



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

วารสาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 65 ฉบับที่ 1 มกราคม - มีนาคม 2566 • Vol. 65 No. 1 January - March 2023



Approved by TCI during (2022-2024)

ISSN 0125-684X

E-ISSN 2697-4525

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จัดทำโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เพื่อเผยแพร่ผลงานวิชาการด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ทุกสาขา

เจ้าของ	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข	
ที่ปรึกษาด้านบริหาร	นพ.ศุภกิจ ศิริลักษณ์ นพ.บัลลังก์ อุปพงษ์	นพ.พิเชฐ บัญญัติ นพ.ปิยะ ศิริลักษณ์
ที่ปรึกษาด้านวิชาการ	นางพิมพ์ใจ นัยโกวิท ดร.ปนัดดา ชิลวา ดร.บุษราวรรณ ศรีวรรณะ	ดร.สุมล ปวีตรานนท์ ดร.เดือนฉนอม พรหมขัติแก้ว
บรรณาธิการบริหาร	ดร.ประไพ วงศ์สินคณม้น	
บรรณาธิการ	ดร.นวลจันทร์ วิจิณณจินดา	
รองบรรณาธิการ	ดร.อภิวุฒิ ธวัชสิน ดร.ปิยะดา หวังรุ่งทรัพย์	นางสิริภากร แสงกิจพร
คณะบรรณาธิการ	ศ.เกียรติคุณ ดร.พิไลพันธ์ พุฒิมณะ ศ.ดร.นพ.ประเสริฐ เอื้อวรากุล ดร.दनัย ทิวาเวช ภญ.สุวรรณา จารุณช ศ.ดร.นพ.เผด็จ สิริยะเสถียร ศ.ดร.พรพิมล กองทิพย์ รศ.ดร.ศรีสุรางค์ ตันติมาวานิช ดร.สุณี ศิริวิชัยกุล ศ.ดร.พญ.ชนิตรา ธวัจจิตต์ รศ.ดร.ภญ.พินทิพย์ พงษ์เพชร ดร.สลักจิต ชุตติพงษ์วิเวท ดร.อุษาวดี ถาวรระ นายสุธน วงษ์ชีรี นางวิษชุดา จิตตางกูร ดร.สุภาณี ดวงธีรปรีชา รศ.ดร.นวลฉวี เวชประสิทธิ์ ดร.วันทนา ปวีณกิตติพร ดร.อุรอุยากร จันทรแสง	มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยนเรศวร มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยมหิดล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ
ฝ่ายจัดการ	นางสาวน้ำฝน น้อยประเสริฐ นางสาวประสาน จุลวงษ์ นางสาวอภิมน จิรพงศ์ธร นายนาวิ ศรีวรรณย์ นางสาวภาวิณี สุขเจริญ	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
สำนักงานวารสาร	สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 88/7 ซอยติวานนท์ 14 ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000 โทร. 0-2951-0000 ต่อ 99662 โทรสาร 0-2951-1297 E-mail : bull.dmssc@dmssc.mail.go.th	
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 65 ฉบับที่ 1 มกราคม - มีนาคม 2566

Vol. 65 No.1 January - March 2023

สารบัญ

หน้า

นิพนธ์ต้นฉบับ

- ฤทธิ์เหนียวทำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งของสารสกัดกัญชา 1
พันธุ์ตะนาวศรีก้านแดง อาร์ดี วัน
ศรายุทธ ระดาพงษ์ ฌฐภัทร หาญกิจ ตัญญาณี สาหัด พราว ศุภจริยาวัตร เสกรชตกร บัวเบา
พรชัย สันเจริญโกโคย ศิริวรรณ ชัยสมบุรณ์พันธ์ และ Kenneth J Ritchie
- การวัดความเข้มแสงไฟของคอลลิเมเตอร์หลอดเอกซเรย์ด้วยแอปพลิเคชันบนสมาร์ตโฟน 14
สินีพร จันทรสว่าง และ คทายุทธ นิกภาพฤกษ์
- การพัฒนา Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay เพื่อวิเคราะห์ 23
ความแรงของเซรุ่มแก้พิษงูเห่า
ไพศาล พังจันทน์ และ วิภาวี วงศ์ชนะ
- ช่วงค่าอ้างอิงฮอร์โมนไทรอยด์สติมูเลติงของทารกเกิดก่อนกำหนดและน้ำหนักแรกเกิดน้อย 34
จารณี พึ่งโพธิ์สก เพ็ญพรรณ ทองเงา ปิยนันท์ ทิพย์ละคร กมล เทียมศิริ
เปี่ยมนกุล กระแสร์ และ ھرรษา ไทยศรี

