะทราบได้จากการเปรียบเทียบค่า RT ของพีคของ related proteins ในสารมาตรฐานฟิลเกรสตีมที่ทดสอบใน system suitability นั้นเอง โดยเกณฑ์การตัดสินของ Ph. Eur. (2018) ระบุว่า related proteins แต่ละชนิดต้องมีปริมาณไม่เกิน 1% และต้องมีปริมาณสารปนเปื้อนรวมทั้งหมด (total impurities) ไม่เกิน 2%⁽⁶⁾ ต่อมาใน Ph. Eur. ซึ่งมีการปรับปรุงล่าสุดในปี ค.ศ. 2019 ได้มีการปรับเกณฑ์การตัดสินเป็นต้องมีปริมาณ related proteins แต่ละชนิดไม่เกิน 3% และปริมาณสารปนเปื้อนรวมทั้งหมดไม่เกิน 6.5%⁽⁹⁾ โดยไม่ได้มีการปรับเปลี่ยนสภาวะในการทดสอบแต่อย่างใด อย่างไรก็ตามการหาปริมาณ related proteins ในยาฟิลเกรสตีมควรพิจารณาตาม Ph. Eur. และเกณฑ์การตัดสินของผู้ผลิตร่วมด้วย

จากการศึกษาความจำเพาะของวิธีแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างฟิลเกรสตีมทั้ง 3 ตัวอย่าง ให้ผลไปในทางเดียวกันกับสารมาตรฐานฟิลเกรสตีม โดยมี chromatographic profile ที่คล้ายคลึงกัน และค่า RT ของพีคหลักปรากฏที่เวลาใกล้เคียงกันโดยไม่มีการรบกวนของสารอื่น ๆ ในตัวอย่าง (formulation buffer) และ blank ในขณะที่ผลการวิเคราะห์ของตัวอย่าง monoclonal antibody และตัวอย่าง interferon พบว่าไม่มีพีคปรากฏที่ค่า RT เดียวกันกับพีคหลักของสารมาตรฐานและตัวอย่างฟิลเกรสตีม การตรวจสอบความเป็นเส้นตรงของวิธีโดยการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีคหลักและความเข้มข้นของสารมาตรฐานฟิลเกรสตีม แสดงให้เห็นว่าเป็นวิธีที่มีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นของสารมาตรฐานฟิลเกรสตีม 0.1 ถึง 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า R^2 เท่ากับ 0.9998

ผลวิเคราะห์ที่ได้เมื่อทดสอบตัวอย่างฟิลแกรสติม 6 ข้าง ในวันเดียวกันและทดสอบต่างวันกันจำนวน 3 ข้าง แสดงให้เห็นว่าวิธีนี้มีความเที่ยง ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธี พบว่า %recovery ที่ได้เท่ากับ 102.45% ซึ่งอยู่ในช่วง 90 – 110% เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด สำหรับค่า LOD และ LOQ ที่วิเคราะห์ได้มีค่าน้อยกว่าความเข้มข้นของตัวอย่างฟิลแกรสติมซึ่งวิเคราะห์ที่ 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร แสดงให้เห็นว่าปริมาณโปรตีนและ related proteins ที่วิเคราะห์ด้วยวิธีนี้อยู่ในระดับที่ยอมรับได้ นอกจากนี้เมื่อศึกษาความคงทนของวิธีเมื่อเปลี่ยนเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างฟิลแกรสติม ระหว่างเครื่อง HPLC 1 (Thermo, AS3000) ที่มีเครื่องตรวจวัดสารแบบดูดกลืนแสงชนิดยูวี วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Chromquest และเครื่อง HPLC 2 (Shimadzu, Prominence) ที่มีเครื่องตรวจวัดสารแบบไดโอดอะเรย์ (Photo Diode Array, PDA) วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม LabSolutions โดยใช้คอลัมน์เดียวกันในการวิเคราะห์เปรียบเทียบ ถึงแม้ว่าเครื่องตรวจวัดสารของทั้งสองเครื่องเป็นคนละชนิดกัน แต่ทั้งสองเครื่องมีความสามารถในการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 215 นาโนเมตร ได้เช่นเดียวกัน เมื่อนำพื้นที่ใต้พีคหลักของตัวอย่างฟิลแกรสติมที่วิเคราะห์ได้จากแต่ละเครื่องมาคำนวณเปรียบเทียบโดยใช้สถิติ t-Test จึงสรุปได้ว่าผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างฟิลแกรสติมโดยเครื่อง HPLC ทั้งสองเครื่องดังกล่าวมีค่าไม่แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับความไม่แน่นอนของการวัดที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($k = 2$) พบว่าค่าความไม่แน่นอนรวมและค่าความไม่แน่นอนขยายของการหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างฟิลแกรสติมเท่ากับ 0.012 และ 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ตามลำดับ ค่าความไม่แน่นอนรวมและค่าความไม่แน่นอนขยายของการหาปริมาณ related proteins ในตัวอย่างฟิลแกรสติมเท่ากับ 0.007 และ 0.01% ตามลำดับ

สรุป

จากผลการทดสอบความถูกต้องทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าวิธีการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและ related proteins ในยาฟิลแกรสติม โดยวิธี RP-HPLC ตาม Ph. Eur. (2018) เป็นวิธีที่มีความจำเพาะ ความถูกต้อง ความเที่ยง และมีความคงทน เหมาะสมสำหรับนำมาเป็นวิธีมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการเพื่อควบคุมคุณภาพยาฟิลแกรสติมที่จำหน่ายในประเทศและสนับสนุนส่งเสริมอุตสาหกรรมการผลิตยาฟิลแกรสติมในประเทศตามแผนพัฒนาประเทศไทย 4.0

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นางสาวรุฬ จตุรจิตตินันท์ หัวหน้ากลุ่มผลิตภัณฑ์เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการรักษาที่ให้คำแนะนำ และตรวจทานความถูกต้องของการทดสอบความถูกต้องของวิธี และ ดร. สุภาพร ภูมิอมร ผู้อำนวยการสถาบันชีววัตถุที่ปรึกษาในการดำเนินการทดสอบความถูกต้องของวิธี

เอกสารอ้างอิง

1. Yao HM, Ottery FD, Borema T, Harris S, Levy J, May TB, et al. PF-06881893 (Nivestym™), a filgrastim biosimilar, versus US-licensed filgrastim reference product (US-Neupogen®): pharmacokinetics, pharmacodynamics, immunogenicity, and safety of single or multiple subcutaneous doses in healthy volunteers. *BioDrugs* 2019; 33(2): 207–20.
2. NEUPOGEN® (filgrastim) injection, for subcutaneous or intravenous use. Initial U.S. Approval. [online]. 2018; [cited 2020 Feb 13]; [46 screens]. Available from: URL: http://pi.amgen.com/united_states/neupogen/neupogen_pi_hcp_english.pdf
3. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products (Q6B). London: European Medicines Agency; 2006.

4. สายวรุฬ จตุรจิตตินันท์, วิชชุดา จริยะพันธุ์. การทวนสอบวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารปนเปื้อนชนิด Related Proteins ในตัวอย่างยาชีววัตถุ Filgrastim โดยเทคนิค Reversed-Phase Chromatography. ว กรมวิทย์ พ 2555; 54(3-4): 155-65.
 5. Filgrastim concentrated solution. In: European pharmacopoeia 9.3. 9th ed. Strasbourg: EDQM Council of Europe; 2018. p. 4899-4901.
 6. Liquid chromatography. In: European pharmacopoeia 9.6. 9th ed. Strasbourg: EDQM Council of Europe; 2019. p. 5822-5823.
 7. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology (Q2(R1)). London: European Medicines Agency; 2005.
 8. ทิพวรรณ นิ่งน้อย. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.
 9. Filgrastim concentrated solution. In: European pharmacopoeia 9.8. 9th ed. Strasbourg: EDQM Council of Europe; 2019. p. 6908-6909.
-

Analytical Method Validation for Determination of Protein and Related Protein Content in Filgrastim by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography

Surintra Lahnwong Saiwarul Jadoonkittinan and Supaporn Phumiamorn

Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Filgrastim is used for a treatment of patients with low leukopenia. A content of protein is important for an efficacy of product and related proteins may cause side effects. The objective of this study was to validate an analysis of protein and related protein content in both oxidised and reduced forms by reversed-phase high performance liquid chromatography using European Pharmacopoeia condition. The result showed that this method was specific to filgrastims. The linearity was found between the peak area and the filgrastim concentration of 0.1 – 0.7 mg/ml ($R^2 = 0.9998$). The percent of relative standard deviation of repeatability and intermediate precision were 0.92 and 0.65, respectively. The percent recovery of accuracy was 102.45. Moreover, the limit of quantitation and the limit of detection were 0.0250 and 0.0125 mg/ml, respectively. This method also showed good robustness. In conclusion, this method is precise and suitable to measure the content of protein and related protein in filgrastims for the quality control of the products.

Keywords: Filgrastim, Protein content, Reversed-phase liquid chromatography

การศึกษาความถูกต้องวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดี ต่อ Filamentous Haemagglutinin ในซีรัม หนูถีบจักรที่ฉีดวัคซีนไคกรอนชนิดไร้เซลล์โดย ELISA

อภิชัย ศุภสารสาทร รัชชานนท์ รักชีพ อัจจรรย อาเมน วิริยามาตย์ เจริญคุณธรรม และสุภาพร ภูมิอมร
สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ วัคซีนไคกรอนชนิดไร้เซลล์ที่ผลิตในประเทศไทย Filamentous Hemagglutinin (FHA) เป็นสารสำคัญชนิดหนึ่ง ซึ่งต้องมีการควบคุมความแรงให้ได้มาตรฐาน การศึกษานี้จึงทำการพัฒนางานตรวจวิเคราะห์เพื่อควบคุมคุณภาพวัคซีนในห้องปฏิบัติการ ซึ่งได้ดำเนินการศึกษาความถูกต้องวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดีต่อ Filamentous Haemagglutinin ในซีรัม หนูถีบจักรที่ฉีดวัคซีนไคกรอนชนิดไร้เซลล์โดย ELISA ผลการศึกษา พบว่าวิธีมีความจำเพาะและมีความเป็นเส้นตรงในช่วง ความเข้มข้นของ anti-FHA ระหว่าง 1.95-4,000 mIU/ml มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มากกว่า 0.99 ขีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณเท่ากับ 3.91 และ 4,000 mIU/ml ช่วงค่าพิสัยอยู่ระหว่าง 15.62-1,000 mIU/ml ความแม่นยำมีความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์อยู่ระหว่าง -1.34-1.69% ความเที่ยงมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนอยู่ระหว่าง 2.23-20.00% และความทนของวิธีมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนอยู่ระหว่าง 12.21-19.68% ผลแสดงให้เห็นว่าวิธีมีความถูกต้องเหมาะสม สามารถใช้ตรวจความแรงต่อ FHA ของวัคซีนไคกรอนชนิดไร้เซลล์ได้

คำสำคัญ: วัคซีนไคกรอนชนิดไร้เซลล์, ความแรง, anti-FHA, ELISA

Corresponding author E-mail: apichai.s@dmsc.mail.go.th

Received: 1 October 2019

Revised: 1 July 2020

Accepted: 10 February 2021

บทนำ

โรคไอกรน (Pertussis) เป็นโรคติดเชื้อของระบบทางเดินหายใจส่วนบน ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Bordetella pertussis* ผู้ป่วยจะมีอาการไอที่เป็นเอกลักษณ์ เป็นเสียงที่เกิดจากการหายใจลำบากตามหลังอาการไอที่เรียกว่า Whooping cough โรคไอกรนติดต่อกันได้ง่าย โดยเชื้อจะกระจายอยู่ในละอองของเสมหะ น้ำมูก น้ำลายของผู้ป่วย และจะติดต่อกันเมื่อละอองเชื้อเข้าสู่ระบบทางเดินหายใจ ส่วนใหญ่ติดเชื้อมาจากผู้ใหญ่ในครอบครัวซึ่งมีการติดเชื้อแต่ไม่มีอาการ (carrier) หรือมีอาการไม่มาก โรคไอกรนเป็นได้กับทารกตั้งแต่เดือนแรก⁽¹⁾ เด็กทารกอายุน้อยกว่า 6 เดือนที่มีภาวะแทรกซ้อน เกิดปอดอักเสบจากการติดเชื้อจะมีอาการรุนแรงและอัตราการเสียชีวิตสูง⁽²⁾ ปัจจุบันแม้ว่ามีวัคซีนสำหรับป้องกันโรคไอกรนแต่ยังไม่สามารถกำจัดให้หมดไปได้⁽³⁾

วัคซีนป้องกันโรคไอกรนมี 2 ชนิด คือ วัคซีนไอกรนชนิดที่ทำจากแบคทีเรียทั้งเซลล์ (whole cell: wP) และชนิดไร้เซลล์ (acellular: aP) ซึ่งผสมอยู่กับวัคซีนรวมคอตีบ-บาดทะยัก เป็นวัคซีน DTwP หรือ DTaP วัคซีนทั้ง 2 ชนิดนี้มีประสิทธิภาพไม่ต่างกัน โดย DTwP เป็นวัคซีนที่ใช้ในแผนงานสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคของประเทศไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2520 แต่ DTwP นั้น จะทำให้เกิดอาการข้างเคียงมากกว่า DTaP โดยเด็กที่ได้รับวัคซีน DTwP อาจจะมีไข้สูง มีอาการชัก กรดร้องนาน หรือมีภาวะตัวอ่อนและไม่ตอบสนอง (hypotonic hyporesponsive episode) ซึ่งเกิดขึ้นภายใน 48 ชั่วโมง หลังได้รับวัคซีน wP ซึ่งวัคซีน aP ไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาที่ไม่พึงประสงค์ดังกล่าว⁽⁴⁾ วัคซีน aP เป็นวัคซีนที่ผลิตจากสารสกัดเฉพาะบางส่วนของตัวเชื้อไอกรนที่สามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันโรค โดยส่วนประกอบของเชื้อไอกรนที่นำมาผลิตวัคซีน ได้แก่ Pertussis toxin (PT), Filamentous hemagglutinin (FHA), Pertactin (PRN) และ Fimbrial agglutinin (FIM) โดยวัคซีนที่ผลิตมาจากแต่ละบริษัท จะมีส่วนประกอบของเชื้อไอกรนแตกต่างกันได้ตั้งแต่ 2 ถึง 4 ส่วนประกอบ ทั้งนี้วัคซีนไอกรนชนิดไร้เซลล์จะมี PT และ FHA เป็นส่วนประกอบหลัก FHA เป็นโมเลกุลใหญ่ขนาด 367-kDa มีโครงสร้างเป็นรูป hairpin-shaped เมื่อเชื้อไอกรนเข้าสู่ระบบทางเดินหายใจส่วนบน FHA จะทำหน้าที่เกาะกับ ciliated respiratory epithelium ทำให้ตัวเชื้ออยู่ในระบบทางเดินหายใจได้ แล้วปล่อย PT ซึ่งเป็น exotoxin ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพกระตุ้น lymphocytosis และ pancreatic islet cell activity รวมทั้งเหนี่ยวนำให้ร่างกายไวต่อฮิสตามีน⁽²⁾

การผลิตวัคซีน aP ของแต่ละบริษัทจะมีความแตกต่างกัน ได้แก่ ความหลากหลายของสายพันธุ์ตัวเชื้อไอกรน วิธีที่ใช้ในการผลิต วิธีที่ใช้สกัดส่วนประกอบของเชื้อ วิธีการทำให้ PT หมดพิษ (detoxified) กลายเป็น Pertussis toxoid (PTxd) รวมทั้งปริมาณ PT และ FHA ที่ใช้เข้าสู่สูตรผสมเป็นวัคซีน จึงทำให้วัคซีนมีข้อกำหนดเฉพาะ (product-specific) ของแต่ละชนิด (brand) ต่างกัน⁽²⁾ วัคซีนเหล่านี้ต้องได้รับการตรวจสอบคุณภาพ ประสิทธิภาพ ประสิทธิภาพการขึ้นทะเบียนยา และก่อนการจำหน่ายแต่ละรุ่น⁽⁵⁾ ปัจจุบันวัคซีน aP ที่ผลิตในประเทศเป็นวัคซีน aP แบบรีคอมบิแนนท์ ซึ่งเป็นวัคซีนตัวแรกที่ได้พัฒนาขึ้นโดยนักวิจัยไทย ได้รับการจดสิทธิบัตรในหลายประเทศ⁽⁶⁾ ใช้วิธีทางพันธุวิศวกรรมเพื่อทำให้ความเป็นพิษของโปรตีนแอนติเจนหมดไป ซึ่งให้ผลดีกว่า ปลอดภัยกว่า และมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้สารเคมี⁽⁷⁾

การตรวจสอบคุณภาพวัคซีน aP ด้านความแรง เป็นการวัดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (Immunological activity) ซึ่งมี 2 วิธี คือ mouse immunogenicity test (MIT) และ modified mouse intracerebral challenge assay (MICA) โดยวิธี MIT เป็นวิธีการตรวจหาปริมาณแอนติบอดีในซีรัมของหนูถีบจักรที่กระตุ้นด้วยวัคซีน aP โดยใช้ ELISA^(8,9) เป็นวิธีที่ใช้วัดระดับภูมิคุ้มกันที่ไม่ต้องใช้ตัวเชื้อไอกรนฉีดเข้าสมองหนูถีบจักรซึ่งจะทำให้สัตว์ทดลองมีความเจ็บปวดทรมานมากเหมือนการทดสอบด้วยวิธี MICA แต่อย่างไรก็ตามก่อนที่จะนำวิธีการทดสอบมาใช้งาน หน่วยงานผู้ควบคุมคุณภาพภาครัฐ คือ สถาบันชีววัตถุ ต้องทำการศึกษาความถูกต้องของวิธีก่อน เนื่องจากความจำเพาะของวัคซีน (Product-specific vaccine) ต่อการทดสอบ การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของสัตว์ทดลองที่ใช้และความแตกต่างในรายละเอียดขั้นตอนวิธีของแต่ละห้องปฏิบัติการ⁽⁶⁾ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวิธีการ

ตรวจสอบคุณภาพวัคซีน aP โดยทำการศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดีต่อ FHA ในซีรัมหนูถีบจักรที่ฉีดวัคซีน aP โดย ELISA แบบ Indirect เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจสอบคุณภาพด้านความแรงของวัคซีน aP ของประเทศ ซึ่งมีหลักการการทดสอบที่ใช้เพลทที่มี FHA แอนติเจนของวัคซีน aP เคลือบอยู่ที่ก้นหลุม แล้วใส่ตัวอย่างซีรัมลงไปหลุม บ่มในอุณหภูมิที่ 37 °C แอนติบอดีในซีรัมจะจับกับแอนติเจนอย่างจำเพาะ และเมื่อเติมเอนไซม์ HRP conjugated ลงไปจับกับแอนติบอดีแอนติเจนคอมเพล็กซ์ แล้วเติม substrate จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ HRP เกิดสารสีน้ำเงิน จากนั้นเติมสารเพื่อหยุดปฏิกิริยา สารสีน้ำเงินเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งความเข้มของสีจะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของแอนติบอดีในตัวอย่าง

วัสดุและวิธีการ

สารมาตรฐาน

สารมาตรฐาน: WHO Reference Reagent *Bordetella pertussis* anti-serum (mouse) 1RR (Code: 97/642, NIBSC, UK) ที่มี anti-FHA antibody (WHO Ref. 97/642), In-house FHA standard in 40% glycerol สารมาตรฐานจากผู้ผลิตที่ได้สอบเทียบกับ international reference standard FHA (Code: 90/520, NIBSC, UK) และวัคซีนไอกรนชนิดไร้เซลล์ (acellular pertussis vaccine)

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบเป็นชนิด Analytical Reagent grade (AR grade) ได้แก่ Sodium chloride (Merck, Germany), Potassium chloride (Sigma-Aldrich, USA), Sodium hydrogen phosphate (Merck, Germany), Potassium hydrogen phosphate (Merck, Germany), Sodium carbonate (Merck, Germany), Sodium hydrogen carbonate (Sigma-Aldrich, USA), Tween 20 (Merck, Germany), Hydrochloric acid 37% (Merck, Germany), Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, USA), Rabbit anti-mouse IgG (H+L) HRP conjugate (Abcam, England), TMB Microwell Peroxidase Substrate (KPL, USA)

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่อง Microplate reader infinite F200 Pro (Tecan สวิตเซอร์แลนด์) เครื่อง Microplate wash: ImmunoWash™ 1575 (BIO-RAD สหรัฐอเมริกา) ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ 37 °C (memmert สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)