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 65 ฉบับที่ 1 มกราคม - มีนาคม 2566

Vol. 65 No.1 January - March 2023

CONTENTS

Page

Original Articles

- Apoptosis Induction on Human Cancer Cells of *Cannabis sativa* L. Cultivar Tanao Sri Kan Dang RD1 Extract** 1
Sarayut Radapong, Nathaphat Harnkit, Tiyanee Sahad, Praw Suppajariyawat, Sekrachatakorn Buaboa, Pornchai Sincharoenpokai, Siriwan Chaisomboonpan, and Kenneth J Ritchie
- Measurement Light Intensity from the Collimator of the X-ray Tube Using Smartphone Applications** 14
Sineeporn Jansawang and Khatayut Nigapruke
- Development of Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Potency Testing of Cobra Antivenin** 23
Paisan Pangjunan and Wipawee Wongchana
- Thyroid Stimulating Hormone Reference Intervals of Preterm and Low Birth Weight Neonates** 34
Jaranee Phoungphosop, Penpan Thong-ngao, Piyanan Thiplakorn, Piangkamol Tiamsiri, Piamnukul Krasao, and Hansa Thaisri



บรรณาธิการแถลง



วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ฉบับนี้เป็นปีที่ 65 ฉบับที่ 1 มกราคม – มีนาคม 2566 ซึ่งดิฉันได้รับหน้าที่บรรณาธิการ ต่อจาก ดร. อภิวิทย์ รัชสิน ที่ได้ทำภารกิจสำคัญในการพัฒนาคุณภาพของวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ต่อเนื่องมาจากทีมกองบรรณาธิการก่อนหน้าจนทำให้วารสารฯ ได้รับการรับรองคุณภาพจากศูนย์ดัชนีการอ้างอิงวารสารไทย (Thai Journal Citation Index: TCI) อยู่ในวารสารกลุ่มที่ 1 (1 มกราคม 2565 – 31 ธันวาคม 2567) อย่างไรก็ตาม การปรับปรุงวารสารฯ ให้มีคุณภาพดียิ่งๆ ขึ้น ทั้งทางด้านวิชาการและบริหารจัดการ ยังคงเป็นภารกิจสำคัญที่กองบรรณาธิการ และทีมงานจัดทำวารสารยึดถือและมุ่งมั่นพัฒนาอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้บทความที่ตีพิมพ์ในวารสารฯ ซึ่งผ่านการพิจารณาจากกองบรรณาธิการและผู้ประเมินบทความ (reviewer) อย่างเข้มข้นมีความสมบูรณ์ทางวิชาการสามารถนำไปอ้างอิงและใช้ประโยชน์ต่อไป

ดร.นวลจันทร์ วิจักขณ์จินดา

บรรณาธิการวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์



คำแนะนำสำหรับผู้พิมพ์

Apoptosis Induction on Human Cancer Cells of *Cannabis sativa* L. Cultivar Tanao Sri Kan Dang RD1 Extract

Sarayut Radapong¹, Nathaphat Harnkit¹, Tiyanee Sahad¹, Praw Suppajariyawat¹, Sekrachatakorn Buaboa¹, Pornchai Sincharoenpokai¹, Siriwan Chaisomboonpan¹, and Kenneth J Ritchie²

¹Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

²Centre for Natural Products Discovery, School of Pharmacy and Biomolecular Sciences, Liverpool John Moores University, Byrom Street, Liverpool L3 3AF, UK

ABSTRACT *Cannabis sativa* L. has been reported to be active against some kinds of malignant tumor cells. However, the mechanisms of action of the Thai cannabis, *Cannabis sativa* L. cultivar Tanao Sri Kan Dang RD1, have not been revealed. This study aimed to investigate the anti-proliferative and apoptosis-inducing properties of Tanao Sri Kan Dang RD1 extract (TRD1), cannabidiol (CBD) and Δ^9 -tetra-hydrocannabinol (THC). The crude extract, TRD1 was prepared from the cannabis female inflorescences using supercritical fluid extraction. The content of THC and CBD of the extracts was analyzed using High-performance liquid chromatography. The anti-proliferative properties were investigated on several cancer cell lines. The results showed that TRD1, CBD and THC posed cytotoxicity against MCF-7, Hep G2, PANC-1 and A-549 cell lines. MCF-7 cells were the most susceptible to the three compounds investigated (IC_{50} = 2.81, 2.69 and 4.51 $\mu\text{g/mL}$, respectively) and chosen to investigate apoptosis induction. TRD1 induced apoptosis dose-dependently (2.5-10.0 $\mu\text{g/mL}$) in the same manner as CBD did (2.0-8.0 $\mu\text{g/mL}$), whereas THC induced apoptosis to the same extent as necrosis at 10.0 $\mu\text{g/mL}$. CBD and THC also moderated caspase-3 protein expression and induced chromatin condensation in MCF-7 cells. In conclusion, TRD1, CBD and THC exhibited anti-proliferative and apoptosis-inducing properties suggesting that they might be further investigated for their anti-cancer drug potential. In addition, in vivo pharmacological and toxicological studies should be conducted to ensure efficacy and safety for further research as medicinal product in the future.