ตัวอย่าง

ซีรัมหนูถีบจักรที่ได้รับการฉีดการกระตุ้นด้วยวัคซีนไอกรนชนิดไร้เซลล์

การเตรียมตัวอย่าง

การเตรียมวัคซีนสำหรับฉีดสัตว์ทดลอง: ทำการเตรียมวัคซีนไอกรนชนิดไร้เซลล์ (acellular pertussis vaccine, code No. FB-PE25001) โดยเตรียมวัคซีน 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 เป็นวัคซีนไม่เจือจาง (undiluted) กลุ่มที่ 2 เป็นวัคซีนเจือจางด้วย Phosphate Buffer Saline (PBS) ได้เป็นวัคซีนความเจือจาง 1/6.25 และกลุ่มที่ 3 เป็นวัคซีนความเจือจางด้วย PBS ได้เป็นวัคซีนความเจือจาง 1/15.625

การกระตุ้นภูมิคุ้มกันและการเตรียมซีรัมจากสัตว์ทดลอง: ทำการฉีดวัคซีนหนูถีบจักรกลุ่มละ 16 ตัว จำนวน 3 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 ฉีดวัคซีนที่ไม่เจือจาง (undiluted) กลุ่มที่ 2 ฉีดวัคซีนความเจือจาง 1/6.25 และกลุ่มที่ 3 ฉีดวัคซีนความเจือจาง 1/15.625 และฉีดหนูด้วย PBS จำนวน 10 ตัว เป็นกลุ่มควบคุม โดยฉีดเข้าช่องท้อง (Intraperitoneal) ตัวละ 0.5 ml หลังจากนั้น 35 วัน ทำการสลบหนูด้วยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ก่อนเจาะเลือด นำเลือดแต่ละตัวแยกใส่ในหลอด ปั่นแยกซีรัมด้วยเครื่องปั่นความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดซีรัมของแต่ละหลอดมารวมกัน (Pooled serum) ในแต่ละกลุ่มแล้วเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า -20°C

การเจือจางซีรัมหนูถีบจักร: เจือจางซีรัมหนูด้วย diluent Buffer 0.3% (w/v) BSA ใน PBST โดยกลุ่มที่ 1 เป็นซีรัมหนูที่ฉีดวัคซีน undiluted เป็นกลุ่มที่มีระดับ anti-FHA สูง (High titer group) เจือจาง 1,000, 2,000, 4,000 และ 8,000 เท่า กลุ่มที่ 2 เป็นซีรัมหนูที่ฉีดวัคซีนความเจือจาง 1/6.25 เป็นกลุ่มที่มีระดับ anti-FHA ปานกลาง (Medium titer group) เจือจาง 400, 800, 16,000 และ 3,200 เท่า กลุ่มที่ 3 เป็นซีรัมหนูที่ฉีดวัคซีนความเจือจาง 1/15.625 เป็นกลุ่มที่มีระดับ anti-FHA ต่ำ (Low titer group) เจือจาง 150, 300, 600 และ 1,200 เท่า ส่วนกลุ่มควบคุม (Normal mouse serum) เจือจาง 50 เท่า

สัตว์ทดลอง

หนูถีบจักรสายพันธุ์ ICR อายุ 5 สัปดาห์ หรือน้ำหนัก 25–30 กรัม จำนวน 46 ตัว จำนวน 1 กลุ่ม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จังหวัดนครปฐม (โครงการได้รับการอนุมัติใช้สัตว์ทดลองเพื่องานวิจัย โดยคณะกรรมการดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลอง กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ หมายเลขโครงการ 59-033)

การตรวจวิเคราะห์

ทำการวิเคราะห์โดยเทคนิค ELISA แบบ Indirect โดยใช้เพลทที่มี FHA แอนติเจนของวัคซีน aP เคลือบอยู่ที่ก้นหลุม แล้วใส่ตัวอย่างซีรัมลงไปหลุม บ่มในอุณหภูมิที่เหมาะสม Anti-FHA ในซีรัมจะจับกับแอนติเจนอย่างจำเพาะ และเมื่อเติมเอนไซม์ HRP conjugated ลงไปจับกับแอนติบอดีแอนติเจนคอมเพล็กซ์ แล้วเติม substrate จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ HRP เกิดสารสีน้ำเงิน จากนั้นเติม stop solution เพื่อหยุดปฏิกิริยา สารสีน้ำเงินเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งความเข้มของสีจะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของแอนติบอดีในตัวอย่าง โดยมีรายละเอียดดังนี้

เคลือบเพลท 96 หลุม (Clear Flat-Bottom Immuno Nonsterile 96-Well Plates, Thermo Scientific™, USA) ด้วย FHA antigen (In-house FHA standard in 40% glycerol) ที่เจือจางด้วย coating buffer ให้มีความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม เก็บที่อุณหภูมิ $2-8^{\circ}\text{C}$ ข้ามคืน ล้างเพลทด้วย PBST โดยใช้เครื่อง Microplate wash: ImmunoWash™ 1575 (BIO-RAD, USA) จากนั้นเติม blocking buffer ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ นาน 1 ชั่วโมง ในตู้อบควบคุมอุณหภูมิ 37°C (Mettler, Germany) ใส่สารมาตรฐาน anti-FHA (WHO Ref. 97/642) และซีรัมของหนูแต่ละกลุ่มปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 60 นาที ล้างเพลทด้วย PBST แล้วเติมสารละลาย Rabbit anti-mouse IgG (H+L) HRP conjugate (Abcam, UK) ที่เจือจาง 20,000 เท่า ด้วย diluent Buffer (0.3% (w/v) BSA ใน PBST ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 60 นาที ล้างเพลทด้วย PBST เติมสาร SureBlue Reserve™, TMB Microwell Peroxidase Substrate (KPL, USA) ที่ไวอุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 3 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 N HCl, Hydrochloric acid 37% (Merck, Germany) อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง TMB Microwell Peroxidase Substrate (KPL, USA) ได้ค่า FHA แอนติบอดี โดยโปรแกรมให้เครื่องคำนวณค่า FHA แอนติบอดี ของตัวอย่างเทียบค่ากับสารมาตรฐานที่ทราบค่า FHA แอนติบอดีให้อัตโนมัติ

การศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์^(10,11)

การทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) ทำการเจือจาง WHO Ref. 97/642 ที่มี Anti-FHA antibody ด้วย diluent buffer จากระดับความเข้มข้น 286,000 mIU/ml เป็น 4,000, 2,000, 1,000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81, 3.90, 1.95 mIU/ml ระดับความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ ตรวจหาปริมาณด้วยเทคนิค Indirect FHA ELISA และวิเคราะห์ข้อมูลโดย software ของเครื่อง Microplate reader infinite F200 Pro (Tecan, Switzerland) คำนวณค่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นแอนติบอดีกับค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้ความสมรูป (Equality) คือค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (goodness of fit with a coefficient of correlation (r)) ต้องมีค่ามากกว่า 0.95 และความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างค่าความเข้มข้นแอนติบอดีจริงกับค่าความเข้มข้นแอนติบอดีที่วัดได้ โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ (coefficient of determination (r^2)) ต้องมีค่ามากกว่า 0.95

ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation; LOQ) จากการทดสอบความเป็นเส้นตรง สามารถอ่านค่าต่ำของขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (the lower limit of quantification (LLOQ)) และค่าสูงของขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (the upper limit of quantification (ULOQ)) พิจารณาจากความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ต่ำสุดและที่สูงสุด ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) ไม่เกิน 20% และค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%relative error (%RE)) อยู่ระหว่าง $\pm 20\%$ ของความเข้มข้นแอนติบอดีโดย %RE คำนวณได้จาก $\%RE = 100 \times (BC - NC) / NC$, BC = ความเข้มข้นที่คำนวณได้ และ NC = ความเข้มข้นจริง

พิสัย (Range) จากการทดสอบความเป็นเส้นตรงและขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ สามารถเลือกพิสัยช่วงที่เหมาะสมโดยพิจารณาจากความเข้มข้นของแอนติบอดีที่มีค่าอยู่ระหว่าง LLOQ และ ULOQ มีจำนวนค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐานอย่างน้อย 6 ค่า โดยค่า %CV ไม่เกิน 15% และค่า %RE ของความเข้มข้นแอนติบอดีมาตรฐานอยู่ระหว่าง $\pm 15\%$ ของความเข้มข้นแอนติบอดี

การทดสอบความจำเพาะ (Specificity) ทดสอบหาค่า Anti-FHA antibody ในตัวอย่าง

- ซีรัมหนูถีบจักรจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยวัคซีนความเข้มข้นต่าง ๆ ตามการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและการเตรียมซีรัมจากสัตว์ทดลองข้างต้น (High titer group, Medium titer group, Low titer group, Normal mouse serum) และ Diluent buffer ที่ความเจือจาง 1, 4, 16, 32, 64, 256, 1,024, 4,096 และ 16,384 เท่า
- แอนติบอดีมาตรฐาน: WHO Ref. 97/642 ที่มี Anti-FHA ความเจือจาง 64, 256, 1,024, 4,096 และ 16,384 เท่า

นำค่าดูดกลืนแสง (OD) แต่ละความเจือจางมาประเมินความสัมพันธ์ระหว่าง the specific signal to noise (S/N) ratio กับ Serum dilution โดยนำค่า OD ของ Diluent buffer ที่วัดได้ไปหารกับค่า OD ของตัวอย่างอื่น ๆ ซึ่ง S/N ratio จะแสดงความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ โดยซีรัมหนูถีบจักร High titer group, Medium titer group, Low titer group ที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วยวัคซีนควรแสดง antibody response ในระดับสูงกว่ากลุ่มควบคุม Normal mouse serum ที่แสดง antibody response ในระดับต่ำ และไม่ควรมี antibody response ใน Diluent buffer เนื่องจากไม่ได้ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยวัคซีน

การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) เจือจาง WHO Ref. 97/642 ที่มี anti-FHA ด้วย diluent buffer จากระดับความเข้มข้น 286,000 mIU/ml เป็น 1,000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 และ 15.62 mIU/ml ระดับความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ ต่อการทดสอบจำนวน 3 การทดสอบ นำผลการทดสอบมาคำนวณค่า %RE โดยค่า %RE ต้องอยู่ระหว่าง $\pm 20\%$ ⁽¹¹⁾ ของความเข้มข้นแอนติบอดี

การทดสอบความเที่ยง (Precision)

การวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกัน (Repeatability) ทำการทดสอบค่า Anti-FHA antibody titer ในตัวอย่างซีรัมหนูถีบจักรตามการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน การเตรียมซีรัมจากสัตว์ทดลองและการเจือจางซีรัมหนูถีบจักรข้างต้น คือ

High titer group, Medium titer group, Low titer group และ Normal mouse serum โดยทดสอบในวันและเวลาเดียวกันจำนวน 3 การทดสอบ จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณ %CV ซึ่งจะต้องมีค่าไม่เกิน 20%⁽¹¹⁾

การวิเคราะห์ซ้ำต่างวัน (Intermediated Precision) ทำการทดสอบค่า Anti-FHA antibody titer ในตัวอย่างซีรัมหนูถีบจักรตามการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน การเตรียมซีรัมจากสัตว์ทดลองและการเจือจางซีรัมหนูถีบจักรข้างต้น คือ High titer group, Medium titer group, Low titer group และ Normal mouse serum โดยทดสอบต่างวันและเวลาอย่างน้อย 3 ครั้ง ครั้งละ 1 การทดสอบ จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณ %CV ซึ่งจะต้องมีค่าไม่เกิน 20%⁽¹¹⁾

การทดสอบความทนของวิธี (Robustness) การทดสอบค่า Anti-FHA antibody titer ในตัวอย่างซีรัมตามการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน การเตรียมซีรัมจากสัตว์ทดลองและการเจือจางซีรัมหนูถีบจักรข้างต้น คือ High titer group, Medium titer group, Low titer group และ Normal mouse serum ด้วยผู้วิเคราะห์ 2 คน โดยทดสอบคนละ 3 การทดสอบ นำผลที่ได้จากทั้ง 2 คน มาคำนวณ %CV กำหนดเกณฑ์ยอมรับไว้ที่ %CV ไม่เกิน 20%⁽¹¹⁾

ผล

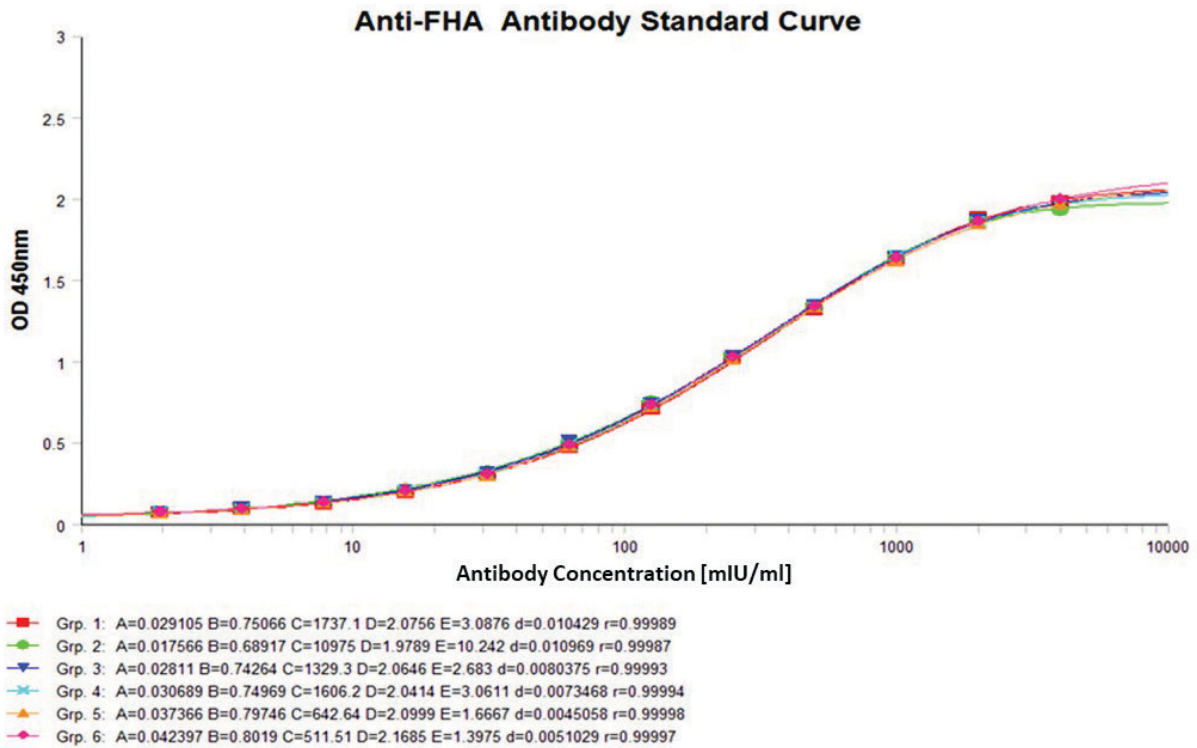
การศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงที่ระดับความเข้มข้น 4,000, 2,000, 1,000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81, 3.90 และ 1.95 mIU/ml ระดับความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ ได้ค่าความเข้มข้นของ anti FHA antibody เฉลี่ยของแต่ละระดับความเข้มข้นมีความลดหลั่นกันตามลำดับความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบจาก 3,782.45 ถึง 2.41 mIU/ml ดังแสดงในตารางที่ 1 และพบว่ามีค่า goodness of fit with a coefficient of correlation (r) เฉลี่ยจากกราฟแต่ละเส้นได้เท่ากับ 0.99993 ดังแสดงในภาพที่ 1 และมีค่า a coefficient of determination (r^2) เท่ากับ 0.9973 ดังแสดงในภาพที่ 2

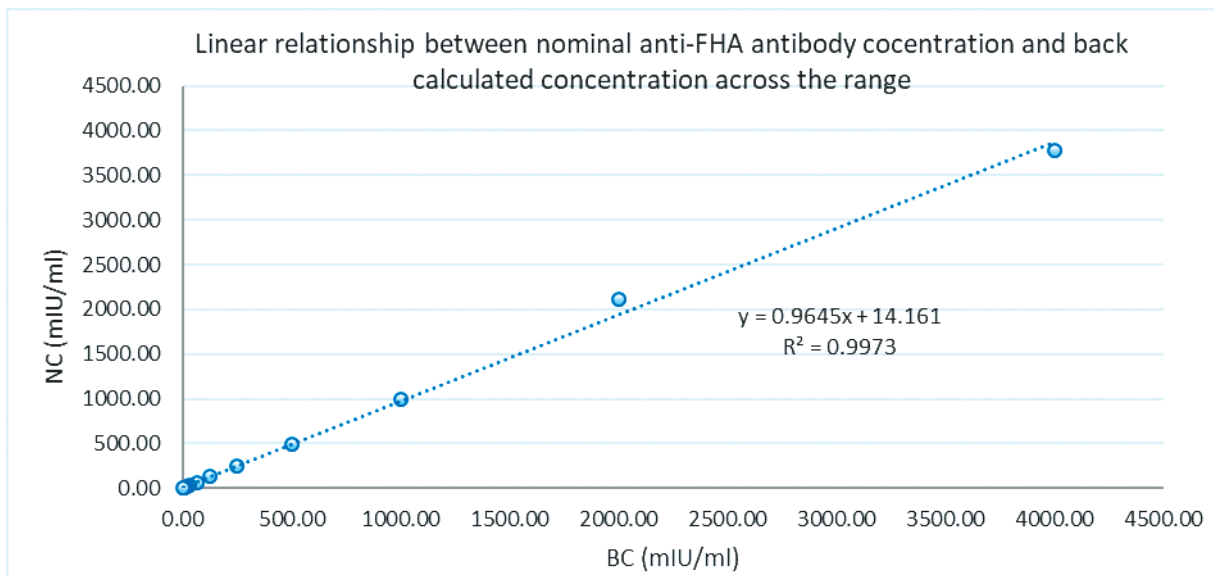
ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงด้วยเทคนิค Indirect FHA ELISA

No.	Nominal concentra- tion	Indirect FHA ELISA						Average (mIU/ml)	SD	%CV	%RE
		Back calculation anti FHA antibody centration (mIU/ml)									
		Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Rep5	Rep6				
1	4,000.00	3,715.5	3,539.3	3,800.1	3,849.8	3,885.2	3,904.8	3,782.45	137.10	3.62	-5.44
2	2,000.00	2,183.4	2,214.4	2,116.1	2,067.4	2,077.4	2,057	2,119.28	65.56	3.09	5.96
3	1,000.00	976.66	987.05	991.03	1004	987.96	1,002	991.45	10.19	1.03	-0.86
4	500.00	484.19	482.72	489.46	490.12	496.16	489.61	488.71	4.80	0.98	-2.26
5	250.00	257.18	252.5	250.93	247.58	250.12	250.92	251.54	3.20	1.27	0.62
6	125.00	126.79	129.54	126.83	130.38	126.54	127.8	127.98	1.61	1.26	2.38
7	62.50	63.321	64.199	65.114	62.957	63.302	62.483	63.56	0.95	1.49	1.70
8	31.25	29.782	29.385	29.817	29.718	30.04	29.987	29.79	0.23	0.78	-4.68
9	15.63	14.936	14.72	14.587	15.208	15.648	15.792	15.15	0.49	3.25	-3.08
10	7.81	7.218	7.0903	7.1835	7.3313	7.631	7.7302	7.36	0.26	3.52	-5.71
11	3.91	3.9943	4.0776	4.2254	3.9511	3.8807	3.8726	4.00	0.13	3.35	2.31
12	1.95	2.6113	2.5523	2.4327	2.4675	2.2154	2.1518	2.41	0.18	7.64	23.34

Rep. = การทดสอบซ้ำ



ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Anti-FHA กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm (Linear Relationship of Indirect FHA ELISA)

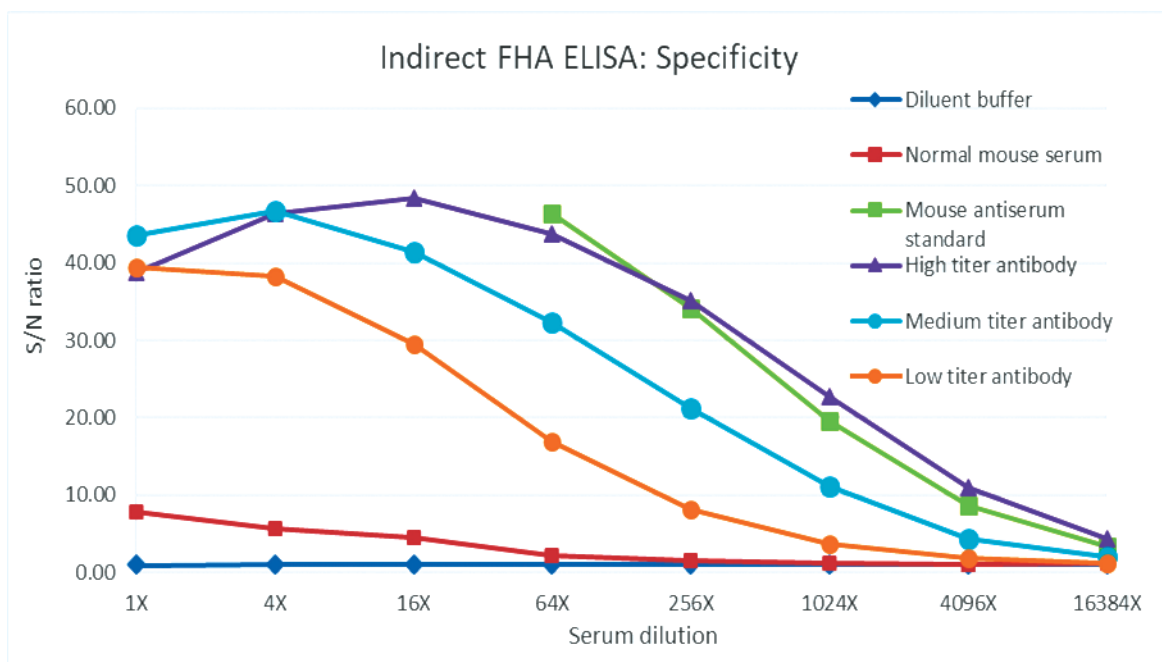


ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่าง nominal anti-FHA antibody concentration (NC) แกน Y กับค่า back calculated concentration (BC) แกน X

ค่า the lower limit of quantification (LLOQ) และ the upper limit of quantification (ULOQ) พิจารณาจากตารางที่ 1 ได้ค่า LLOQ และค่า ULOQ เท่ากับ 3.91 mIU/ml (%CV = 3.35, %RE = 2.31) และ 4,000 mIU/ml (%CV = 3.62, %RE = -5.44) ตามลำดับ

จากการทดสอบความเป็นเส้นตรงและขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ พบว่าพิสัย (Range) มีช่วงที่เหมาะสมคือ 15.63 ถึง 1,000 mIU/ml โดยพิจารณาจากความเข้มข้นของแอนติบอดีที่มีค่าอยู่ระหว่าง LLOQ และ ULOQ ได้ค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน 7 ค่า คือ แอนติบอดีความเข้มข้นที่ 15.63, 31.25, 62.50, 125, 250, 500 และ 1,000 mIU/ml โดยมี %CV เท่ากับ 3.25, 0.78, 1.49, 1.26, 1.27, 0.98 และ 1.03 ตามลำดับ และมีค่า %RE เท่ากับ -3.08, -4.68, 1.70, 2.38, 0.62, -2.62 และ -0.86 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1

ผลการศึกษาความจำเพาะ (Specificity) ค่า Anti-PT antibody ซีรัมหนูถีบจักรที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วยวัคซีนกลุ่ม High titer group, Medium titer group, Low titer group และ Normal mouse serum เมื่อนำค่าดูดกลืนแสง (OD) แต่ละความเจือจางมาประเมินความสัมพันธ์ระหว่าง S/N ratio กับค่า Anti-FHA antibody ในแต่ละ Serum dilution พบว่าแสดงความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มตัวอย่างซีรัมหนูถีบจักร High titer group, Medium titer group, Low titer group ที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วยวัคซีน มีระดับ antibody response สูงกว่ากลุ่มควบคุม Normal mouse serum อย่างชัดเจน โดยกลุ่มควบคุม Normal mouse serum จะมี antibody response ในระดับต่ำ และไม่พบ antibody response ใน Diluent buffer ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง S/N ration กับ Anti-FHA antibody ใน Serum dilution

ผลการศึกษาความแม่นยำ (Accuracy) ที่ทดสอบ Anti-FHA ความเข้มข้น 15.63, 31.25, 62.50, 125, 250, 500 และ 1,000 mIU/ml จำนวน 3 การทดสอบ แสดงค่า %RE ของ Anti-FHA antibody เท่ากับ -0.36, 0.89, -1.34, 1.69, -0.80, -0.73 และ 0.64 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) โดยสรุปค่า %RE อยู่ระหว่าง $\pm 20\%$ ของความเข้มข้นแอนติบอดี

ตารางที่ 2 ค่า %RE ในการทดสอบความแม่นยำของวิธี

Standard Anti-FHA IgG antibody (mIU/ml)	Assay 1	Assay 2	Assay 3	Mean	SD	%CV	%RE
15.63	15.67	15.39	15.66	15.57	0.16	1.00	-0.36
31.25	31.45	31.76	31.38	31.53	0.20	0.63	0.89
62.50	61.04	62.58	61.37	61.66	0.81	1.31	-1.34
125.00	129.01	123.66	128.66	127.11	2.99	2.35	1.69
250.00	243.97	254.17	245.85	248.00	5.43	2.19	-0.80
500.00	505.92	500.11	504.92	503.65	3.11	0.62	0.73
1000.00	998.60	1017.10	1003.60	1006.43	9.57	0.95	0.64

ผลการศึกษาความเที่ยง (Precision) การวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกัน (Repeatability) ที่ทดสอบค่า Anti-FHA antibody titer ในตัวอย่างซีรัมกลุ่ม High titer, Medium titer, Low titer และกลุ่มควบคุม ในวันและเวลาเดียวกันอย่างน้อยจำนวน 3 การทดสอบ ได้ %CV เท่ากับ 2.30, 9.37, 10.93 และ 12.64 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3 ส่วนการวิเคราะห์ซ้ำต่างวัน (Intermediated Precision) ที่ทดสอบค่า Anti-FHA antibody titer ในตัวอย่างซีรัมกลุ่ม High titer, Medium titer, Low titer และกลุ่มควบคุม ต่างวันและเวลากันจำนวน 3 การทดสอบ ได้ %CV 2.36, 20.00, 13.59 และ 15.70 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4 โดยสรุป %CV มีค่าไม่เกิน 20%

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบ Repeatability

Anti-FHA indirect ELISA: Method validation – Precision (Repeatability)							
Sample name	Sample Dilution	Anti-FHA antibody titer (IU/ml)			Average (IU/ml)	SD	%CV
		Assay 1	Assay 2	Assay 3			
High titer mice sera	1,000X	375.79	345.52	333.15	351.49		
	2,000X	398.48	414.73	393.29	402.17		
	4,000X	414.72	459.12	467.99	447.28		
	8,000X	474.63	520.44	492.98	496.02		
	Mean	415.90	434.95	421.85	424.24	9.74	2.30
Medium titer mice sera	400X	111.28	118.07	121.22	116.86		
	800X	121.41	136.55	147.94	135.30		
	1,600X	130.96	165.63	155.99	150.86		
	3,200X	140.09	178.73	166.27	161.70		
	Mean	125.94	149.75	147.85	141.18	13.23	9.37
Low titer mice sera	150X	16.98	18.53	20.38	18.63		
	300X	19.45	23.55	25.32	22.77		
	600X	22.15	26.85	26.50	25.17		
	1,200X	26.16	30.79	32.89	29.95		
	Mean	21.18	24.93	26.27	24.13	2.64	10.93
Normal mice sera	50X	0.68	1.08a	0.81	0.74	0.09	12.64

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบ Intermediated Precision

Anti-FHA indirect ELISA: Method validation – Precision (Intermediated Precision)							
Sample name	Sample Dilution	Anti-FHA antibody titer (IU/ml)			Average (IU/ml)	SD	%CV
		Day 1	Day 2	Day 3			
High titer mice sera	1,000X	322.25	411.25	375.79	369.76		
	2,000X	401.82	441.00	398.48	413.77		
	4,000X	446.64	451.22	414.72	437.53		
	8,000X	482.53	423.19	474.63	460.12		
	Mean	413.31	431.67	415.90	420.29	9.93	2.36
Medium titer mice sera	400X	116.40	88.55	111.28	105.41		
	800X	137.50	93.71	121.41	117.54		
	1,600X	153.96	97.23	130.96	127.38		
	3,200X	160.90	92.15	140.09	131.04		
	Mean	139.49	92.91	125.94	119.45	23.96	20.00
Low titer mice sera	150X	15.46	16.23	16.98	16.22		
	300X	22.14	17.69	19.45	19.76		
	600X	24.02	17.42	22.15	21.19		
	1,200X	26.22	16.28	26.16	22.89		
	Mean	21.96	16.91	21.18	20.02	2.72	13.59
Normal mice sera	50X	0.85	1.18a	0.68	0.76	0.12	15.70

ผลการศึกษาความทนของวิธี (Robustness) จากผู้วิเคราะห์ 2 คน ได้ค่า Anti-FHA antibody titer ในตัวอย่างซีรัมกลุ่ม High titer, Medium titer, Low titer และกลุ่มควบคุม คนละ 3 การทดสอบ ได้ค่า %CV เท่ากับ 12.21, 19.68, 18.27 และ 17.82 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 5 โดยสรุป %CV มีค่าไม่เกิน 20%

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบ Robustness

Anti-FHA indirect ELISA: Method validation – Precision (Robustness)										
Sample name	Sample Dilution	Anti-FHA antibody titer (IU/ml)						Average (IU/ml)	SD	%CV
		Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6			
High titer mice sera	1,000X	322.25	411.25	375.79	322.48	299.20	298.31	338.21		
	2,000X	401.82	441.00	398.48	371.84	328.31	315.48	376.15		
	4,000X	446.64	451.22	414.72	417.26	340.63	329.48	399.99		
	8,000X	482.53	423.19	474.63	456.32	347.87	347.66	422.03		
	Mean	413.31	431.67	415.90	391.97	329.00	322.73	384.10	46.89	12.21

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบ Robustness (ต่อ)

Anti-FHA indirect ELISA: Method validation – Precision (Robustness)										
Sample name	Sample	Anti-FHA antibody titer (IU/ml)						Average (IU/ml)	SD	%CV
	Dilution	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6			
Medium titer mice sera	400X	116.40	88.55	111.28	111.55	81.88	74.46	97.35		
	800X	137.50	93.71	121.41	126.35	91.35	82.13	108.74		
	1,600X	153.96	97.23	130.96	134.74	114.52	89.23	120.11		
	3,200X	160.90	92.15	140.09	137.33	151.86	81.22	127.26		
	Mean	139.49	92.91	125.94	127.49	109.90	81.76	112.92	22.22	19.68
Low titer mice sera	150X	15.46	16.23	16.98	17.48	14.63	13.15	15.65		
	300X	22.14	17.69	19.45	22.13	17.34	14.74	18.92		
	600X	24.02	17.42	22.15	23.42	17.84	15.55	20.07		
	1,200X	26.22	16.28	26.16	27.59	18.46	12.55	21.21		
	Mean	21.96	16.91	21.18	22.66	17.07	14.00	18.96	3.46	18.27
Normal mice sera	50X	0.85	1.18	0.68	1.17	1.45	0.88	1.02	0.18	17.82

วิจารณ์

จากผลการศึกษาความถูกต้องวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดีต่อ FHA ในซีรัมหนูถีบจักรที่ฉีดวัคซีน aP โดย ELISA ทุกพารามิเตอร์มีผลเป็นไปตามเกณฑ์กำหนดของแต่ละพารามิเตอร์ แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ที่ทำการศึกษามีความถูกต้อง มีความแม่นยำ มีความจำเพาะเจาะจง สอดคล้องกับการศึกษาของผู้ผลิตวัคซีน aP ภายในประเทศ ถึงแม้ว่าผู้วิจัยใช้วัคซีนกระตุ้นระดับภูมิคุ้มกันในหนูถีบจักรจำนวนสามความเจือจาง (1/1, 1/6.25 และ 1/15.625) ส่วนผู้ผลิตวัคซีนใช้การกระตุ้นระดับภูมิคุ้มกันในหนูถีบจักรจำนวน 4 ความเจือจาง (1/1, 1/2.5, 1/6.25 และ 1/15.625) ผลการทดสอบที่ได้มีความสอดคล้องเป็นไปในแนวทางเดียวกันกับการทดสอบความถูกต้องของวิธีจากผู้ผลิต^{(6), (7)} เนื่องจากเป็นวิธีที่จำเพาะต่อผลิตภัณฑ์ มีการใช้สารมาตรฐานชนิดเดียวกัน สายพันธุ์สัตว์ทดลองที่ใช้เป็นสายพันธุ์เดียวกัน เครื่องมือและอุปกรณ์เหมือนกัน รวมถึงมีปัจจัยสิ่งแวดล้อมของการทดสอบคล้ายกัน ทำให้ผลการศึกษาที่ได้ไม่แตกต่างกัน สามารถนำไปใช้ทดสอบเพื่อควบคุมคุณภาพวัคซีน aP ได้ ในกรณีการศึกษาความทนของวิธี (Robustness) ใช้ผู้วิเคราะห์ 2 คน เนื่องจากข้อจำกัดของปริมาณซีรัมจากหนูถีบจักรที่นำมาศึกษาเหลือปริมาณน้อย ไม่พอทดสอบด้วยผู้วิเคราะห์ 3 คน อย่างไรก็ตามจะศึกษา robustness ในประเด็นอื่น ๆ เพิ่มเติมต่อไป เช่น อุณหภูมิ และช่วงระยะเวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยาการทดสอบที่แตกต่างกัน

การหาระดับแอนติบอดีเป็นขั้นตอนหนึ่งของการวัดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (Immunological activity) ที่เรียกว่า mouse immunogenicity test (MIT) ซึ่งเป็นวิธีการตรวจหาปริมาณแอนติบอดีในซีรัมของหนูถีบจักรที่กระตุ้นด้วยวัคซีน aP เพื่อใช้ในการประเมินความแรงของวัคซีน โดยต้องทดสอบเปรียบเทียบกับระดับแอนติบอดีต่อ FHA ในซีรัมหนูถีบจักรที่ฉีดวัคซีนตัวอย่างที่ต้องการทดสอบเทียบกับระดับแอนติบอดีต่อ FHA ในซีรัมหนูถีบจักรที่ฉีดวัคซีนอ้างอิงจำเพาะหรือวัคซีนควบคุม (a product-specific reference or control vaccine)⁽⁸⁾

การศึกษาคความถูกต้องของวิธีการวัดปริมาณแอนติบอดีต่อ FHA ในซีรัมหนูถีบจักรที่ฉีดวัคซีน aP ด้วย ELISA นี้ เมื่อนำไปทดสอบตัวอย่างวัคซีน Boostagen ที่ผู้ผลิตส่งตรวจเพื่อประกอบการขึ้นทะเบียนยาและควบคุมคุณภาพ

ก่อนจำหน่าย พบว่าความแรง FHA ผ่านเกณฑ์ตามข้อกำหนดของผลิตภัณฑ์ ดังแสดงในตารางที่ 6 และวิธีการทดสอบยังสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางพัฒนาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ความแรงต่อแอนติเจนอื่นในวัคซีนไอกรนไร้เซลล์ได้ รวมถึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการตรวจวิเคราะห์หาระดับภูมิคุ้มกันจากวัคซีนชนิดอื่นหรือระดับภูมิคุ้มกันจากมนุษย์ที่ได้รับวัคซีนชนิดต่าง ๆ

ตารางที่ 6 ความแรง FHA ในวัคซีน Boostagen

ปี พ.ศ.	รุ่นการผลิต	Relative potency of FHA		ข้อกำหนดของผลิตภัณฑ์
		สถาบันชีววัตถุ	ผู้ผลิตวัคซีน	
2559	A	0.79	1.39	≥ 0.5
2560	B	0.68	0.90	
	C	0.80	1.60	
2561	D	0.61	1.20	
2562	E	0.90	1.10	

สรุป

จากการประเมินความถูกต้องของวิธีการวัดปริมาณแอนติบอดีต่อ FHA ในซีรัมหนูถีบจักรที่ฉีดวัคซีน aP ด้วย ELISA ทำให้ได้วิธีวิเคราะห์ความแรงวัคซีนที่เป็นการวัดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (Immunological activity) ใช้เป็นคู่มือมาตรฐานการปฏิบัติงาน สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดีต่อ FHA ในวัคซีน aP ได้ถูกต้องแม่นยำ และนำไปใช้ทดสอบความแรง (Anti-FHA antibody titer determination) วัคซีน aP ที่ผลิตในประเทศตั้งแต่ปี 2559 จนถึงปัจจุบัน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่เป็นผู้สนับสนุนงบประมาณ และขอขอบคุณบริษัท ไบโอเนท เอเชีย จำกัด ที่ให้คำแนะนำ การสนับสนุน Antigen-FHA และตัวอย่างวัคซีน ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จ ลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. โรคไอกรน. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 13 ส.ค. 2563]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://ddc.moph.go.th/disease_detail.php?d=29.
2. Edwards KM, Decker MD. Pertussis vaccines. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA. Vaccines. 6th ed. Philadelphia, PA: W.B. Saunders; 2013. p. 447-492.
3. สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. สถานการณ์โรคปีปัจจุบัน. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 13 ส.ค. 2563]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <http://www.boe.moph.go.th/boedb/surdata/disease.php?dcontent=situation&ds=24>
4. กุลกัญญา โชคไพบูลย์กิจ, และคณะบรรณาธิการ. ตำราวัคซีนและการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรค ปี 2556. นนทบุรี: กองโรคป้องกันด้วยวัคซีน กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข; 2556.

5. กฎกระทรวงว่าด้วยการรับรองรุ่นการผลิตยาแผนปัจจุบันที่เป็นยาชีววัตถุ พ.ศ. 2553. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 127 ตอนที่ 66 ก (วันที่ 3 พฤศจิกายน 2553). หน้า 7-9.
6. European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care. European pharmacopoeia 8.0: assay of pertussis vaccine (acellular). Nördlingen: Druckerei; 2014. p. 252-255.
7. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Q2(R1) Validation of analytical procedures: text and methodology. Geneva: ICH Steering Committee; 2005.
8. WHO Expert Committee on Biological Standardization, sixty-second report. WHO technical report series No. 979. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2013. p. 205-206, 241-244.
9. เยาวลักษณ์ ชนะหาญ. ไบโอมเท-เอเชีย จากผู้ผลิตวัคซีนไทยสู่ฐานวิจัยพัฒนาในยุค “ประเทศไทย 4.0”. วารสารส่งเสริมการลงทุน 2560; 28(5): 18-23.
10. Rappuoli R, Pizza M, Covacci A, Bartoloni A, Nencioni L, Podda A, et al. Recombinant acellular pertussis vaccine--from the laboratory to the clinic: improving the quality of the immune response. FEMS Microbiol Immunol 1992; 5(4): 161-70.
11. United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). Guidance for the validation of analytical methodology and calibration of equipment used for testing of illicit drugs in seized materials and biological specimens. New York: United Nations; 2009.

Analytical Method Validation of ELISA for Quantification of Mouse Antibody Titer Against Filamentous Haemagglutinin of Acellular Pertussis Vaccine

Apichai Supasansatorn Ratchanon Rakcheep Assjan Amen Wereyamarst Jaroenkunathum and Supaporn Phumiamorn

Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Acellular pertussis vaccine produced in Thailand contains filamentous haemagglutinin (FHA) whose potency needs to be controlled. This study aims to develop an analytical method to quantify a mouse antibody titer against FHA using the ELISA. The method showed a specificity detection of anti-FHA antibody titer in the vaccine test group compared with the control group. The linearity in concentrations ranged from 1.95 to 4,000 mIU/ml, the coefficient of correlation(r) was greater than 0.99. The limit of quantification ranged from 3.91 to 4,000 mIU/ml. The range of anti-FHA titer was between 15.625 and 1,000 mIU/ml. Its accuracy showed a percentage relative error between -1.34% and 1.69%. Its precision varied from 2.23% to 20.00% of variance coefficient (%CV). The %CV of the robustness of the assay was 12.21–19.68%. The data demonstrate that the method is reliable and suitable for use as a standard method for the potency assay against FHA in acellular pertussis vaccine.