Keywords: *Cannabis sativa* L. extract, Tanao Sri Kan Dang RD1, Apoptosis, Cannabidiol, Δ^9 -tetra-hydrocannabinol

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

Received: 18 May 2022

Revised: 17 December 2022

Accepted: 23 January 2023

Introduction

Cannabis, marijuana or *Cannabis sativa* L., is a plant that is legally licensed for medical or recreational use in many countries. Currently, the Thai government allows the legal use of cannabis for medical purposes. Thailand has been reported to be one of the habitats of *C. sativa* descendants which have the characteristics of narrow leaflets, slender and tall habit and late maturation.⁽¹⁾ Some cultivars of this plant have been found to have specific characteristics and intensively studied for medical purposes which are Hang Kra Rog Phu Phan ST1, Hang Suea Sakonnakhon TT1, Tanao Sri Kan Khaw WA1 and Tanao Sri Kan Dang RD1.⁽²⁾ Tanao Sri Kan Dang RD1 is reported as a cannabidiol (CBD)-enriched cultivar, whereas, others presented varying amounts of THC.⁽²⁾ Cannabinoids are found to be the active compounds in this plant; among these, the most common compounds are THC and CBD. The proportion of THC/CBD is also used as a criterion for the identification of cannabis strains or cultivars.⁽³⁾ Besides, there have been reported other cannabinoids in the lines of phytocannabinoid synthesis such as cannabigerol (CBG), cannabichromene (CBC), Δ^9 -tetrahydrocannabivarin (D9-THCV), cannabicyclol (CBL), cannabinol (CBN) as final products by decarboxylation reaction. The precursors most presented in raw plants are in acid forms including Δ^9 -THCA, CBDA and CBCA.⁽⁴⁾ Moreover, 400 other phytochemicals have been reported to be presented including flavonoids, terpenoids, alkaloids, steroids, alkanes, fatty acids and sugars.^(4,5) The pharmacological activities of cannabis were reported to focus on THC and CBD. THC and its derivatives were reported as analgesic, appetite, nausea reduction

induced by chemotherapy and brain cells protection from oxidative stress. CBD, on the other hand, showed the effect of relieving epilepsy and reducing anxiety. THC, CBD and cannabinoid derivatives such as cannabichromene (CBC) and cannabigerol (CBG) or flavonoids such as apigenin, chrysoeriol, kaempferol, luteolin, quercetin, vitexin and cannflavins were found to be effective against many types of cancer cells In vivo.^(5,6) CBD has also been found to be active against cancer cell lines in vitro such as breast cancer cells (MCF-7, MDA-MB-231), brain cancer cells (U87-MG, U373), lung cancer cells (NSCLC, A549), colon cancer cells (HT29), pancreatic cancer cells (PC-3, DU-145, 22RV1, and LNCaP), prostate cancer cells (PC-3, DU-145, 22RV1, LNCaP) and blood cancer cells (leukaemia/lymphoma, multiple myeloma) by inhibiting cell proliferation and angiogenesis.⁽⁷⁾ Evasion of apoptosis is an important hallmark of cancer and the induction of apoptosis is consequently recognized as an important property of any potential therapeutic.^(8,9) Therefore, research continues to focus on the elucidation and analysis of signalling pathways that control apoptosis. There are two main pathways of apoptosis; extrinsic and intrinsic pathways. Both pathways activate the executioners through caspase 3, 6 and 7. The execution pathway results in characteristic cytomorphological features including cell shrinkage, chromatin condensation, the formation of cytoplasmic blebs and apoptotic bodies and finally phagocytosis of the apoptotic bodies by adjacent parenchymal cells, neoplastic cells or macrophages.⁽¹⁰⁾ However, the other dichotomous mechanism of cell death is necrosis which has been characterized as accidental cell death.

The causes are chemicals, external injury or trauma of cell membrane resulting in losing the membrane integrity and releasing inflammatory cellular contents. Necrosis normally causes acute toxicity.⁽¹¹⁾

This research, therefore, aimed to investigate the cytotoxicity of Thai cannabis strain (*Cannabis sativa* L. cultivar, Tanao Sri Kan Dang RD1) crude extract, CBD and THC in various cancer cell lines and the ability to induce apoptosis. The results of this study could be supportive information for developing Thai cannabis as an anti-cancer drug or combined chemotherapy.

Materials and Methods

Cell culture

Adenocarcinoma human alveolar basal epithelial cells (A-549), human Caucasian hepatocyte carcinoma cells (Hep G2), human pancreatic cancer cell line (PANC-1), and human breast adenocarcinoma cells (MCF-7) were obtained from Cell lines service GmbH (Eppelheim, Germany). A-549 cells were grown in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) (Gibco, NY, USA), whereas, Hep G2, PANC-1 and MCF-7 were grown in Eagle's minimum essential medium (EMEM) (Gibco, NY, USA). Both cell culture media were supplemented with 2 mM L-glutamine, 0.1 mM non-essential amino acid, 1 mM sodium pyruvate and 10% fetal bovine serum at 37°C in a 5% CO₂ incubator.

Standards

Cannabidiol (CBD) (> 98% HPLC), Δ9-tetrahydrocannabinol (THC) (> 98% HPLC), cannabidiolic acid (CBDA) (> 98.5% HPLC) and tetrahydrocannabinolic acid (THCA) were from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Doxorubicin (> 98% HPLC grade) was purchased from Sigma-Aldrich (Buchs, Switzerland).

Plant materials

The plant material was obtained from *Cannabis sativa* L. cultivars Tanao Sri Kan Dang RD1 (TRD1) and certified by Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperatives (certificate no. 1688/2564). It was cultivated in the greenhouse of Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences which had a license to grow category-5 narcotic plants (No. 90/2564, planting place). Fresh female inflorescences were collected from 6-month-old cannabis in September 2021.

Plant extraction and quality control

TRD1 cannabis crude extract was produced using the following procedure. The fresh inflorescences were cut into small pieces about 1 cm in length. They were dried in a hot air oven at 45–50°C for 24–48 hours. The dried plant was ground into crude powder and then extracted using supercritical fluid extraction (SFE); CO₂ was used as the solvent to extract bioactive components. The extraction condition was set at 250 bar and 40°C. THC and CBD in the extract were analyzed using High-performance liquid chromatography (HPLC, model LC-40D, Shimadzu, Japan); with a photodiode array detector at wavelength 220 nm, column 150 × 3.0 mm C18 Infinity Lab Poroshell packed with 2.7 μm particles. The mobile phases were (A) 0.085% H₃PO₄ in water and (B) 0.085% H₃PO₄ in acetonitrile, using isocratic 30% (A): 70% (B) applied from Thongchin et al., 2021.⁽¹²⁾ The sample was prepared by weighing 20 mg of the extract and then adding methanol:chloroform (9:1) 10 mL in a volumetric flask. The portion of 1 mL solution was adjusted to 10 mL with methanol in a volumetric flask and filtered with a 0.45 μm nylon syringe filter

before analysing by HPLC. The standards of THC, THCA, CBD and CBDA were prepared and diluted in methanol at concentrations between 3.125–100 µg/mL. The crude extract and the quality control data were conducted at the Herbal Quality Assurance Center, Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences.

MTT Assay

A total of 10 mg of TRD1, THC and CBD was dissolved in DMSO to provide 10 mg/mL of stock solutions. Then the solutions were diluted to 1,000 µg/mL with the culture medium as a working solution. The cells were seeded at 5×10^3 cells in 100 µL medium per well of 96-well plates and left in the incubator for 24 hours. The medium was removed and the cells were treated with eight different concentrations of each compound in triplicate and then incubated for 48 hours. The medium was replaced with 200 µL MTT reagent and then continued to incubate for 4 hours. The MTT solution was discarded and 200 µL DMSO was added to each well to dissolve the purple formazan product. The absorbance of the formazan product of viable cells was read using the microplate reader at 570 nm. The background absorbance was reduced by the blank and %viability was calculated compared to the control.