Keywords: Acellular pertussis vaccine, Potency, Anti-FHA, ELISA

กรณีศึกษา: การสอบสวนผู้ป่วยและผู้เสียชีวิต โรคmelioidosis จังหวัดสงขลา มกราคม 2563

หทัยทิพย์ จุทอง อารีย์ ตาหมาด และนัจมี หลีสหัต

สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 12 สงขลา กรมควบคุมโรค อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา 90000

บทคัดย่อ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อยืนยันการวินิจฉัย ศึกษาสาเหตุการป่วยและการเสียชีวิต ปัจจัยเสี่ยง พฤติกรรมเสี่ยง และหามาตรการป้องกันควบคุมโรค ทำการศึกษาในพื้นที่จังหวัดสงขลา ค้นหาผู้ป่วยโดยการทบทวนเวชระเบียน เก็บตัวอย่างดินและเลือดสัตว์ส่งตรวจยืนยัน ผลการศึกษา พบผู้ป่วยยืนยันโรคmelioidosis 4 ราย ที่มีเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ใน 4 อำเภอ คือ อำเภอเมือง จะนะ สะบ้าย้อย และควนเนียง อำเภอละ 1 ราย มีผู้เสียชีวิต 3 ราย ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างผู้ป่วยแต่ละราย ปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรค ได้แก่ เพศชาย กลุ่มวัยสูงอายุมากกว่า 60 ปี โรคร่วมหรือภาวะที่เอื้อต่อการติดเชื้อและเสียชีวิต คือ โรคเบาหวาน ความดันโลหิตสูง โรคธาลัสซีเมีย สาเหตุการติดเชื้อไม่สามารถระบุได้แน่ชัด สันนิษฐานว่าอาจเป็นเพราะมีพฤติกรรมเสี่ยงโดยสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนเชื้อในดินและน้ำ ขณะประกอบอาชีพ ทำกสิกรรมประจำวัน โดยปราศจากอุปกรณ์ป้องกัน ผลการตรวจสิ่งแวดล้อมพบเชื้อในดินที่อำเภอสะบ้าย้อย เจ้าหน้าที่สาธารณสุขทุกระดับจึงควรให้ความสำคัญในการควบคุมป้องกันโรคในประชาชนกลุ่มเสี่ยง เช่น ผู้ป่วยโรคเบาหวาน โรคไตวายเรื้อรัง เกษตรกรที่ต้องสัมผัสกับดินและน้ำเนื่องจากเป็นโรคที่มีอัตราตายสูง

คำสำคัญ: ผู้เสียชีวิต, โรคmelioidosis, สงขลา

Corresponding author E-mail: hataitipju@gmail.com

Received: 8 April 2020

Revised: 9 October 2020

Accepted: 18 January 2021

บทนำ

โรคmelioidosis เป็นโรคติดเชื้อแบคทีเรียซึ่งไม่มีอาการจำเพาะหรืออาจไม่มีอาการทางคลินิก จนถึงมีเนื้อตาย แผล ฝีหนองที่ปอด ตับ หรือม้าม และหรือมีการติดเชื้อทางกระแสโลหิตอย่างรวดเร็ว สาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia pseudomallei* (*Pseudomonas pseudomallei*) วิธีการติดต่อโดยทั่วไปสามารถติดต่อจากการสัมผัสกับดินหรือน้ำผ่านทางแผลที่ผิวหนัง หรือหายใจรับฝุ่นจากดิน หรือดื่มน้ำที่มีเชื้อเจือปน เชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia pseudomallei* สามารถอยู่ได้ในซากสัตว์ที่อยู่ในดินและน้ำ การเกิดโรคระยะฟักตัวอาจสั้นเพียง 2 วัน หรือเป็นปีขึ้นอยู่กับระยะการติดเชื้อและการแสดงอาการของโรค อาจพบได้หลายรูปแบบแบ่งเป็น 3 แบบใหญ่ๆ คือ อาการมีไข้หนาวสั่นไม่ทราบสาเหตุ อาการของการติดเชื้อเฉพาะที่ส่วนใหญ่พบการติดเชื้อที่ปอดทำให้มีอาการปอดบวม ฝีในตับ ฝีในกระดูก หรือเป็นเพียงฝีที่ผิวหนัง การติดเชื้อในกระแสโลหิต (septicemic melioidosis) เชื้อจะกระจายเข้าสู่กระแสเลือดไปทั่วร่างกาย ผู้ป่วยจะมีอาการรุนแรงและเสียชีวิตอย่างรวดเร็ว ประเทศทางแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และทางเหนือของทวีปออสเตรเลียเป็นบริเวณที่มีโรคชุกชุม (endemic area) และสามารถตรวจพบโรคนี้ได้บ้างในฮ่องกง ไต้หวัน อินเดีย นิวซีแลนด์ และประเทศอื่นๆ ทั่วโลก ในประเทศไทยพบผู้ป่วยได้ทุกภาคทั่วประเทศ แต่พบมากทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยเฉพาะอย่างยิ่งจังหวัดขอนแก่นและอุบลราชธานี ผู้ป่วยส่วนใหญ่ร้อยละ 60 - 95 เป็นชาวไร่ชาวนาหรือผู้ที่ทำงานสัมผัสกับดินและน้ำ พบผู้ป่วยมากในฤดูฝน มีรายงานการติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) ผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นบุคคลที่มีปัจจัยเสี่ยง เช่น โรคติดเชื้อทางเดินหายใจเรื้อรัง วัณโรค เบาหวาน โรคไต โรคเลือด มะเร็ง และภาวะบกพร่องทางภูมิคุ้มกัน เป็นต้น เด็กเป็นโรคนี้น้อยกว่าผู้ใหญ่ จากการคาดคะเนคิดว่าจะมีผู้ป่วยมากกว่าปีละ 2,000 รายในประเทศไทย แต่ขาดการศึกษายืนยันและไม่มีการรายงานในผู้ป่วยส่วนมาก จากการสำรวจระดับแอนติบอดีต่อเชื้อของคนปกติในภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบมีการติดเชื้อ (seroprevalence) ประมาณร้อยละ 20⁽¹⁾

ข้อมูลเฝ้าระวังโรคกองระบาดวิทยากรมควบคุมโรค ปีพ.ศ. 2562 พบผู้ป่วย 2,810 รายจาก 63 จังหวัด อัตราป่วย 4.23 ต่อแสนประชากร เสียชีวิต 19 ราย อัตราตาย 0.03 ต่อแสนประชากร อัตราส่วนเพศชายต่อเพศหญิง 1:0.52 กลุ่มอายุที่พบมากที่สุด คือ 55-64 ปี อาชีพส่วนใหญ่เกษตรกรร้อยละ 45.5 จังหวัดที่มีอัตราป่วยต่อแสนประชากรสูงสุด คือ อำนาจเจริญ 31.69 ต่อแสนประชากร⁽²⁾

ตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม-31 ธันวาคม 2562 สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 12 สงขลา ได้รับรายงานผู้ป่วยโรคmelioidosis จากสำนักงานสาธารณสุข 7 จังหวัดภาคใต้ตอนล่างจำนวน 34 ราย อัตราป่วย 0.76 ต่อประชากรแสนคน มีผู้เสียชีวิต 5 ราย อัตราตาย 0.11 ต่อประชากรแสนคน อัตราผู้ป่วยตาย ร้อยละ 14.71 อาชีพรับจ้างมีจำนวนผู้ป่วยสูงสุด ร้อยละ 36.67 จังหวัดที่มีอัตราป่วยต่อประชากรแสนคนสูงสุด คือ จังหวัดสงขลา อัตราป่วย 1.80 ต่อประชากรแสนคน กลุ่มอายุที่มีอัตราป่วยสูงสุด คือ กลุ่มอายุ 55-64 ปี อัตราป่วย 3.77 ต่อประชากรแสนคน⁽³⁾

วันที่ 6 มกราคม 2563 ทีมตระหนักรู้ สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 12 สงขลา ได้รับแจ้งจากทีมสอบสวนเคลื่อนที่เร็ว สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดสงขลา มีผลการตรวจยืนยันทางห้องปฏิบัติการโดยวิธีเพาะเชื้อแบคทีเรียจากเลือด (Blood Hemoculture) ของโรงพยาบาลหาดใหญ่และสงขลา พบเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ในผู้ป่วยเพศชาย 4 ราย เสียชีวิต 3 ราย ทีมสอบสวนเคลื่อนที่เร็ว สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 12 จังหวัดสงขลา ได้ลงสอบสวนโรคและควบคุมโรค ร่วมกับทีมสอบสวนเคลื่อนที่เร็ว สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดสงขลา ทีมสอบสวนเคลื่อนที่เร็วอำเภอเมือง อำเภอจะนะ อำเภอสะบ้าย้อย ระหว่างวันที่ 8-10 มกราคม 2563 เพื่อยืนยันการวินิจฉัยโรค ศึกษาลักษณะทางระบาดวิทยา ศึกษาสาเหตุและปัจจัยที่มีผลต่อการป่วยและการเสียชีวิต รวมถึงกำหนดมาตรการในการดูแลป้องกันรักษาที่เหมาะสม

วัสดุและวิธีการ

การศึกษาระบาดวิทยาโรคเมลิออยโดสิสเชิงพรรณนาโดยทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้องกับโรคเมลิออยโดสิสลงพื้นที่เพื่อค้นหาผู้ป่วยเพิ่มเติม สัมภาษณ์ผู้ใกล้ชิดผู้ป่วย การตรวจหาเชื้อจากสิ่งแวดล้อม

1. การค้นหาผู้ป่วยเพิ่มเติมในหมู่บ้าน

เก็บข้อมูลโดยการสัมภาษณ์ผู้ใกล้ชิดผู้ป่วย ได้แก่ ภรรยา และบุตร ด้วยแบบสอบถามจำนวน 8 ราย เฉพาะรายร่วมกับประวัติการรักษาตัวของผู้ป่วยจากโรงพยาบาลหาดใหญ่ โรงพยาบาลสงขลา จังหวัดสงขลา โดยใช้นิยามในการสอบสวนโรค ดังนี้

ผู้ป่วยเข้าข่าย (Probable case) คือ ผู้ที่อาศัยอยู่ในเขตหมู่ที่ 2 ตำบลจะแห่น อำเภอสะบ้าย้อย จังหวัดสงขลา หมู่ที่ 2 ตำบลนาทับ อำเภोजะนะ จังหวัดสงขลา และวินิจฉัยว่าป่วยด้วยโรคเมลิออยโดสิสที่รักษาในโรงพยาบาลหาดใหญ่และสงขลา ตั้งแต่วันที่ 1 ธันวาคม 2562 ถึง 8 มกราคม 2563

ผู้ป่วยยืนยัน (Confirmed Case) คือ ผู้ป่วยที่มีการยืนยันเชื้อเดียวกับผู้ป่วยเข้าข่าย ร่วมกับการตรวจเพาะเชื้อจากเลือดหรือสิ่งส่งตรวจต่าง ๆ พบเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*⁽⁴⁾

2. การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ทางห้องปฏิบัติการ

เก็บตัวอย่างดิน น้ำ และเลือดเพาะ ส่งตรวจห้องปฏิบัติการคณะสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

3. การศึกษาสิ่งแวดล้อมและแหล่งรังโรค

สำรวจสิ่งแวดล้อมที่ภูมิสำเนาของผู้ป่วยและผู้เสียชีวิต โดยสังเกตลักษณะของสุขภาพสิ่งแวดล้อม บ้านพักอาศัย สุขลักษณะของพื้นที่เลี้ยงสัตว์ ค้นหากิจกรรม พฤติกรรมเสี่ยง รวมทั้งการใช้อุปกรณ์ป้องกันตนเอง เช่น รองเท้าบูท ถุงมือ กรณีมีการสัมผัสดินหรือแหล่งน้ำขัง

4. การวิเคราะห์เพื่อค้นหาสาเหตุการเกิดโรค และดำเนินการมาตรการควบคุมป้องกันโรค

ทำการรวบรวมผลจากการสอบสวนโรคและข้อมูลรายงานการเฝ้าระวังโรคติดต่อ กองระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค เพื่อวิเคราะห์สาเหตุและจัดมาตรการควบคุมป้องกันโรค

วิเคราะห์ข้อมูล

ด้วยสถิติ จำนวน ร้อยละ และอัตรา

ผล

การศึกษาระบาดวิทยาเชิงพรรณนา

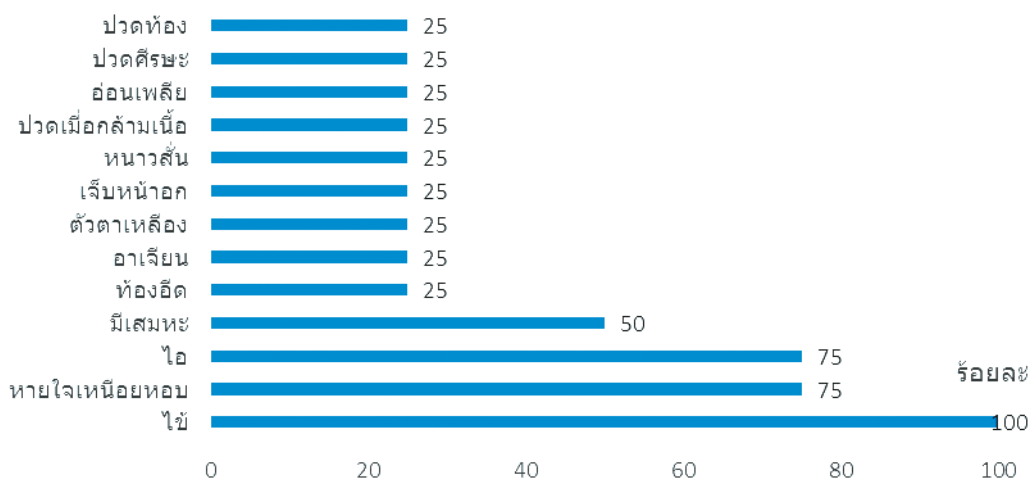
ผลการทบทวนเวชระเบียน จากข้อมูลของผู้ป่วยและผู้เสียชีวิตจำนวน 4 ราย เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลหาดใหญ่จำนวน 2 ราย โรงพยาบาลสงขลาจำนวน 2 ราย จากอำเภอสะบ้าย้อย จะนะ ควนเนียง และอำเภอเมืองอำเภอละ 1 ราย มีโรคประจำตัว คือ ความดันโลหิตสูง 2 ราย เบาหวาน 1 ราย และธาลัสซีเมีย 1 ราย สูบบุหรี่ 3 ราย ดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ 1 ราย อาชีพเกษตรกรกรรม 3 ราย ค้าขาย 1 ราย ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 รายละเอียดข้อมูลผู้ป่วยและผู้เสียชีวิตโรคเมลิออยโดสิสแต่ละรายที่รักษาโรงพยาบาลหาดใหญ่และสงขลา เดือนธันวาคม 2562 – มกราคม 2563

รายละเอียดผู้ป่วย	รายที่ 1	รายที่ 2	รายที่ 3	รายที่ 4
ข้อมูลทั่วไป				
: เพศ	เพศชาย	เพศชาย	เพศชาย	เพศชาย
: อายุ	อายุ 64 ปี	อายุ 65 ปี	อายุ 31 ปี	อายุ 63 ปี
: อาการสำคัญ	มีอาการไข้สูง	มีอาการไข้สูง	ถ่ายเหลว	มีอาการไข้สูง
: โรคประจำตัว	ความดันโลหิตสูง	ความดันโลหิตสูง	ธาลัสซีเมีย	เบาหวาน, ดีซ่าน
: อาชีพ	เกษตรกร	เกษตรกร	ค้าขาย	เกษตรกร
: สถานที่	สบบ้ายน้อย	จะนะ	เมือง	ควนเนียง
: ต้มสุรา	ไม่ดื่ม	ไม่ดื่ม	ไม่ดื่ม	ดื่ม
: สูบบุหรี่	สูบ	สูบ	ไม่สูบ	สูบ

ผู้ป่วยมารับการรักษาหลังเริ่มมีอาการป่วยนาน 1-10 วัน (ค่ามัธยฐาน 7 วัน) ระยะเวลาที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลเฉลี่ย 12 วัน (พิสัย 3-20 วัน) และพบว่าผู้ป่วยมีอาการและอาการแสดงที่พบมาก คือ เป็นไข้ ร้อยละ 100 หายใจเหนื่อยหอบ ร้อยละ 75 ไอ ร้อยละ 75 มีเสมหะ ร้อยละ 50 ท้องอืด อาเจียน ตัวตาเหลือง เจ็บหน้าอก หนาวสั่น ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ อ่อนเพลีย ปวดศีรษะ ร้อยละ 25 ดังแสดงในภาพที่ 1

อาการ



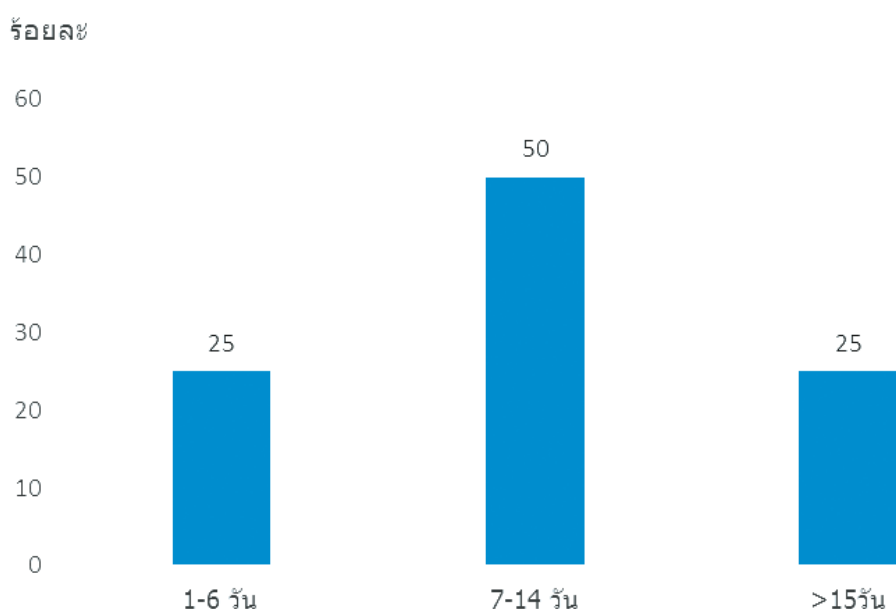
ภาพที่ 1 ร้อยละผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสิส จำแนกตามอาการที่รักษาโรงพยาบาลหาดใหญ่และสงขลา เดือนธันวาคม 2562 – มกราคม 2563

ข้อมูลการรักษาผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสิส ผู้ป่วยทุกคนใช้เครื่องช่วยหายใจ ได้รับการรักษาด้วยยา Ceftazidime จำนวน 2 ราย และยา Ceftriaxone จำนวน 2 คน ผลการตรวจด้วยเครื่องอัลตราซาวด์พบ Liver abscess จำนวน 2 ราย มีฝีอวัยวะภายใน 2 ราย อาการรุนแรงในผู้ป่วย คือ ผู้ป่วยทุกคนมีอาการติดเชื้อในกระแสเลือดและมีภาวะช็อก การวินิจฉัยครั้งแรกพบ Pneumonia จำนวน 3 คน อีก 1 คนเป็น Septicemia การวินิจฉัยสุดท้าย Melioidosis ทั้ง 4 ราย เสียชีวิต 3 ราย รักษาหาย 1 ราย ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 รายละเอียดข้อมูลการรักษาผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสิสแต่ละรายที่รักษาโรงพยาบาลหาดใหญ่และสงขลา เดือนธันวาคม 2562 - มกราคม 2563

รายละเอียดการรักษา	รายที่ 1	รายที่ 2	รายที่ 3	รายที่ 4
ยา	Ceftazidime	Ceftriaxone	Ceftriaxone	Ceftazidime
การใช้เครื่องช่วยหายใจ	ใช้เครื่องช่วยหายใจ	ใช้เครื่องช่วยหายใจ	ใช้เครื่องช่วยหายใจ	ใช้เครื่องช่วยหายใจ
การตรวจปอด	Wheezing both lung	wheezing bothlung with crepitation	-	minimal wheezing
อัลตราซาวด์	Liver abscess	-	-	Liver abscess
การวินิจฉัยครั้งแรก	Septicemia	Bacterial		
	Melioidosis	Pneumonia และSepsis	Bacterial Pneumonia	Pneumonia
การวินิจฉัยสุดท้าย		Melioidosis	Melioidosis	Melioidosis
อาการสำคัญ				
ติดเชื้อในกระแสเลือด	มี	มี	มี	มี
ภาวะช็อก	มี	มี	มี	มี
เสียชีวิตภายใน	มี	ไม่มี	ไม่มี	มี
ผลการรักษา	ตาย	ตาย	ตาย	หาย