Quantification of Apoptosis

A total of 10 mg of TRD1, THC and CBD was dissolved in DMSO to provide 10 mg/mL of stock solutions. Then the solutions were diluted to 1 mg/mL with the culture medium as a working solution. MCF-7 cells were seeded at 2×10^5 cells in 3 mL in 6-well plates and treated with CBD, THC and TRD1 at

different concentrations for 24 hours. The cells were trypsinised and washed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS), and then 1×10^6 cells/mL were resuspended in 100 µL 1X annexin-binding buffer. Total 5 µL Alexa Fluor 488 annexin V and 1 µL 100 µg/mL propidium iodide (PI) working solution were added. The cells were gently mixed and incubated in the dark for 15 min at room temperature. Finally, 400 µL of binding buffer was then added to each tube and the apoptotic cells quantified using Attune™ NxT, Acoustic Focusing Cytometer (Thermo Fisher Scientific, Singapore) within 1 hour of harvesting. Cells that stained positive for FITC annexin V and negative for PI were undergoing early apoptosis. Cells stained positive for both FITC annexin V and PI were in the late apoptosis. Cells were positive for PI but negative for FITC annexin V were undergoing necrosis or were already dead. Whereas the cells that stained negative for both FITC annexin V and PI were alive.

Caspase-3 Expression

A total of 10 mg of THC and CBD were dissolved in DMSO to provide 10 mg/mL of stock solutions. Then the solutions were diluted to 1 mg/mL with the culture medium as a working solution. Active caspase-3 staining was performed following the manufacturer's instructions (PE active caspase-3 apoptosis kit, BD biosciences, San Diego, CA, USA). Total 5×10^5 cells of MCF-7 were treated with different concentrations of the compounds for 24 hours. The cells were harvested and washed with ice-cold PBS. The washed cells were resuspended in 0.5 mL BD Cytofix/Cytoperm™ solution and incubated on ice

for 20 min. After that the buffer was removed, the cells were washed twice with 0.5 mL BD Perm/Wash™ buffer at room temperature. Then, the cells were resuspended with 100 µL BD Perm/wash™ buffer plus 20 µL antibody and incubated for 30 min at room temperature. Finally, the cells were washed with 1 mL washing buffer and resuspended in 0.50 mL washing buffer. The cells were maintained at 4°C until analyzed by a flow cytometer.

Nuclear morphological detection using Hoechst 33342 staining

The nuclear morphological changes of chromatin condensation induced by CBD and THC were examined using Hoechst 33342 staining (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland). The protocol was followed according to the manufacturer's instructions. Briefly, the cells were treated with different concentrations of CBD and THC in 6-well plates for 24 hours. The 10 mg/mL Hoechst stock solution was prepared and diluted with PBS (1:2,000). The medium was removed from each well and then 500 µL of the dye

working solution was added. The plate was then incubated at 37°C for 10 min. The cells were then washed with 1 mL PBS 3 times. The cells were viewed under the fluorescence microscope (Nikon Eclipse Ti2-E, Tokyo, Japan).

Statistical Analysis

The inhibitory concentration (IC_{50}) was calculated using nonlinear regression analysis (curve fit) (GraphPad Software, La Jolla, CA, United States) and expressed as mean±SD ($n = 3$). The total percentage of the cell population in apoptosis and caspase-3 assays was expressed as a mean of duplicated experiments.

Results

A total of 100 g of the crude drug yielded 7.07 g of the crude extract following extraction. From the result of HPLC analysis, it was found that TRD1 contained THC, THCA, CBD, and CBDA compounds as 1.51 ± 0.01 , 3.16 ± 0.01 , 4.25 ± 0.03 , and 24.67 ± 0.16 %w/w, respectively. The chromatogram of TRD1 is shown in Figure 1. Therefore, this extract provided the CBDA enriched extract.