ระยะเวลาที่มารับการรักษาของผู้ป่วยจำนวน 4 ราย ผู้ป่วย ร้อยละ 50 มารับการรักษาระหว่างวันที่ 7-14 วัน หลังจากมีอาการ รักษา 1-6 วัน ร้อยละ 25 และมารับการรักษาหลังมีอาการป่วยมากกว่า 15 วัน ร้อยละ 25 ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ร้อยละผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสิสจำแนกตามวันเริ่มป่วยถึงวันรับการรักษาโรงพยาบาลหาดใหญ่และสงขลา เดือนธันวาคม 2562 ถึงมกราคม 2563

พฤติกรรมเสี่ยง

ผู้ป่วยทุกคนไม่สวมอุปกรณ์ป้องกันอันตรายส่วนบุคคล เช่น ถุงมือ รองเท้าบูท หน้ากากปิดปากจมูก ขณะทำงานสัมผัสดิน น้ำ และมีบาดแผลจำนวน 2 คน ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ข้อมูลพฤติกรรมเสี่ยงผู้ป่วยโรคmelioidosisแต่ละรายที่รักษาที่โรงพยาบาลหาดใหญ่และสงขลา เดือนธันวาคม 2562-มกราคม 2563

ข้อมูลพฤติกรรมเสี่ยง	รายที่ 1	รายที่ 2	รายที่ 3	รายที่ 4
การใช้อุปกรณ์ป้องกันอันตรายส่วนบุคคล				
ขณะทำงาน				
ถุงมือ	ไม่ใช่	ไม่ใช่	ไม่ใช่	ไม่ใช่
รองเท้าบูท	ไม่ใช่	ไม่ใช่	ไม่ใช่	ไม่ใช่
หน้ากากปิดปากจมูก	ไม่ใช่	ไม่ใช่	ไม่ใช่	ไม่ใช่
มีบาดแผล	มี	มี	ไม่มี	ไม่มี

ข้อมูลสภาพแวดล้อมบริเวณบ้านผู้ป่วยมีการเลี้ยงแกะบริเวณบ้านจำนวน 1 คน รอบบ้านพื้นดินเปียกชื้นจำนวน 3 คน และดื่มน้ำบ่อจำนวน 1 คน ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ข้อมูลสภาพแวดล้อมบริเวณบ้านผู้ป่วยโรคmelioidosisแต่ละรายที่รักษาที่โรงพยาบาลหาดใหญ่และสงขลา เดือนธันวาคม 2562-มกราคม 2563

ข้อมูลสภาพแวดล้อม	รายที่ 1	รายที่ 2	รายที่ 3	รายที่ 4
เลี้ยงสัตว์บริเวณบ้าน	ใช่ (แกะ)	ไม่ใช่	ไม่ใช่	ไม่ใช่
รอบบ้านพื้นดินเปียกชื้น	ใช่	ใช่	ไม่ใช่	ใช่
ดื่มน้ำบ่อ	ใช่	ไม่ใช่	ไม่ใช่	ไม่ใช่

ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการของผู้ป่วยและผู้เสียชีวิตจำนวน 4 คน ตรวจพบเชื้อ *B. pseudomallei* จากการเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียจากเลือด (Hemoculture) ทั้งหมดจำนวน 4 ราย ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการยืนยันโดยวิธีการเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียจากเลือด (Hemoculture) ของผู้ป่วยที่แพทย์ให้การวินิจฉัยว่าเป็นหรือสงสัยว่าเป็นโรคmelioidosis จังหวัดสงขลา ธันวาคม 2562 (N=4)

ลำดับ	ผู้ป่วย	ผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีการเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียจากเลือด (Hemoculture)
1	ชายไทย 64 ปี (อ.สะบ้าย้อย)	<i>B. pseudomallei</i>
2	ชายไทย 65 ปี (อ.จะนะ)	<i>B. pseudomallei</i>
3	ชายไทย 31 ปี (อ.เมือง)	<i>B. pseudomallei</i>
4	ชายไทย 63 ปี (อ.ควนเนียง)	<i>B. pseudomallei</i>

ผลการตรวจตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมและเลือดแกะพบเชื้อ *B. pseudomallei* ในดินบริเวณทุ่งนาบ้านผู้ปวยในอำเภอสะบ้าย้อย และไม่พบเชื้อในตัวอย่างที่อื่น ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการสิ่งแวดล้อมโรคเมลิออยโดสิส จังหวัดสงขลา ธันวาคม 2562 (N=11)

สถานที่	ชนิดอย่างจำนวน	ผลการตรวจวิเคราะห์ (จำนวน)
อ.สะบ้าย้อย	ดิน (2)	<i>B. pseudomallei</i> (1) [บริเวณทุ่งนา]
	เลือดแกะ (3)	ไม่พบเชื้อ
อ.จะนะ	ดิน (1)	ไม่พบเชื้อ
	น้ำ (1)	ไม่พบเชื้อ
อ.เมือง	ดิน (4)	ไม่พบเชื้อ
อ.ควนเนียง	ไม่ได้เก็บตัวอย่าง	

วิจารณ์

โรคเมลิออยโดสิส นับเป็นปัญหาสาธารณสุขโรคหนึ่งของประเทศไทย เนื่องจากพบมีอัตราป่วยตายสูง โดยเฉพาะผู้ป่วยติดเชื้ออาการรุนแรงถึงเสียชีวิตในคนที่เป็นโรคเรื้อรัง เช่น โรคเบาหวาน โรคไต จากการสอบสวนครั้งนี้พบว่าผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษที่โรงพยาบาลสงขลาและหาดใหญ่ และได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคเมลิออยโดสิสมีจำนวนผู้ป่วย 4 ราย เสียชีวิต 3 ราย (อำเภอเมือง 1 ราย อำเภอจะนะ 1 ราย และอำเภอสะบ้าย้อย 1 ราย) สำหรับผู้ป่วยเสียชีวิตทั้ง 3 ราย ที่พบจากการสอบสวนเป็นผู้ป่วยยืนยันจากตรวจพบเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ในตัวอย่างเลือดด้วยวิธีการเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียจากเลือด (Hemoculture) มีประวัติเป็นโรคประจำตัว คือ ความดันโลหิตสูง 2 ราย และโรคธาลัสซีเมีย 1 ราย โรคเมลิออยโดสิสมีอัตราการเกิดโรคต่ำในภาคใต้ ทำให้แพทย์ผู้รับผิดชอบไม่ได้ตระหนักถึงในระยะแรก จึงให้การรักษาตามอาการและไม่ได้รับการรักษาด้วยการได้รับยาต้านจุลชีพ หลังจากรับไว้ในโรงพยาบาลเกิดภาวะ Septicshock จะเห็นว่าการตรวจโรคโดยการเพาะเชื้อจากเลือดในผู้ป่วยมีความสำคัญในการวินิจฉัยโรคนี้เป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อในกระแสเลือดมีอัตราการตายสูง โดยเฉพาะผู้ป่วยที่ได้รับยาต้านจุลชีพแล้วอาการไม่ดีขึ้นจึงมีความสำคัญในการวินิจฉัยว่าผู้ป่วยมีการติดเชื้อชนิดใด เพื่อประโยชน์ในการเลือกใช้ยาต้านจุลชีพที่เหมาะสมกับผู้ป่วย จากการศึกษาโรคเมลิออยโดสิส อาการที่พบบ่อยที่สุดในผู้ป่วย คือ ติดเชื้อในกระแสโลหิตพบร้อยละ 50-70 อัตราตายสูงร้อยละ 60-80⁽¹⁾ ดังนั้นการป้องกันการเสียชีวิตในผู้ป่วยสงสัยโรคเมลิออยโดสิสจำเป็นต้องเพิ่มความตระหนักถึงการติดเชื้อของผู้ป่วยที่ประกอบอาชีพเกษตรกรรม โดยเฉพาะในพื้นที่ที่เคยมีรายงานการพบผู้ป่วยและเสียชีวิตจากโรคเมลิออยโดสิส เมื่อพบผู้ป่วยที่มีอาการใช้ร่วมกับมีอาชีพทำนา เกษตรกรรม สัมผัสดิน โคลน แพทย์ควรตระหนักว่าอาจเป็นโรคเมลิออยโดสิสได้ โดยเฉพาะผู้ป่วยที่ปัสสาวะออกน้อย ปอดอักเสบ ภาวะไตวายเฉียบพลัน หากมีอาการดังกล่าวต้องรีบส่งต่อไปรับการรักษาที่โรงพยาบาลทั่วไป หรือโรงพยาบาลศูนย์ เนื่องจากอาจเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเสียชีวิตของผู้ป่วย เพราะเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* อยู่ในสภาพแวดล้อมได้ทุกที่ ประกอบกับการวินิจฉัยโรคทำได้ยากและมักจะล่าช้า ทำให้การรักษาล่าช้าไปด้วย ดังนั้นผู้ป่วยที่มีใช้ร่วมกับประวัติสัมผัสน้ำ ดิน หรือสัตว์ และตรวจไม่พบอาการที่จำเพาะของโรคใดโรคหนึ่ง แพทย์จึงควรสงสัยและให้การวินิจฉัย รวมทั้งให้การรักษาที่ครอบคลุมโรคเมลิออยโดสิสไว้ก่อน ปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคที่พบ ได้แก่ เพศชาย กลุ่มวัยแรงงานและอาชีพทำการเกษตรกรรมทำไร่ ทำสวน ที่ต้องสัมผัสกับดินเป็นเวลานาน ปัจจัยด้านโรคร่วมในผู้ป่วยติดเชื้อเมลิออยโดสิสที่มีผลต่อการป่วยมากที่สุด คือ โรคเบาหวาน โรคไต ส่วนปัจจัยด้านโรคร่วมในผู้ป่วยติดเชื้อเมลิออยโดสิสที่เสียชีวิต คือ ภาวะไตวาย และติดเชื้อในกระแสเลือด⁽¹⁾ การสอบสวนโรคครั้งนี้ไม่พบผู้ป่วยเพิ่มเติม

มาตรการควบคุมและป้องกันโรคที่เสนอแนะ

1. ให้ความรู้แก่คนในครอบครัวและเพื่อนบ้านผู้ป่วยในเรื่องของโรคเมลิออยโดสิส การติดต่อ อาการและอาการแสดง ปัจจัยเสี่ยงที่เกี่ยวกับการเกิดโรค และวิธีป้องกันโรค
2. เจ้าหน้าที่ในโรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลทุกแห่งเน้นให้ความรู้โดยเฉพาะกลุ่มเสี่ยง เนื่องจากผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นเกษตรกรที่ต้องสัมผัสดินและน้ำขณะทำงาน ผู้ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง ผู้ป่วยโรคเบาหวาน โรคเรื้อรัง หรือมีบาดแผลที่ผิวหนังควรหลีกเลี่ยงการสัมผัสดิน โดยสวมรองเท้าบูทขณะทำงาน ลุยโคลน เมื่อต้องสัมผัสดิน และน้ำ หรือรีบทำความสะอาดร่างกายหลังการทำงาน
3. เมื่อมีบาดแผลและเกิดมีไข้ หรือเกิดการอักเสบเรื้อรัง ควรรีบไปพบแพทย์
4. ประสานเครือข่ายการเฝ้าระวังทางห้องปฏิบัติการเพื่อติดตามและแจ้งรายงานผลชันสูตรทางห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาล เพื่อทราบผลการตรวจวิเคราะห์ได้รวดเร็ว และแจ้งพื้นที่หรือออกสอบสวนโรคหากพบการระบาดของโรค

สรุป

ผลการสอบสวนครั้งนี้ พบผู้ป่วยยืนยันโรคเมลิออยโดสิสตามนิยามของกองระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค จำนวน 4 ราย จาก 4 อำเภอ คือ อำเภอเมือง 1 ราย จะนะ 1 ราย สะบ้าย้อย 1 ราย และควนเนียง 1 ราย มีผู้เสียชีวิต 3 ราย ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างผู้ป่วยแต่ละราย และไม่มีผู้ป่วยรายอื่นในบ้านเดียวกันหรือในละแวกเดียวกัน ปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรค ได้แก่ เพศชาย กลุ่มวัยสูงอายุมากกว่า 60 ปี ที่มีโรคร่วมหรือภาวะที่เอื้อต่อการติดเชื้อและเสียชีวิต คือ โรคเบาหวาน ความดันโลหิตสูง และโรคธาลัสซีเมีย โดยสาเหตุของการติดเชื้อไม่สามารถระบุได้แน่ชัด แต่สันนิษฐานว่า อาจเป็นเพราะมีพฤติกรรมเสี่ยงโดยสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนเชื้อนี้กับดิน น้ำ ขณะประกอบอาชีพ ทำกิจวัตรประจำวัน โดยปราศจากอุปกรณ์ป้องกัน ผลการตรวจสิ่งแวดลอมพบเชื้อในดินอำเภอสะบ้าย้อย 1 ตัวอย่าง บริเวณทุ่งนา

ข้อจำกัดในการสอบสวนโรค

เนื่องจากเป็นกรณีศึกษาแบบย้อนหลัง (Retrospective Study) ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้เกิดอคติในการให้ข้อมูลของผู้ป่วย อีกทั้งโรคเมลิออยโดสิสมีระยะฟักตัวไม่แน่นอน ค่อนข้างยาว ทำให้ยากต่อการเก็บข้อมูล และอาจคลาดเคลื่อนจากความเป็นจริงได้ เช่น อาการป่วย วันเริ่มป่วย และปัจจัยโน้มนำต่อการเกิดโรค

ข้อเสนอแนะ

1. จัดทำคู่มือแนวทางเวชปฏิบัติโรคเมลิออยโดสิสให้กับบุคลากรด้านสาธารณสุขเพื่อใช้เป็นแนวทางในการเฝ้าระวังและรักษาผู้ป่วย
2. ควรมีการประชุมทบทวนสาเหตุการเกิดโรค อาการ การรักษา และการเสียชีวิตของโรคเมลิออยโดสิส

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นายแพทย์เฉลิมพล โอสถพรหม ผู้อำนวยการสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 12 จังหวัดสงขลา ที่มอบหมายให้เร็ว สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดสงขลา อำเภอเมือง จะนะ สะบ้าย้อย เจ้าหน้าที่โรงพยาบาลหาดใหญ่ สงขลา คณะสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ข้อมูลและให้ความร่วมมือในการดำเนินการสอบสวนโรคในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. ความรู้เรื่องโรคmelioidosis (Meliodosis หรือ melioidosis). [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 28 ม.ค. 2563]; [10 หน้า]. เข้าถึงได้: URL: https://www.melioidosis.info/download/general_melioidosis_th.pdf.
2. Melioidosis. ใน: สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค. กระทรวงสาธารณสุข. รายงานโรคในระบบเฝ้าระวัง 506. [ออนไลน์] 2563; [สืบค้น 28 ม.ค. 2563]; [1หน้า]. เข้าถึงได้: URL: http://www.boe.moph.go.th/boedb/surdata/506wk/y62/d72_5262.pdf.
3. สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 12 สงขลา. รายงานโรคในระบบเฝ้าระวัง 506 ตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม 2562-31 ธันวาคม 2562. สงขลา: สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 12 สงขลา; 2563.
4. สุริยะ คูหะรัถย์, บรรณาธิการ. นิยามโรคติดต่อประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์องค์การรับส่งสินค้าและพัสดุ; 2546.

An Investigation of Confirmed Melioidosis Case and Death in Songkhla Province January 2020

Hataitip juthong Aree Tamad and Nutjamee Leesahud

Office of Disease Prevention and Control 12 Songkhla, Department of Disease Control, Amphoe Mueang, Songkhla 90000, Thailand

ABSTRACT The objectives of the investigation were to verify the diagnosis, to study caused of illness and death, risk factors in environmental, risk behaviors, and to set the preventive measures. These were investigated by collecting patient information from medical record, soil and animal blood sample. The specimen were investigated by hemoculture method and the result shown that four patient have *Burkholderia pseudomallei*. Although three of them were death, they was not relation to each other because they lived sepately in Muang Songkhla district, Ja Na district, Sa Ba Yoi District, and Khuan Niang District for each. The presence of risk factors for infection consist of male age more than sixty years old with underlying disease such as diabetes, hypertension, and thalassemia. The cause of infection cannot exactly identify but could assume that it was cause of risk behavior such as contacting the environment that contaminated with soil and water without protective equipment. The result from environmental laboratory was found *Burkholderia pseudomallei* in soil at Sa Ba Yoi district. Preventive and control measure should focus on risk group such as farmer and gardener which contact soil and water. especialy who has following underlying diseaseas; diabetes, kidney disease, thalassemia.

Keywords : Death, Melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*,

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยาของกัญชา

ศรายุทธ ระดาพงษ์¹ พราว ศุภจริยาวัตร¹ และเมธิน ผดุงกิจ²

¹สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000

²คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150

บทคัดย่อ กัญชา (*Cannabis sativa L.*) เป็นพืชที่มีหลายสายพันธุ์ (varieties) และแต่ละสายพันธุ์มีลักษณะทางกายภาพแตกต่างกัน สารสำคัญกลุ่มหลักในกัญชา คือ แคนนาบินอยด์ โดยสารสำคัญ 2 ชนิด ที่มีรายงานวิจัยอย่างแพร่หลาย ได้แก่ Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) และ cannabidiol (CBD) สัดส่วนของสาร THC/CBD มีผลต่อการเสพติดและใช้เป็นเกณฑ์ในการจำแนกสายพันธุ์กัญชาได้ นอกจากนี้สารดังกล่าวมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลายและน่าสนใจดังนี้ THC และอนุพันธ์ มีฤทธิ์แก้ปวด โดยเฉพาะปวดจากโรคทางระบบประสาท กระตุ้นความอยากอาหารและลดอาการคลื่นไส้จากการใช้เคมีบำบัด ช่วยปกป้องและกระตุ้นการสร้างเซลล์สมอง ส่วน CBD มีฤทธิ์บรรเทาอาการลมชัก ลดอาการวิตกกังวลทั้งในเด็กกลุ่มอาการออทิสติก หรือในผู้ป่วยที่มีประวัติการเสพติดกัญชา ทั้ง THC และ CBD มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง อย่างไรก็ตามจากรายงานความเป็นพิษของกัญชา โดยเฉพาะสาร THC ก่อให้เกิดพิษเฉียบพลันและเรื้อรังในสัตว์ทดลองได้เมื่อได้รับสารในปริมาณสูงและระยะเวลานาน พบความผิดปกติในผู้เสพติดกัญชาเป็นระยะเวลานาน ได้แก่ ความผิดปกติของปอด หลอดเลือดหัวใจ และสูญเสียมวลกระดูก ในขณะที่ CBD ไม่พบรายงานความเป็นพิษหรือผลข้างเคียงร้ายแรงในการทดสอบทางคลินิก

คำสำคัญ : กัญชา, เภสัชวิทยา, พิษวิทยา

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

Received: 18 March 2020

Revised: 21 September 2020

Accepted: 24 January 2021

บทนำ

กัญชา (*Cannabis*, marijuana หรือ *Cannabis sativa* L.) เป็นพืชเสพติดที่มีการอนุญาตให้ใช้ทางการแพทย์ หรือเพื่อสันตินาการอย่างถูกกฎหมายในหลายประเทศ ปัจจุบันในประเทศไทยได้มีความพยายามจากหลายภาคส่วน ในการผลักดันให้มีการใช้ประโยชน์ทางการแพทย์จากกัญชาอย่างถูกกฎหมาย และได้มีการดำเนินการศึกษาวิจัย พัฒนา ผลิตภัณฑ์ ทดสอบความปลอดภัยและประสิทธิผลอย่างกว้างขวาง การสร้างองค์ความรู้เกี่ยวกับกัญชาเพื่อนำมาใช้ ประโยชน์จะต้องตระหนักถึงความรู้ในการจำแนกชนิดและสายพันธุ์ของกัญชาให้ถูกต้อง รวมถึงปัจจัยต่าง ๆ ของสภาวะ การปลูกและสิ่งแวดล้อมที่จะมีผลต่อการผลิตสารสำคัญ โดยเฉพาะสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ เช่น Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), cannabidiol (CBD) และอนุพันธ์ในกัญชา โดยสัดส่วนที่แตกต่างกันของสารทั้ง 2 ชนิด ในแต่ละ สายพันธุ์มีผลต่อฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหรือความเป็นพิษได้ ข้อมูลเหล่านี้นอกจากจะเป็นการสร้างองค์ความรู้ทางวิชาการแล้ว ยังสามารถใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนหรือควบคุมทางกฎหมายในอนาคตได้ บทความนี้มีวัตถุประสงค์ในการนำเสนอข้อมูล เบื้องต้นของกัญชา จากการสืบค้นรายงานการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ทั้งด้านพฤกษศาสตร์ พฤกษเคมี ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และพิษวิทยา โดยเน้นสารสำคัญ ได้แก่ THC, CBD และอนุพันธ์