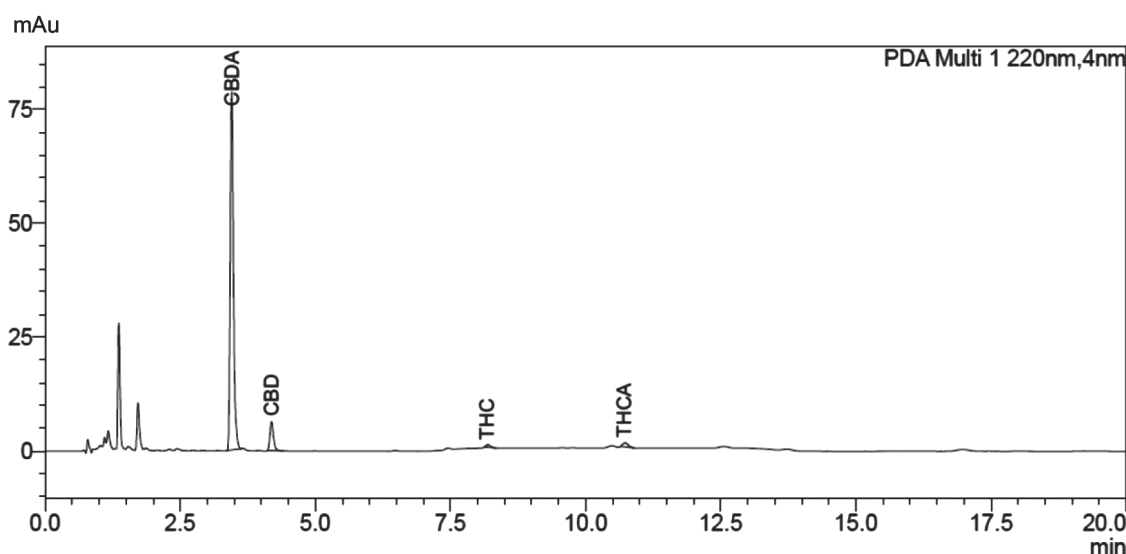


Figure 1 Chromatogram of TRD1 extract (0.200 mg/mL), detected at 220 nm.

The anti-proliferation activity evaluated using MTT assay gave results that TRD1 possessed cytotoxicity against MCF-7, HepG2, PANC-1 and A-549 cell lines with IC_{50} of 2.81 ± 0.85 , 7.65 ± 0.49 , 23.40 ± 0.88 , and 26.90 ± 2.27 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The two cannabinoids, CBD and THC also showed cytotoxicity consistent with TRD1 extract. CBD posed potent cytotoxicity against MCF-7 and HepG2 with IC_{50} of 2.69 ± 0.20 and 2.93 ± 0.30 $\mu\text{g/mL}$,

respectively, whereas, THC were 4.51 ± 0.19 and 5.73 ± 0.40 $\mu\text{g/mL}$, respectively. MCF-7 was susceptible and gave the lowest IC_{50} to three compounds. The IC_{50} of TRD1 was not significantly different to CBD ($p = 0.9637$) but significantly different to THC ($p = 0.0160$). The IC_{50} of TRD1, CBD and THC to A-549, Hep G2, MCF-7 and PANC-1 cancer cell lines are shown in Table 1.

Table 1 The 50% inhibitory concentration (IC_{50}) of TRD1, THC, CBD, and doxorubicin against cancer cell lines; A-549, HepG2, MCF-7, and PANC-1. The data was expressed as the mean $\pm$ SD, n = 3.

Cell lines	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)			
	TRD1	CBD	THC	Doxorubicin
A-549	26.90 ± 2.27	4.76 ± 1.05	8.03 ± 1.02	0.18 ± 0.04
Hep G2	7.65 ± 0.49	2.93 ± 0.30	5.73 ± 0.40	0.15 ± 0.03
MCF-7*	$2.81\pm0.85^{(a)}$	$2.69\pm0.20^{(b)}$	$4.51\pm0.19^{(c)}$	0.10 ± 0.01
PANC-1	23.40 ± 0.88	5.82 ± 0.26	7.82 ± 0.18	0.31 ± 0.01

*Statistical analysis was carried out using One-way ANOVA analysis of variance followed by Tukey's multiple comparison test; a vs bns p -value = 0.9637, a vs c * p -value = 0.0160, b vs c * p -value = 0.0121

Apoptosis induction of TRD1 was investigated using flow cytometry. Apoptosis was induced in MCF-7 cells in a dose-dependent manner. The total cell populations (%) of apoptotic cells were 13.30 ± 0.27 , 4.27 ± 0.09 , 1.89 ± 0.04 and $0.86\pm0.02\%$ at 20.0, 10.0, 5.0 and 2.5 $\mu\text{g/mL}$, respectively (Figure 2). While there were 3.86 ± 0.08 and $3.79\pm0.08\%$ of the cell population in necrosis at the concentration of 20.0 and 10.0 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The percentage of living cells was higher than 80% in all treated groups.

Pure CBD and THC were also investigated for their ability to induce apoptosis. CBD was found to induce apoptosis in a dose-dependent

manner, with the cell population in apoptosis being 7.10 ± 0.03 , 2.16 ± 0.04 and $0.96\pm0.00\%$ at the concentrations of 8.0, 4.0 and 2.0 $\mu\text{g/mL}$, respectively (Figure 3). The result of necrotic cells was $3.16\pm0.80\%$ at 8.0 $\mu\text{g/mL}$ while using other doses, necrotic cells were relatively low, which was $0.39\pm0.10\%$ at 4.0 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 3). A total of cells ($84.86\pm2.19\%$) was alive at 8.0 $\mu\text{g/mL}$, which was increased to more than 97% at 4.0 $\mu\text{g/mL}$. THC induced apoptosis as $9.05\pm0.26\%$ of cells at 10.0 $\mu\text{g/mL}$, while $7.02\pm2.24\%$ of the cell population was found to be dead at this dose (Figure 4). Cell viability remained above 80% in all concentrations treated (Figure 4).