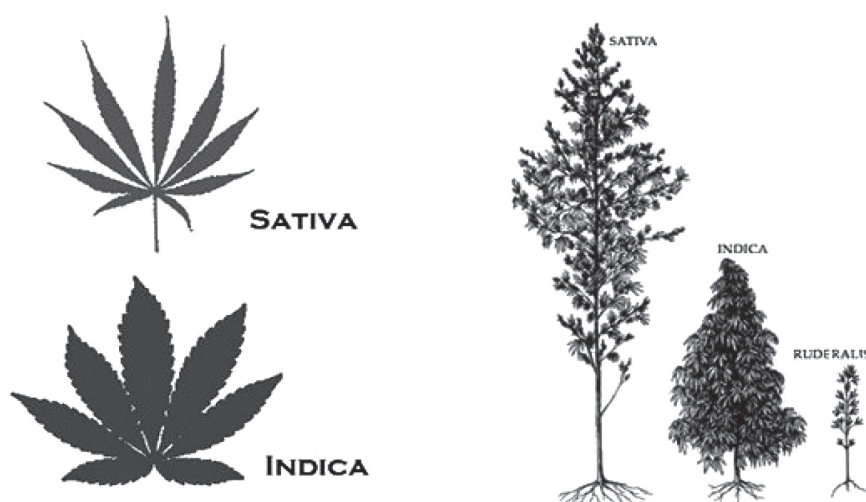
วิธีการสืบค้น

บทความนี้ได้สืบค้น รวบรวม และนำเสนอข้อมูลทั่วไปของกัญชา ซึ่งหมายความว่าทั้งกัญชาและกัญชง โดย เน้นด้านพฤกษเคมี เภสัชวิทยา และพิษวิทยาของกัญชา โดยเฉพาะ THC และ CBD โดยการค้นหาแบบสุ่มจากตำรา อ้างอิงภาษาไทย สื่อออนไลน์ที่น่าเชื่อถือ และจากวารสารตีพิมพ์ด้วยโปรแกรม SciFinder® (CAS, USA) โดยใช้ คำสำคัญ Cannabis, marijuana, *Cannabis sativa* L., botany, phytochemistry, pharmacology และ toxicology ระหว่างเดือนมกราคม พ.ศ. 2514 – กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2564

พฤกษศาสตร์ของกัญชา

กัญชาเป็นพืชในวงศ์ Cannabaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Cannabis sativa* L. subsp. *indica* (Lam.)⁽¹⁾ ความแปรผันทางพันธุกรรมจากสภาพแวดล้อม และการปรับปรุงสายพันธุ์โดยมนุษย์ ทำให้เกิดข้อถกเถียงของการจัด จำแนกและการตั้งชื่อวิทยาศาสตร์^(2,3,4) เนื่องจากแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างของปริมาณสารแคนนาบินอยด์ ซึ่งเป็น สารสำคัญของกัญชา 2 ชนิดหลักที่มีการกล่าวถึง คือ THC และ CBD นอกจากกัญชาในประเทศไทยยังพบ กัญชง หรือเฮมพ์ (Hemp) ซึ่งมีลักษณะทางพฤกษศาสตร์คล้ายคลึงกัน แต่มีความแตกต่างกันของปริมาณสารสำคัญ ตามประกาศคณะกรรมการควบคุมยาเสพติดให้โทษ เรื่อง กำหนดลักษณะกัญชง (Hemp) พ.ศ. 2562 ระบุว่า กัญชง เป็นชนิดย่อยของพืชกัญชาที่มีปริมาณสาร THC ในใบและช่อดอกไม่เกิน 1.0% ต่อน้ำหนักแห้ง กัญชงมีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Cannabis sativa* L. subsp. *sativa*^(1,5) เนื่องจากกัญชงมีปริมาณ THC ต่ำและมีเส้นใยสูง จึงมีการส่งเสริม ให้เป็นพืชเศรษฐกิจของไทยเกี่ยวกับสิ่งทอ อย่างไรก็ตามจากรายงานของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 เชียงใหม่ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พบว่าปริมาณสารสำคัญของกัญชงจะมีค่าแตกต่างกัน โดยปริมาณของ Δ^9 -THC และ CBD พบในช่วงตั้งแต่ร้อยละ 0.174 – 1.22 และ 0.324 – 0.58 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ โดยมีการผันแปรตามสภาพแวดล้อม อุณหภูมิ สายพันธุ์ รุ่น อายุการปลูก ช่วงเวลาที่ปลูกและเก็บเกี่ยว รวมทั้งพื้นที่เพาะปลูกที่มีความสูงจากระดับน้ำทะเล ที่แตกต่างกัน⁽⁶⁾ การวิเคราะห์เพื่อจำแนกสายพันธุ์ทางอนุชีววิทยาด้วยวิธีดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcoding) พบว่า ทั้งกัญชาและกัญชงถูกจัดให้เป็นพืชชนิด (species) เดียวกัน แต่มีความแตกต่างในระดับ sub-species หรือ variety เท่านั้น⁽⁴⁾ ซึ่งสามารถจำแนกสายพันธุ์ตามการปรับตัวเป็นพืชเลี้ยง (domestication traits) และสัดส่วนของ THC/CBD⁽¹⁾ The International Code of Nomenclature for Cultivated Plants (ICNCP) ยังไม่มีการให้ชื่อ ทางวิทยาศาสตร์และลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนระหว่างกัญชาและกัญชง⁽⁷⁾

กัญชามีลักษณะทางพฤกษศาสตร์เป็นไม้ล้มลุก ปีเดียว ลำต้นตั้งตรง สูง 0.9–1.5 เมตร มีขนสีเขียวอมเทา ใบเดี่ยว รูปฝ่ามือ เรียงสลับ ขอบใบเว้าลึกจนถึงจุดโคนใบเป็น 5–7 แฉก แต่ละแฉกรูปยาวรีกว้าง 0.3–1.5 เซนติเมตร ยาว 6–10 เซนติเมตร โคนและปลายใบสอบ (oblanceolate leaf) ขอบจักฟันเลื่อย แผ่นใบด้านบนสีเขียวเข้มกว่า ด้านล่าง ดอกแยกเพศต่างต้น ออกเป็นช่อกระจุกตามง่ามใบและปลายกิ่ง ช่อดอกและใบของต้นเพศผู้เรียงตัวกันห่างๆ ต่างจากต้นเพศเมียที่เรียงชิดกัน เกสรเพศผู้ 5 อัน ดอกเล็ก ดอกเพศเมียมีกลีบเลี้ยงหุ้ม ไม่มีกลีบดอก รังไข่อยู่เหนือวงกลีบ มี 1 ช่อง มีออวุล 1 เม็ด ผลแบบผลแห้งเมล็ดล่อน เล็ก เรียบ สีน้ำตาล ยอดของต้นเพศเมียที่กำลังออกดอกเรียก กะหล่ำกัญชา เมื่อตากให้แห้งแล้วนิยมนำมาใช้สูบ^(8,9) ส่วนกัญชงหรือที่เรียกว่า กัญชาเพศผู้ ลำต้นตั้งตรง สีเขียว สูงประมาณ 1–6 เมตร หรือมากกว่า มีลักษณะอวบน้ำ การเจริญเติบโตของต้นจะช้าในช่วง 6 สัปดาห์แรก หลังจากนั้นจะเพิ่มความสูงอย่างรวดเร็ว แตกกิ่งน้อยกว่ากัญชา ใบรียาว โคนใบมน (lanceolate leaf) เปลือกของลำต้นสามารถลอกออกเพื่อใช้ประโยชน์จากเส้นใย โดยเปลือกนอก (primary bast fibers) ให้เส้นใยที่ยาว เหนียว แต่ค่อนข้างหยาบ^(6,9) นอกจากนี้ในประเทศไทยยังสามารถพบกัญชาอีกหนึ่ง variety นั่นคือ *Cannabis sativa* var. *ruderalis* หรือ *Cannabis ruderalis* (Janisch.) มีลำต้นเตี้ย (โตเต็มที่ประมาณ 0.6 เมตร) เป็นพืชไม่แตกกิ่งหรือแตกกิ่งน้อย (apical dominance) และมีใบกว้าง มีต้นกำเนิดในเอเชียกลาง เป็นพันธุ์ที่พบตามธรรมชาติ (wild type) การเกิดดอกไม่ขึ้นกับแสง (auto-flowering) มีสัดส่วนของ THC และ CBD ใกล้เคียงกัน⁽¹⁰⁾ ความแตกต่างทางกายภาพของกัญชาทั้งสามสายพันธุ์ ดังแสดงในภาพที่ 1



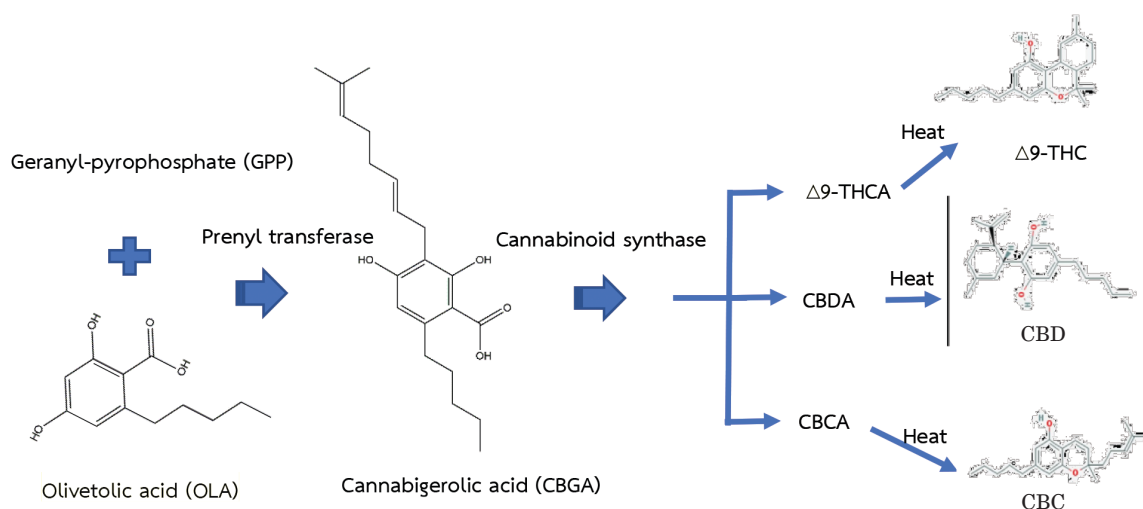
ภาพที่ 1 ลักษณะใบและความสูงของต้นที่เจริญเต็มที่ของกัญชาและกัญชง⁽¹⁰⁾

ปัจจุบันสารสำคัญในกัญชาถูกพบมากกว่า 545 ชนิด ในจำนวนนี้สารกว่า 100 ชนิด ที่ถูกระบุว่าเป็นไฟโตแคนนาบินอยด์ (phytocannabinoids) ซึ่งเป็นสารกลุ่มหลักที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา⁽¹¹⁾ โครงสร้างทางเคมีของแคนนาบินอยด์ประกอบด้วยส่วนที่เป็นไขมัน (lipid) อัลคิลเรสอร์ซินอล (alkylresorcinol) และเทอร์ปีน (terpenes)⁽¹²⁾ สารแคนนาบินอยด์ที่พบในกัญชาส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของ carboxylic acid เมื่อโดนแสงหรือความร้อนจะทำให้ถูก decarboxylated ให้อยู่ในรูปของ reduced form โดยสารสำคัญแคนนาบินอยด์ที่พบได้มากที่สุด คือ Δ^9 -THC และ CBD ส่วนสารสำคัญแคนนาบินอยด์ที่พบได้น้อยกว่า เช่น Δ^8 -THC, cannabinal (CBN)⁽⁶⁾ นอกจากสารกลุ่มแคนนาบินอยด์แล้ว ยังพบสารอื่นๆ อีกมากกว่า 400 ชนิด เช่น ฟลาโวนอยด์ เทอร์ปีนอยด์ อัลคาลอยด์ สเตียรอยด์ อัลเคน กรดไขมัน และน้ำตาล เป็นต้น^(13,14) ซึ่งสารสำคัญเหล่านี้มักพบได้มากในไตรโครม (trichomes) ของช่อดอกต้นเพศเมียมากกว่าช่อดอกต้นเพศผู้ เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์มีลักษณะคล้ายเส้นขนหรือดอกเห็ด แต่ถ้ามองด้วยตาเปล่าจะมีลักษณะคล้ายหยดน้ำค้างขนาดเล็กบนผิวช่อดอก ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ลักษณะของไตรโครม (trichomes) ของช่อดอกต้นเพศเมีย⁽¹⁴⁾

ชีวสังเคราะห์ของแคนนาบินอยด์เกิดจากปฏิกิริยาแอลคิลเลชัน (alkylation) ระหว่าง olivetolic acid (OLA) และ geranyl-pyrophosphate (GPP) โดยสร้าง cannabigerolic acid (CBGA) จากนั้น CBGA จะถูกเอนไซม์ cannabinoid synthase สร้างและสะสมสารที่เป็นกรด ได้แก่ Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid (Δ^9 -THCA), cannabidiolic acid (CBDA) และ cannabichromenic acid (CBCA) ก่อนที่จะถูก decarboxylated ด้วยความร้อนให้อยู่ในรูปแบบที่เป็นกลาง⁽¹⁵⁾ ซึ่งเป็นแคนนาบินอยด์สำคัญ ได้แก่ Δ^9 -THC, CBD และ cannabichromene (CBC) ดังแสดงในภาพที่ 3 ซึ่งพบว่ามีการศึกษาเพื่อใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ในปัจจุบัน⁽¹⁶⁾



ภาพที่ 3 การสังเคราะห์แคนนาบินอยด์หลักในกัญชา⁽¹⁴⁾

เภสัชวิทยาของกัญชา

กลไกการออกฤทธิ์ของกัญชาในเบื้องต้นต้องเข้าใจการทำงานของระบบเอนโดแคนนาบินอยด์ (endocannabinoid systems, ECS) ในร่างกายมนุษย์คือ ระบบประสาทควบคุม (neuromodulator) ซึ่งประกอบด้วย ตัวรับแคนนาบินอยด์ (cannabinoid receptors) โดยแคนนาบินอยด์ในร่างกาย (endocannabinoids) ที่มีการศึกษากันมาก คือ anandamide และ 2-arachidonoylglycerol (2-AG) และเอนไซม์ในการสร้างและกำจัดสารแคนนาบินอยด์ ซึ่งมีหน้าที่รักษาสสมดุลของร่างกายให้เป็นปกติ การทำงานของระบบประสาทและกระบวนการทางกายภาพ เช่น การตอบสนองต่อความปวด ความอยากอาหาร การนอน การอักเสบ การเรียนรู้และจดจำ การชัก

(อาการลมชัก) รวมถึงการทำงานร่วมกันของระบบอื่น เช่น ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ระบบสืบพันธุ์ เป็นต้น ตัวรับที่สำคัญ ได้แก่ cannabinoid receptor 1 และ 2 (CB1 และ CB2) โดย CB1 พบมากที่ระบบประสาทส่วนกลางในสมอง ในขณะที่ CB2 จะพบในสมองค่อนข้างน้อยกว่า ส่วนใหญ่จะกระจายตามระบบภูมิคุ้มกันและระบบหลอดเลือดทั่วร่างกาย โดยเฉพาะบริเวณที่เกิดการบาดเจ็บหรืออักเสบ สารสำคัญจากกัญชาส่วนใหญ่จะจับกับตัวรับทั้ง 2 ชนิด และส่งผลต่อระบบต่างๆ ของร่างกายขึ้นกับชนิดของแคนนาบินอยด์ ปริมาณ รูปแบบการบริหารสารและสภาพของร่างกาย โดย THC จะสามารถจับได้ดีกับ CB1 (agonist) จึงทำให้ออกฤทธิ์ต่อระบบจิตประสาทได้ในขณะที่ CBD จะไม่ได้เข้าจับกับ CB1 โดยตรง แต่จะขัดขวาง THC และทำให้ endocannabinoids ทำงานได้ตามปกติ CBD จะสามารถจับได้โดยตรงกับ CB2⁽¹⁷⁾ นอกจากนี้ยังมีตัวรับอื่น ๆ เช่น the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1), G protein-coupled receptors (GPR3, GPR6, GPR12, GPR55), peroxisome proliferator activated receptors (PPARs), opioid และ benzodiazepine ซึ่งสารจากกัญชาสามารถเข้าจับได้ ตัวอย่างอาการต่อร่างกายของสารแคนนาบินอยด์และตัวรับที่เกิดอันตรกิริยา ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 อาการต่อร่างกายของสารแคนนาบินอยด์และตัวรับที่เกี่ยวข้อง⁽¹⁴⁾

อาการ	แคนนาบินอยด์	อันตรกิริยาตัวรับ
ปวด (pain)	THC, CBD, CBC	CB1, CB2, TRPV1, GPR55, PPARs ^(18,19)
ภาวะคลื่นไส้อาเจียน (nausea and vomiting)	THC	CB1, CB2 ^(18,20)
โรคลมชัก (epilepsy)	THC, CBD	CB1, CB2 ⁽²¹⁾
ภาวะเบื่ออาหาร (anorexia)	THC	CB1, CB2 ⁽²⁰⁾
ความกังวล (anxiety)	CBD	CB2 ⁽²²⁾
โรคอัลไซเมอร์และพาร์กินสัน (Alzheimer and Parkinson)	THC, CBD	CB1, CB2, GPR3, GPR6, GPR12 ^(21,22)
มะเร็ง (cancer)	THC, CBD	CB1, CB2 ⁽²³⁾

ฤทธิ์ระงับปวด (analgesic effect) มีรายงานวิเคราะห์แบบอภิมาน (meta-analysis) ของกัญชารูปแบบต่างๆ ต่อผลของอาการปวด ได้แก่ ยา Nabiximols, ไอร์เซเหย THC, ไอร์เซเหยกัญชา, สารสังเคราะห์ที่เป็นอนุพันธ์ของ THC คือ Nabilone และ Dronabinol, สเปรย์สำหรับใช้กับเยื่อเมือกในช่องปาก (Oromucosal spray), กัญชาแคปซูล และ THC ที่ให้ทางปาก (oral THC) ทดสอบในผู้ป่วยที่มีอาการปวดเรื้อรังจำนวน 2,454 คน ซึ่งผู้ป่วยมีอาการปวดจากหลายสภาวะ ได้แก่ ปวดประสาท (neuropathic pain) ปวดจากมะเร็ง อาการปวดเส้นประสาทในผู้ป่วยเบาหวาน (diabetic peripheral neuropathy) ปวดกล้ามเนื้อ (fibromyalgia) ปวดจากติดเชื้อ HIV โรคปลอกประสาทเสื่อม (multiple sclerosis, MS) อาการอักเสบรูมาตอยด์ และอาการปวดจากเคมีบำบัด ผลโดยรวมพบว่ากัญชา มีฤทธิ์ในการบรรเทาอาการปวด อย่างไรก็ตามจากรายงานส่วนใหญ่ยังไม่มีผลแตกต่างกันเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม⁽¹⁸⁾ ยกเว้นในอาการปวดประสาท ผลทดสอบทางคลินิกกับผู้ป่วยมีอาการปวดจากโรคปลอกประสาทเสื่อมจำนวน 24 ราย โดยบริหารยา Dronabinol ทางปากขนาด 10 มิลลิกรัม/วัน หรือผู้ป่วยปวดประสาท ซึ่งได้รับยา THC/CBD (Sativex®) พบว่าสามารถลดอาการปวดได้อย่างมีนัยสำคัญ ช่วยให้นอนหลับดีขึ้น โดยไม่ต้องเพิ่มขนาดยาหรือเกิดความเป็นพิษในระยะเวลา 52 สัปดาห์ ในผู้ป่วย MS นอกจากจะมีอาการปวดแล้ว ยังพบอาการเกร็งตัวของกล้ามเนื้อ (spasticity) ร่วมด้วย พบว่าการให้ THC ขนาด 20-40 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน ช่วยบรรเทาอาการ

ทั้งสองอย่างได้ผล ยาชนิดนี้ปัจจุบันอนุญาตให้ใช้ได้บางประเทศเท่านั้น ได้แก่ แคนาดา สหราชอาณาจักร สวิตเซอร์แลนด์ นอร์เวย์ และตุรกี^(24, 25, 26)

จากรายงานการวิจัยทางคลินิก พบว่า THC และอนุพันธ์ 3 ชนิด ได้แก่ Nabilone, Dronabinol, Nabiximols (Sativex[®]) และ Levonantradol มีฤทธิ์ลดอาการคลื่นไส้อาเจียน (anti-emetic effect) ในผู้ป่วยจากการใช้เคมีบำบัดจำนวน 1,772 ราย ยาแคนนาบินอยด์ลดอาการคลื่นไส้อาเจียนได้เมื่อเปรียบเทียบกับยาหลอกหรือยาร่วม เช่น Prochlorperazine แต่ผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ⁽¹⁸⁾ ส่วนการศึกษาฤทธิ์ของแคนนาบินอยด์ต่อความอยากอาหาร (appetite stimulation) โดยใช้ Dronabinol ในผู้ป่วยเอดส์ (HIV/AIDS) พบว่าสามารถเพิ่มความอยากอาหารและเพิ่มน้ำหนักได้เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม⁽¹⁸⁾ ปัจจุบัน Dronabinol และ Nabilone เป็นยาแคนนาบินอยด์ที่มีกลไกคล้าย THC โดยยาดังกล่าวได้รับอนุญาตจากองค์การอาหารและยาสหรัฐอเมริกา (United State Food and Drug Administration, USFDA) ให้ใช้ในผู้ป่วยที่มีอาการวิงเวียน คลื่นไส้อาเจียนจากการใช้ยาเคมีบำบัด นอกจากนี้ยังมีหลักฐานการทดสอบ THC ต่อภาวะเบื่ออาหาร (anorexia) ในสัตว์ทดลอง พบว่า THC ลดการสูญเสียน้ำหนักของหนูบนล้อเลื่อน มีการเพิ่มปริมาณฮอร์โมน leptin และลดระดับฮอร์โมน corticosterone ในเลือดได้⁽²⁰⁾

ปัจจุบันมีรายงานเกี่ยวกับการใช้ CBD (Epidiolex[®]) ขนาด 5 – 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน ในผู้ป่วยลมชัก (epilepsy) ที่เป็นเด็ก 72 ราย และผู้ใหญ่ 60 ราย ระยะเวลาทดสอบ 48 สัปดาห์ พบว่าสามารถลดความรุนแรงและความถี่ของอาการชักได้โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ภายในระยะเวลา 12 สัปดาห์ หลังจากนั้นผลค่อนข้างคงที่ แต่ไม่มีความแตกต่างกันของผลการทดลองระหว่างอาการในเด็กและผู้ใหญ่ และพบว่าขนาดของ CBD ในระยะเวลาทดสอบมีความปลอดภัย⁽²¹⁾ นอกจากนี้ยังมีข้อมูลที่น่าสนใจเกี่ยวกับการทดสอบ CBD ในเด็กกลุ่มอาการออทิสติก (Autism spectrum disorder, ASD) จำนวน 60 ราย โดยทดสอบแบบปิดทั้งสองด้าน (double blind) เมื่อบริหารยา CBD (CBD:THC = 20:1) 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน พบว่ายาดังกล่าวช่วยพัฒนาการสื่อสาร ลดความเครียด ความกังวล และพฤติกรรมก่อกวน (disruptive behavior) ได้อย่างชัดเจน⁽²¹⁾ ปัจจุบัน Epidiolex[®] ซึ่งมี CBD เป็นส่วนประกอบหลักร้อยละ 99 และ สาร THC ร้อยละ 0.1 ได้รับอนุญาตจาก USFDA ให้ใช้ในโรคลมชักที่พบได้น้อยแต่มีความรุนแรง 2 ชนิด ได้แก่ Lennox-Gastaut syndrome และ Dravet syndrome สำหรับเด็กอายุ 2 ขวบ ขึ้นไป^(25, 27)

นอกจากผู้ป่วย ASD แล้ว ยังสามารถใช้ในผู้ป่วยที่มีอาการกังวลได้ เนื่องจากกัญชามี THC เป็นส่วนประกอบหลักและมีฤทธิ์ต่อจิตประสาท จากรายงานการให้ Nabilone ขนาด 1 มิลลิกรัม จำนวน 2 ครั้ง/วัน ติดต่อกันนาน 28 วัน สามารถคลายกังวลได้อย่างมีนัยสำคัญ ข้อมูลที่น่าสนใจเพิ่มเติม คือ มีการให้ CBD ซึ่งไม่มีฤทธิ์เสพติด ขนาด 400–600 มิลลิกรัม ในผู้ป่วยที่มีภาวะกังวลทั่วไป (generalized social anxiety disorder) พบว่าขนาดดังกล่าวคลายกังวลได้โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) นอกจากนี้ CBD ยังสามารถคลายกังวลของผู้ป่วยที่มีภาวะกังวลจากการได้รับ THC ซึ่งมีประวัติการใช้กัญชาอีกด้วย⁽²²⁾

ผลของแคนนาบินอยด์ต่อการใช้ประโยชน์ในกลุ่มที่มีอาการเสื่อมของประสาทหรือปกป้องประสาท (Neurodegeneration and neuroprotection) เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) หรือโรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) จากผลการทดสอบในสัตว์ทดลอง พบว่าแคนนาบินอยด์มีฤทธิ์ปกป้องการตายและการถูกทำลายของเซลล์สมองจาก Amyloid beta ($A\beta$) มีข้อมูลสนับสนุนว่า THC ขนาดต่ำสามารถกระตุ้นการสร้างเซลล์สมองในส่วนของฮิปโปแคมปัส และเพิ่มความสามารถในการรับรู้ (cognition) ในหนูสูงอายุได้^(28, 29) การอักเสบของสมองเป็นสาเหตุหลักอย่างหนึ่งของการเกิดโรคอัลไซเมอร์ มีรายงานเพิ่มเติมการกระตุ้น CB2 receptor ด้วยอนุพันธ์ JWH-133 (Tocris Bioscience[®]) ขนาด 0.20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ในหนูถีบจักร (mice) พบว่าช่วยลดอาการอักเสบ ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) ลดการถูกทำลายของสมองส่วนความจำได้⁽³⁰⁾

การใช้กัญชาในการรักษาโรคมะเร็งเป็นอีกโรคหนึ่งที่นักวิจัยและประชาชนให้ความสนใจ มีงานวิจัยจากการควบคุม ECS ทำให้มีผลต่อฤทธิ์ต้านมะเร็ง จากการรวบรวมงานวิจัยเชิงโมเลกุล พบว่าสาร THC CBD และอนุพันธ์แคนนาบินอยด์ เช่น CBC หรือ CBG รวมถึงสารฟลาโวนอยด์ เช่น apigenin, chrysoeriol, kaempferol, luteolin, quercetin, vitexin และ cannflavins เป็นต้น มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งเต้านม (breast cancer cells) มะเร็งต่อมลูกหมาก (prostate cancer) มะเร็งตับ (hepatocarcinoma) มะเร็งปอด (lung cancer) มะเร็งเม็ดเลือดขาว (lymphocyte leukemia cells) มะเร็งตับอ่อน (pancreatic cells) และมะเร็งผิวหนัง (melanoma cells) โดยผ่านกลไกเพิ่มการแสดงออกของ CB1 และ CB2 receptors^(13, 23) การทดสอบในสัตว์ทดลองยังแสดงให้เห็นว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ (proliferation) กระตุ้นโปรแกรมเซลล์ตาย (apoptosis) ชัดขวางกระบวนการสร้างเส้นเลือดใหม่ (angiogenesis) และการแพร่กระจายของมะเร็ง (tumor invasion/metastasis)^(13, 31, 32) อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังไม่มีองค์การอาหารและยาของประเทศใด รวมทั้ง USFDA อนุญาตให้ใช้กัญชาหรือสารสำคัญจากกัญชาเพื่อการรักษา

พิษวิทยาของกัญชา

นอกจากฤทธิ์ในการรักษาความเจ็บป่วยแล้ว กัญชายังมีสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต่อจิตประสาท และทำให้เสพติด ดังนั้นกัญชาก็ยังถูกจัดเป็นยาเสพติดให้โทษ ถึงแม้ว่าตามประกาศพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ (ฉบับที่ 7) พ.ศ. 2562 อนุญาตให้สามารถนำกัญชามาใช้ในกรณีจำเป็นเพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ การรักษาผู้ป่วย หรือการศึกษาวิจัยและพัฒนาการศึกษาวิจัยทางการแพทย์ได้⁽¹⁶⁾ นอกจากนี้ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ระบุชื่อยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 ซึ่งลงประกาศในราชกิจจานุเบกษา และมีผลบังคับใช้ตั้งแต่วันที่ 15 ธันวาคม 2563 เป็นต้นไป ระบุว่าสามารถใช้ประโยชน์จากส่วนของกัญชา กัญชง ที่ไม่จัดเป็นยาเสพติด ได้แก่ ใบที่ไม่ติดกับช่อดอก กิ่ง ก้าน ลำต้น เปลือก ราก ของกัญชา และเมล็ดของกัญชง รวมถึงสารสกัด CBD และกากที่เหลือจากการสกัดกัญชา กัญชง ซึ่งต้องมีปริมาณ THC ไม่เกิน 0.2% รวมทั้งน้ำมันและสารสกัดจากเมล็ดกัญชง เพื่อใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ การศึกษาวิจัย และการผลิตผลิตภัณฑ์สุขภาพ ทั้งนี้ต้องได้มาจากสถานที่ปลูกหรือผลิตในประเทศไทยที่ได้รับอนุญาตเท่านั้น โดยกรณีนำเข้ากัญชา กัญชง สามารถทำได้ แต่ต้องขออนุญาตเป็นยาเสพติด ยกเว้นเฉพาะเปลือกแห้ง แก่นลำต้นแห้ง และเส้นใยแห้ง ที่ไม่จัดเป็นยาเสพติด แต่ส่วนของช่อดอก ใบที่ติดกับช่อดอก และเมล็ดของกัญชา ซึ่งช่อดอกของกัญชง ยังคงจัดเป็นยาเสพติด⁽³³⁾ แต่การนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพร ยา อาหาร หรือเครื่องสำอาง ต้องมีการขออนุญาตการขึ้นทะเบียนจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา โดยมีข้อกำหนดเฉพาะแล้วแต่กฎหมายที่เกี่ยวข้อง เช่น ประเภทของผลิตภัณฑ์ ปริมาณของสาร THC และ CBD ที่ยอมรับให้มีได้ในผลิตภัณฑ์แต่ละประเภท กลุ่มอายุหรือกลุ่มเสี่ยงของผู้บริโภค เป็นต้น ดังนั้นการนำมาใช้จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องพิจารณาถึงประโยชน์ รวมถึงผลข้างเคียง หรือความเป็นพิษที่อาจเกิดขึ้น เพื่อลดผลเสียหรือผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นต่อผู้บริโภค ทั้งการใช้ในระยะสั้นและยาว

การศึกษาพิษเฉียบพลันของกัญชามีรายงานเกี่ยวข้องกับอาการทางจิตประสาท การรับรู้และระบบหมุนเวียนเลือด อาการเคลิบเคลิ้ม (euphoria) หรือความกังวล การเปลี่ยนแปลงประสาทรับรู้ ความจำ และการควบคุมประสาทที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนไหว ซึ่งจะได้รับผลกระทบเมื่อได้รับเกินขนาดในการรับของร่างกายแต่ละคน (individually variable threshold) รายงานการทดสอบพิษเฉียบพลันของ THC และสารสกัดหยาบกัญชา พบว่าการให้สารสกัดในหนูแรชขนาดระหว่าง 225–3,600 มิลลิกรัม/กิโลกรัม พบการตายของหนูเกิดขึ้นระหว่าง 36–72 ชั่วโมง หลังการให้สารดังกล่าว อัตราการตายพบใน THC เป็นสองเท่าของสารสกัดกัญชา อาการพิษที่พบ ได้แก่ อุณหภูมิลดเฉียบพลัน (acute hypothermia) หายใจช้า (bradypnea) น้ำหนักลดเฉียบพลัน (rapid weight loss) เชื่องซึม (inactivity) เดินเซ (ataxia) กล้ามเนื้อกระตุก (muscle tremors) และนอนราบกับพื้น (prostration) เมื่อให้สารสกัดหยาบกัญชาที่มีปริมาณ THC เท่ากันกับทั้งสองอนุพันธ์ ($\Delta 9$ -THC และ $\Delta 8$ -THC) พบอาการความผิดปกติไม่แตกต่างกัน

ในขณะที่การให้ THC ขนาด 3,000–9,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ในสุนัขและลิงไม่พบการตายเกิดขึ้น อาการที่พบคล้ายอาการในหนูแต่ไม่รุนแรง รวมถึงอาการอื่นๆ เช่น ง่วงซึม (drowsiness, anaesthesia) น้ำลายไหล (salivation) และไม่พบการเปลี่ยนแปลงสำคัญทางพยาธิวิทยา⁽³⁴⁾ จากการศึกษาพิษเฉียบพลันของ THC ในหนูแรท มีรายงานถึงความเป็นพิษที่ทำให้สัตว์ทดลองตายร้อยละ 50 (LD_{50}) มีค่าเท่ากับ 28.6, 372.9 และ 666.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม จากการให้ยาแบบ intravenous injection (IV), intraperitoneal injection (IP) และ intragastric (IG) ตามลำดับ โดยพบการตายจากการให้ยาแบบ IV ภายใน 15 นาที ในขณะที่แบบ IP หรือ IG พบการตายเกิดขึ้นภายใน 10–36 ชั่วโมง หลังการให้ยา ซึ่งพบอาการที่เป็นพิษ ได้แก่ ตัวสั่น ท้องเสีย และน้ำตาไหล (lacrimation)⁽³⁵⁾ ส่วน CBD ไม่พบอาการพิษเฉียบพลันทางคลินิกหรือผลข้างเคียงอันตราย จากการทดสอบให้ผู้เข้าร่วมโครงการรับประทานยาขนาด 15 – 160 มิลลิกรัม ได้รับไอระเหยขนาด 0.15 มิลลิกรัม/กิโลกรัม หรือการฉีดแบบ IV ขนาด 5–30 มิลลิกรัม⁽³⁶⁾ จากรายงานพิษเฉียบพลันในมนุษย์ที่ใช้กัญชาและผลิตภัณฑ์จากกัญชา (มี THC เป็นส่วนประกอบ 50–4,000 มิลลิกรัม/แพ็คหรือยางกัญชา (resin) หรือสารสกัดน้ำมันเข้มข้น จำนวน 253 คน ในรัฐโอเรกอนและโอเรกอน ประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่าพิษที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่ คือ ทำให้หัวใจเต้นเร็ว (tachycardia) และกระตุ้นประสาท (neuroexcitation) จากการได้รับในรูปไอระเหยมากกว่ารูปแบบรับประทานทางปาก ในจำนวนนี้มีคนไข้ 8 ราย ต้องได้รับการดูแลในห้องฉุกเฉิน และเสียชีวิต 1 ราย⁽³⁷⁾

จากผลการศึกษาพิษเรื้อรัง มีรายงานการให้สาร THC ทางปาก ขนาด 50, 250, 400, 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน และสารสกัดหยากกัญชาขนาด 150, 750, 1,200, 1,500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน ในหนูแรทติดต่อกันเป็นระยะเวลา 119 วัน พบการตายเกิดขึ้นภายใน 36–72 ชั่วโมง หลังการให้สาร THC พบอาการซึม หลังจากสัปดาห์แรกมีพฤติกรรมที่อยู่นิ่ง (hyperactivity) ก้าวร้าว และเกร็ง น้ำหนักตัวและน้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ลดลง เช่น มดลูก รังไข่ และม้าม อาจมีพิษเรื้อรังต่อระบบต่อมไร้ท่อ (endocrinologic system)⁽³⁸⁾ การทดสอบพิษเรื้อรังทางคลินิกของ CBD ไม่พบความเป็นพิษหรืออาการความผิดปกติเกิดขึ้น ในอาสาสมัครที่รับประทานสารขนาด 10 มิลลิกรัม/วัน ติดต่อกัน 21 วัน หรือในผู้ป่วยลมชักที่รับประทานยาขนาด 200–300 มิลลิกรัม/วัน ติดต่อกัน 135 วัน⁽³⁶⁾ ทั้งนี้ยังมีรายงานการใช้กัญชาในมนุษย์เป็นเวลานาน พบอาการที่เกิดความผิดปกติต่อจิตประสาท ได้แก่ ซึมเศร้า กังวล โรควิตไบโพลาร์ ขาดแรงใจ ส่วนการสุบักัญชา พบว่ามีผลต่อระบบหายใจโดยตรง ได้แก่ ความหนาแน่นปอดลดลง เนื้ออกที่ปอด ปอดอักเสบเรื้อรัง⁽³⁹⁾ มีการศึกษารวบรวมข้อมูลจากผู้ที่ใช้กัญชาสัปดาห์ละครั้งหรือน้อยกว่าในประเทศสหรัฐอเมริกาจำนวน 1,913 คน พบว่าปริมาณกัญชาที่ได้รับมีผลโดยตรงต่อระบบหลอดเลือดหัวใจ อาการที่สำคัญ ได้แก่ ภาวะกล้ามเนื้อหัวใจตาย (myocardial infarction)⁽⁴⁰⁾ และหัวใจเต้นผิดปกติ (cardiac arrhythmias)⁽⁴¹⁾ นอกจากนี้ยังพบว่าการเสพกัญชาอย่างหนักทำให้เกิดการสูญเสียมวลกระดูก⁽³⁹⁾

ความเป็นพิษอื่นๆ เช่น การทดสอบเนวโน้มของ THC ต่อการเกิดมะเร็งในหนูถีบจักรขนาด 0–500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และหนูแรท 0–50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 2 ปี พบว่า THC ไม่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญต่อการเกิดมะเร็ง (carcinogenicity) หรือฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ (mutagenicity) เนื่องจากไม่พบอุบัติการณ์ของมะเร็งสัมพันธ์กับขนาดของสารที่ให้^(42, 43) รายงานทางระบาดวิทยาของการเสวกัญชาต่อการเกิดมะเร็งบางชนิด เช่น มะเร็งปอด⁽⁴⁴⁾ มะเร็งคอ⁽⁴⁵⁾ มะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งรังไข่^(46, 47) และมะเร็งสมอง (ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณและอุบัติการณ์)⁽⁴⁸⁾ พบว่ายังไม่มีความชัดเจน เนื่องจากลักษณะการเสวกัญชาจะใช้ขนาด การหายใจเข้าลึกและกักคว้นในทางเดินหายใจนานกว่าการสูบบุหรี่ทั่วไป⁽⁴⁹⁾ รวมถึงผู้เสวกัญชาส่วนใหญ่มีพฤติกรรมเสี่ยง เช่น สูบบุหรี่หรือดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ร่วมด้วยเป็นประจำ