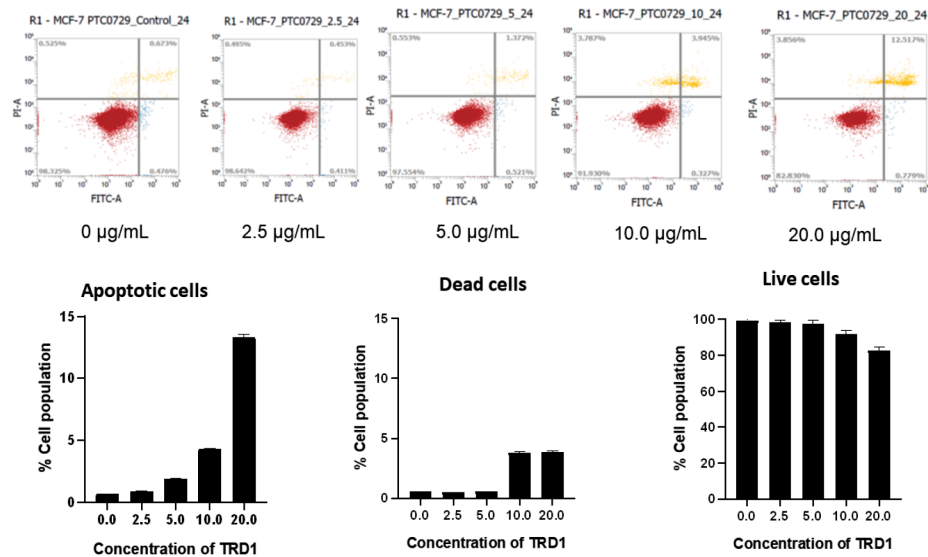


Figure 2 Detection of apoptosis using flow cytometry in MCF-7 cells following treatment with TRD1. Bar graphs showed the percentage of MCF-7 cells which were alive, dead or in apoptosis, following treatment with TRD1 at 2.5, 5.0, 10.0 and 20.0 µg/mL for 24 hours. The data were expressed as the mean, n = 3.

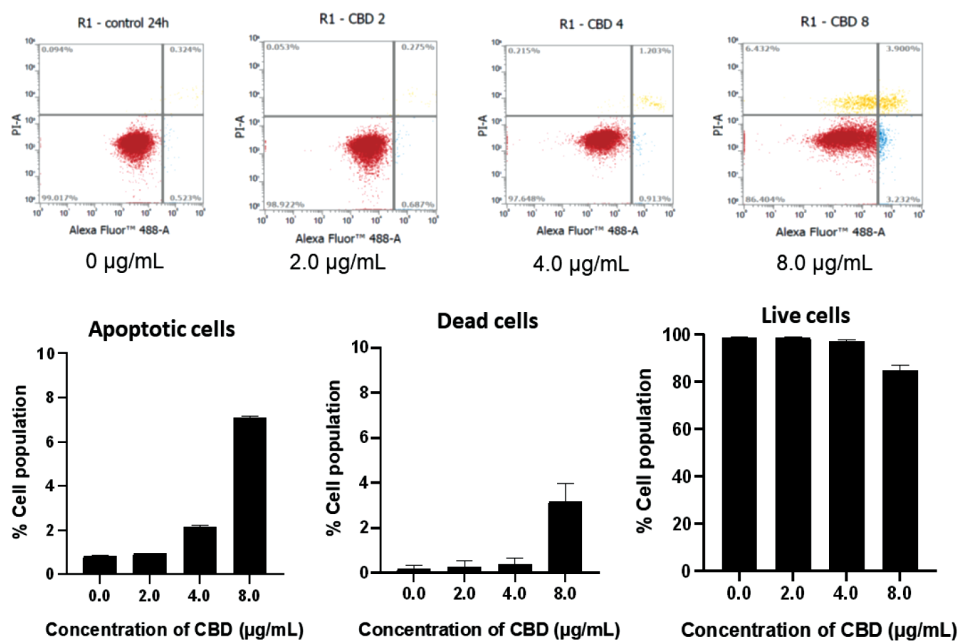


Figure 3 Detection of apoptosis using flow cytometry in MCF-7 cells following treatment with CBD. Bar graphs showed the percentage of MCF-7 cells which were alive, dead or in apoptosis, following treatment with CBD at 0, 2.0, 4.0 and 8.0 µg/mL for 24 hours. The data were expressed as the mean, n = 3.