วิจารณ์

กัญชาเป็นพืชที่มีความน่าสนใจเนื่องจากมีประวัติความเป็นมายาวนาน โดยเฉพาะกัญชามีการอ้างอิงแหล่งกำเนิดในประเทศไทยและภูมิภาคเอเชีย^(10, 11, 14) แม้จะเป็นพืชเสพติดและออกฤทธิ์ต่อจิตประสาท ปัจจุบันในหลายประเทศมีการอนุญาตให้ครอบครองหรือสนับสนุนการปลูกเป็นพืชเศรษฐกิจ ซึ่งมีการออกกฎหมายควบคุมและแนวปฏิบัติอย่างชัดเจน เช่น บางรัฐในสหรัฐอเมริกา แคนาดา ออสเตรเลีย และบางประเทศในยุโรป⁽⁷⁾ สำหรับประเทศไทยในปัจจุบันหลายหน่วยงานทั้งภาครัฐและเอกชนได้ดำเนินการศึกษาวิจัยเพื่อนำมาใช้ทางการแพทย์ภายใต้พระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษฉบับใหม่ (ฉบับที่ 7) พ.ศ. 2562 กัญชาเป็นพืชล้มลุกอายุสั้นและสามารถผสมข้ามสายพันธุ์ได้ นอกจากนี้ยังมีความพยายามจากนักคัดเลือกสายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์กรรมพืชเพื่อใช้ประโยชน์ จึงทำให้เกิดความหลากหลายของสายพันธุ์ (genetics) ที่มีลักษณะทางกายภาพ (morphology) รวมถึงชนิดและปริมาณสารสำคัญแตกต่างกันไป ซึ่งอาจแบ่งได้เป็น สายพันธุ์ผสมที่ให้ THC สูง (24–32%) เช่น สายพันธุ์ Chem BerryD, Bruce Banner BX2.0, Hulk berry, Original Glue และ Girl Scout cookies หรือสายพันธุ์ผสมที่ให้ CBD สูง (6–20%) แต่ THC ต่ำ (<0.5%) เช่น สายพันธุ์ Cannatonic, CBD Therapy, Candida (CD-1), Juanita La Lagrimosa และ OG Kush CBD เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีกัญชาสายพันธุ์ไทยที่ได้รับยกย่องว่าเป็นสายพันธุ์ที่ดีที่สุดในโลกสายพันธุ์หนึ่งคือ สายพันธุ์หางกระรอก (Thai Stick) แต่มีแนวโน้มที่มีปริมาณ THC สูง^(50, 51) จึงเป็นความท้าทายสำคัญสำหรับการนำกัญชาสายพันธุ์ไทยมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ นอกจากปริมาณสารสำคัญที่เป็นผลมาจากสายพันธุ์แล้ว ปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม กรรมวิธีในการปลูกและการเก็บเกี่ยว ส่งผลให้กัญชาที่ได้มีปริมาณ THC ไม่คงที่ และมีแนวโน้มเกินมาตรฐานตามที่กฎหมายกำหนด⁽⁷⁾ สารพิษหลักในกัญชา คือ แคนนาบินอยด์ โดยเฉพาะ CBD ที่มีการวิจัยและผลิตเป็นยารักษาโรคซึมเศร้า ส่วน THC และอนุพันธ์พบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่สำคัญ เช่น ฤทธิ์แก้ปวดและลดอาการเกร็งจากโรคระบบประสาทผิดปกติ กระตุ้นความอยากอาหารในผู้ป่วยที่ได้รับเคมีบำบัด อย่างไรก็ตามกัญชาพบรายงานความเป็นพิษที่เกิดขึ้น โดยเฉพาะพิษต่อจิตประสาทของสาร THC เมื่อการเสพโระเหยจะพบว่ามีสารเคมีเกิดขึ้นมากกว่า 2,000 ชนิด สารบางชนิด เช่น สารประกอบไนโตรเจน เป็นสารก่อมะเร็ง และ THC สามารถดูดซึมทางปอดและผ่านเข้าสู่กระแสเลือดได้ภายในไม่กี่วินาที สามารถตรวจพบในพลาสมามากกว่าร้อยละ 90 ภายใน 10 นาที ส่วนการให้ทางปากจะสามารถตรวจได้ช้ากว่า (ภายใน 2 ชั่วโมง) และสามารถจับกับตัวรับในเซลล์ได้หลากหลายทั้ง CB1, CB2, opioid และ benzodiazepine receptors⁽⁴⁹⁾ ทำให้เกิดพิษเฉียบพลันเมื่อได้รับขนาดสูง และก่อให้เกิดอาการผิดปกติของ ปอด หัวใจ กระดูก หรือกล้ามเนื้อได้เมื่อมีการเสพอย่างต่อเนื่อง หากประเทศไทยจะนำกัญชาเพื่อใช้ประโยชน์ทางการแพทย์แล้ว แนวทางเบื้องต้นน่าจะใช้กัญชาที่พิสูจน์แล้วว่าเป็นสายพันธุ์กัญชาที่ควบคุมปริมาณ CBD และ THC ได้โดยควบคุมสถานะแวดล้อมการปลูกและการผลิตจะทำให้ได้ตัวอย่างกัญชาที่มีคุณภาพและถูกต้องตามกฎหมาย โดยกัญชาที่มี CBD สูง THC ต่ำ เพื่อใช้ในกลุ่มอาการลมชัก คลายกังวล หรืออาจพัฒนาเป็นยาด้านมะเร็งบางชนิดได้ กัญชาที่มี THC สูงสามารถพัฒนามาใช้ทางการแพทย์สำหรับบรรเทาอาการปวดที่สำคัญ โรคทางระบบประสาท หรือบรรเทาผลข้างเคียงจากการใช้เคมีบำบัด ซึ่งต้องพิจารณาความเป็นพิษหรือความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นอย่างรอบคอบ

สรุป

กัญชาและกัญชงเป็นพืชชนิดเดียวกัน (species) ที่มีความหลากหลายของสายพันธุ์ (varieties) ปัจจัยทางพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อมมีผลต่อปริมาณสารสำคัญในกัญชา ทั้ง THC และ CBD และสารพิษเคมีอื่น ๆ โดยทั่วไปสายพันธุ์กัญชาที่ปลูกในประเทศไทยจะมีปริมาณ THC น้อยกว่าร้อยละ 1.0 เมื่อเปรียบเทียบกับกัญชาสายพันธุ์อื่น ๆ ฤทธิ์สำคัญที่นำมาใช้ทางการแพทย์จะอ้างอิงปริมาณสารสำคัญ ซึ่ง THC และอนุพันธ์มีฤทธิ์แก้ปวดโดยเฉพาะปวดจากโรคทางระบบประสาท กระตุ้นความอยากอาหารและลดอาการคลื่นไส้จากการใช้เคมีบำบัด ช่วยปกป้องและ

กระตุ้นการสร้างเซลล์สมอง ส่วน CBD มีฤทธิ์บรรเทาอาการลมชัก ลดอาการวิตกกังวลทั้งในเด็กกลุ่มอาการออทิสติก หรือในผู้ป่วยที่มีประวัติการเสพยาบ้า ทั้ง THC และ CBD มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง THC ก่อให้เกิดพิษเฉียบพลันและเรื้อรังในสัตว์ทดลองได้เมื่อได้รับสารในปริมาณสูงและระยะเวลานาน ในขณะที่ CBD ไม่พบรายงานอาการความเป็นพิษ หรือผลข้างเคียงร้ายแรง

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้นิพนธ์ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการพิษภัณฑ์พืช สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ข้อมูลด้านพฤกษศาสตร์ของพืชกัญชา และมหาวิทยาลัย Liverpool John Moores เมืองลิเวอร์พูล สหราชอาณาจักร ในการใช้เครื่องมืออิเล็กทรอนิกส์และการเข้าถึงวารสารต่างประเทศ

เอกสารอ้างอิง

1. Small E, Cronquist A. A practical and natural taxonomy for Cannabis. Taxon 1976; 25(4): 405-35.
2. Hillig KW. Genetic evidence for speciation in Cannabis (Cannabaceae). Genet Resour Crop Evol 2005; 52(2): 161-80.
3. Watts G. Cannabis confusions. BMJ 2006; 332(7534): 175-6.
4. Piomelli D, Russo EB. The Cannabis sativa versus Cannabis indica debate: an interview with Ethan Russo, MD. Cannabis Cannabinoid Res 2016; 1(1): 44-6.
5. Woodbridge M, ผู้แต่ง. วารุณี เสวตประวิฑูร, สุชาติ นิลกำแหง วิลคินส์, ธีรศ ธารีสุขวิฑูร, ผู้แปล ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับกัญชาทางการแพทย์: หนังสือแนะนำการใช้กัญชาเพื่อบำบัดโรค. กรุงเทพฯ: องค์การเภสัชกรรม; 2562.
6. ประภัสสร ทิพรรัตน์. พืชกัญชา: ความรู้ทั่วไปและการตรวจสอบสารสำคัญ. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 10 ก.พ. 2563]; [17 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://www.oncb.go.th/ncsmi/cannabis4/พืชกัญชา%20%20ความรู้ทั่วไปและการตรวจสอบสารสำคัญ.pdf>.
7. Pollio A. The name of Cannabis: a short guide for Nonbotanists. Cannabis Cannabinoid Res 2016; 1(1): 234-8.
8. ราชบัณฑิตยสถาน. หนังสืออนุกรมวิธานพืช อักษร ก. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: หจก. อรุณการพิมพ์; 2547.
9. Anderson LC. Leaf variation among Cannabis species from a controlled garden. Bot Mus Lealf Harv Univ 1980; 28(1): 61-9.
10. McPartland JM. Cannabis systematics at the levels of family, genus, and species. Cannabis Cannabinoid Res 2018; 3(1): 203-12.
11. Hanus LO, Meyer SM, Munoz E, Tagliatela-Scafati O, Appendino G. Phytocannabinoids: a unified critical inventory. Nat Prod Rep 2016; 33(12): 1357-92.
12. Hill AJ, Williams CM, Whalley BJ, Stephens GJ. Phytocannabinoids as novel therapeutic agents in CNS disorders. Pharmacol Ther 2012; 133(1): 79-97.
13. Moreau M, Ibeh U, Decosmo K, Bih N, Yasmin-Karim S, Toyang N, et al. Flavonoid derivative of Cannabis demonstrates therapeutic potential in preclinical models of metastatic pancreatic cancer. Front Oncol 2019; 9: 660. (9 pages).

14. Bonini SA, Premoli M, Tambaro S, Kumar A, Maccarinelli G, Memo M, et al. *Cannabis sativa*: a comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. *J Ethnopharmacol* 2018; 227: 300–15.
15. Sirikantaramas S, Taura F. Cannabinoids: biosynthesis and biotechnological applications. In: Chandra S, Lata H, ElSohly MA, editors. *Cannabis sativa L - botany and biotechnology*. Champaign, Illinois: Springer International Publishing; 2017. p. 183–206.
16. กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. คำแนะนำการใช้กัญชาทางการแพทย์. ฉบับปรับปรุงครั้งที่ 1/2562. [ออนไลน์]. 2562; [สืบค้น 10 ก.พ. 2563]; [18 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://www.chiangmaihealth.go.th/cmpo_web/document/190609156008311353.PDF.
17. Lu H-C, Mackie K. An introduction to the endogenous cannabinoid system. *Biol Psychiatry* 2016; 79(7): 516–25.
18. Whiting PF, Wolff RF, Deshpande S, Di Nisio M, Duffy S, Hernandez AV, et al. Cannabinoids for medical use: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2015; 313(24): 2456–73.
19. Aran A, Cassuto H, Lubotzky A, Wattad N, Hazan E. Brief report: cannabidiol-rich cannabis in children with autism spectrum disorder and severe behavioral problems—a retrospective feasibility study. *J Autism Dev Disord* 2019; 49(3): 1284–8.
20. Scherma M, Satta V, Collu R, Boi MF, Usai P, Fratta W, et al. Cannabinoid CB1/CB2 receptor agonists attenuate hyperactivity and body weight loss in a rat model of activity-based anorexia. *Br J Pharmacol* 2017; 174(16): 2682–95.
21. Szaflarski JP, Bebin EM, Cutter G, DeWolfe J, Dure LS, Gaston TE, et al. Cannabidiol improves frequency and severity of seizures and reduces adverse events in an open-label add-on prospective study. *Epilepsy Behav* 2018; 87: 131–6.
22. Lim K, See YM, Lee J. A systematic review of the effectiveness of medical cannabis for psychiatric, movement and neurodegenerative disorders. *Clin Psychopharmacol Neurosci* 2017; 15(4): 301–12.
23. Daris B, Verboten MT, Knez Z, Ferk P. Cannabinoids in cancer treatment: therapeutic potential and legislation. *Bosn J Basic Med Sci* 2019; 19(1): 14–23.
24. Svendsen KB, Jensen TS, Bach FW. Does the cannabinoid dronabinol reduce central pain in multiple sclerosis? Randomised double blind placebo controlled crossover trial. *BMJ*. 2004; 329(7460): 253. (8 pages).
25. Nurmikko TJ, Serpell MG, Hoggart B, Toomey PJ, Morlion BJ, Haines D. Sativex successfully treats neuropathic pain characterised by allodynia: a randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Pain* 2007; 133(1–3): 210–20.
26. Rice J, Cameron M. Cannabinoids for treatment of MS symptoms: state of the evidence. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2018; 18(8): 50. (10 pages).
27. US FDA. FDA approves first drug comprised of an active ingredient derived from marijuana to treat rare, severe forms of epilepsy. [online]. 2018; [cited 2020 Feb 10]; [3 screens]. Available from: URL: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-drug-comprised-active-ingredient-derived-marijuana-treat-rare-severe-forms>.

28. Suliman NA, Taib CNM, Moklas MAM, Basir R. Delta-9-Tetrahydrocannabinol (Δ 9-THC) induce neurogenesis and improve cognitive performances of male sprague dawley rats. *Neurotoxic Res* 2018; 33(2): 402-11.
29. Bilkei-Gorzo A, Albayram O, Draffehn A, Michel K, Piyanova A, Oppenheimer H, et al. A chronic low dose of Δ 9-tetrahydrocannabinol (THC) restores cognitive function in old mice. *Nat Med* 2017; 23(6): 782-7.
30. Aso E, Juves S, Maldonado R, Ferrer I. CB2 cannabinoid receptor agonist ameliorates Alzheimer-like phenotype in A β PP/PS1 mice. *J Alzheimers Dis* 2012; 35(4): 847-58.
31. Chakravarti B, Ravi J, Ganju RK. Cannabinoids as therapeutic agents in cancer: current status and future implications. *Oncotarget* 2014; 5(15): 5852-72.
32. Velasco G, Sanchez C, Guzman M. Endocannabinoids and cancer. *Handb Exp Pharmacol* 2015; 231: 449-72.
33. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ระบุชื่อยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 (พ.ศ. 2563). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 137 ตอนพิเศษ 290 ง (วันที่ 14 ธันวาคม 2563). หน้า 33-34.
34. Thompson GR, Rosenkrantz H, Schaeppi UH, Braude MC. Comparison of acute oral toxicity of cannabinoids in rats, dogs and monkeys. *Toxicol Appl Pharmacol* 1973; 25(3): 363-72.
35. Phillips RN, Turk RF, Forney RB. Acute toxicity of Δ 9-tetrahydrocannabinol in rats and mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 1971; 136(1): 260-3.
36. Bergamaschi MM, Queiroz RH, Zuardi AW, Crippa JA. Safety and side effects of cannabidiol, a Cannabis sativa constituent. *Curr Drug Saf* 2011; 6(4): 237-49.
37. Noble MJ, Hedberg K, Hendrickson RG. Acute cannabis toxicity. *Clin Toxicol (Phila)* 2019; 57(8): 735-42.
38. Thompson GR, Mason MM, Rosenkrantz H, Braude MC. Chronic oral toxicity of cannabinoids in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1973; 25(3): 373-90.
39. Reece AS. Severe multisystem dysfunction in a case of high level exposure to smoked cannabis. *BMJ Case Rep* 2009; 2009. (7 pages).
40. Mukamal KJ, Maclure M, Muller JE, Mittleman MA. An exploratory prospective study of marijuana use and mortality following acute myocardial infarction. *Am Heart J* 2008; 155(3): 465-70.
41. Korantzopoulos P, Liu T, Papaioannides D, Li G, Goudevenos JA. Atrial fibrillation and marijuana smoking. *Int J Clin Pract* 2008; 62(2): 308-13.
42. Chan PC, Sills RC, Braun AG, Haseman JK, Bucher JR. Toxicity and carcinogenicity of Δ 9-tetrahydrocannabinol in Fischer rats and B6C3F1 mice. *Fundam Appl Toxicol* 1996; 30(1): 109-17.
43. Marselos M, Karamanakos P. Mutagenicity, developmental toxicity and carcinogenicity of cannabis. *Addict Biol* 1999; 4(1): 5-12.
44. Aldington S, Harwood M, Cox B, Weatherall M, Beckert L, Hansell A, et al. Cannabis use and risk of lung cancer: a case-control study. *Eur Respir J* 2008; 31(2): 280-6.

45. Hashibe M, Ford DE, Zhang Z-F. Marijuana smoking and head and neck cancer. *J Clin Pharmacol* 2002; 42(S1): 103S-7S.
46. Sidney S, Quesenberry CP, Friedman GD, Tekawa IS. Marijuana use and cancer incidence (California, United States). *Cancer Causes Control* 1997; 8(5): 722-8.
47. Daling JR, Doody DR, Sun X, Trabert BL, Weiss NS, Chen C, et al. Association of marijuana use and the incidence of testicular germ cell tumors. *Cancer* 2009; 115(6): 1215-23.
48. Efird JT, Friedman GD, Sidney S, Klatsky A, Habel LA, Udaltsova NV, et al. The risk for malignant primary adult-onset glioma in a large, multiethnic, managed-care cohort: cigarette smoking and other lifestyle behaviors. *J Neurooncol* 2004; 68(1): 57-69.
49. Sharma P, Murthy P, Bharath MM. Chemistry, metabolism, and toxicology of cannabis: clinical implications. *Iran J Psychiatry* 2012; 7(4): 149-56.
50. วริศรา สุวรรณ. ความหลากหลายของสายพันธุ์กัญชา. [ออนไลน์]. 2562; [สืบค้น 5 พ.ย. 2563]; [4 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://erp.mju.ac.th/articleDetail.aspx?qid=1065>.
51. ส. สุทธิพันธ์. กัญชา สรรพยาแห่งความหวัง. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 5 พ.ย. 2563]; [23 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://www.satapornbooks.co.th/imgadmins/product_pdf/201910_01_Kaancha.pdf.

Pharmacological and Toxicological Effects of Cannabis

Sarayut Radapong¹ Praw Suppajariyawat¹ and Methin Phadungkit²

¹*Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Mueang District, Nonthaburi 11000*

²*Faculty of Pharmacy, Maha Sarakham University, Kantharawichai District, Maha Sarakham 44150, Thailand*

ABSTRACT *Cannabis sativa* L. is a plant with several varieties, which have different physical characteristics. The main phytochemical compounds in cannabis are cannabinoids; the two well-known groups of constituents are Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD). The THC/CBD proportion can cause the drug addiction and be used as a criteria for identification of cannabis strains. From the literature reviews, cannabis and its active compounds presented various interesting pharmacological effects. THC and its derivatives showed analgesic effects, especially pain from neurological disorders, enhancing appetite and reducing nausea from chemotherapy, protecting and stimulating the production of brain cells. CBD, on the other hand, was found to relieve epilepsy, reducing anxiety in children with autism or patients with a history of cannabis use. Both THC and CBD were also shown anti-cancer activity. However, its toxicity was reported, especially THC, causing acute and chronic toxicity in laboratory animals received high doses and prolonged period. Abnormalities were also found in long-term cannabis use including lung, coronary artery disorders and bone loss. Whereas, CBD has not been reported any toxicity or serious side effects in clinical trial.

Keywords: Cannabis, Pharmacology, Toxicology



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

ซอยโรงพยาบาลบำราศนราดรุณ 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	Supakit Sirilak	Phichet Banyati
	Ballang Uppapong	Piya Sirilak
Technical Advisor	Pimjai Naigowit	Sumol Pavitranon
	Panadda Silva	Duanthanorm Promkhatkaew
	Busarawan Sriwanthana	
Editor	Apiwat Tawatsin	
Assistant Editor	Prapai Wongsinkongman	Benjawan Phetsuksiri
	Siripakorn Sangkitporn	
Editorial Board	Pilaipan Puthavathana	Siriraj Hospital, Mahidol University
	Prasert Auewarakul	Siriraj Hospital, Mahidol University
	Danai Tiwawech	Naresuan University
	Suwanna Charunut	Huachiew Chalermprakiet University
	Salakchit Chutipongvivate	The Association of Medical Technologists of Thailand
	Padet Siriyasatien	Chulalongkorn University
	Pornpimol Kongtip	Mahidol University
	Srisurang Tantimavanich	Mahidol University
	Sunee Sirivichayakul	Chulalongkorn University
	Nuanchawee Wetprasit	Ramkhamhaeng University
	Chanitra Thuwajit	Mahidol University
	Pintip Pongpech	Retired Government official
	Usavadee Thavara	Retired Government official
	Suthon Vongsheree	Retired Government official
	Wichuda Jariyapan	Retired Government official
	Supanee Duangteraprecha	Retired Government official
	Piyada Wangroongsarb	Department of Medical Sciences
	Wantana Paveenkittiporn	Department of Medical Sciences
Administration	Numfon Noiprasert	Department of Medical Sciences
	Prasan Julwong	Department of Medical Sciences
	Aphimon Jiraphongsathorn	Department of Medical Sciences
	Navy Srivarom	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	Thanaaroonkarnpim Co., Ltd.	
	457/6-7 Phra Sumen Road, Bangkok 10200	
	Tel. 0-2282-6033-4	



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

เปิดใจ ใฝ่รู้ คู่คุณธรรม นำหลักวิชาการ มาตรฐานสากล



<https://bit.ly/BullDmsc>