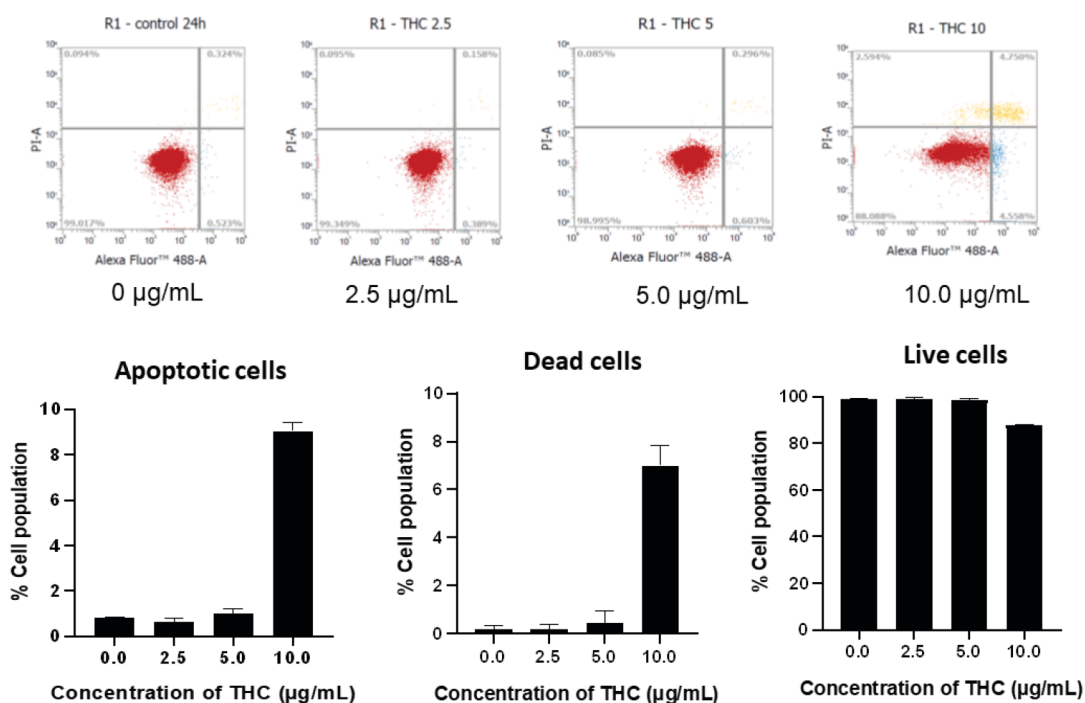


Figure 4 Detection of apoptosis using flow cytometry in MCF-7 cells following treatment with THC. Bar graphs showed the percentage of MCF-7 cells which were alive, dead or in apoptosis, following treatment with THC at 0, 2.5, 5.0, and 10.0 µg/mL for 24 hours. The data were expressed as the mean, $n = 3$.

The apoptotic executioner protein, caspase-3, was also determined using an anti-active caspase-3 antibody conjugated with PE. MCF-7 cells treated with different concentrations of CBD at 0, 2.0, 4.0 and 8.0 µg/mL for 24 hours showed a slight increase of caspase-3 expression compared to control. The total of the cell population ($2.29 \pm 0.05\%$) was caspase-3 positive at 8.0 µg/mL. For THC, MCF-7 cells treated with different concentrations at 0, 2.5, 5.0, and 10.0 µg/mL respectively, in the same manner as CBD. It was shown that the total of the cell population was caspase-3 positive ($11.29 \pm 0.05\%$) at 10.0 µg/mL, with lower caspase-3 expression about 0.2% at 2.5 and 5.0 µg/mL (Figure 5).

Chromatin condensation was one of the apoptotic morphological features induced following treatment. MCF-7 cells were investigated for nuclear and chromatin changes following exposure to CBD and THC (Figure 6). CBD at the concentration of 8.0 µg/mL was found to cause chromatin condensation. THC-treated cells also presented condensed chromatin at 10.0 µg/mL.

Discussion

TRD1 was extracted from the female inflorescences of the Thai cannabis (*Cannabis sativa* L. cultivar Tanao Sri Kan Dang RD1) containing the content of CBDA at 24.67% w/w and CBD at 4.25 %w/w. CBDA has also been

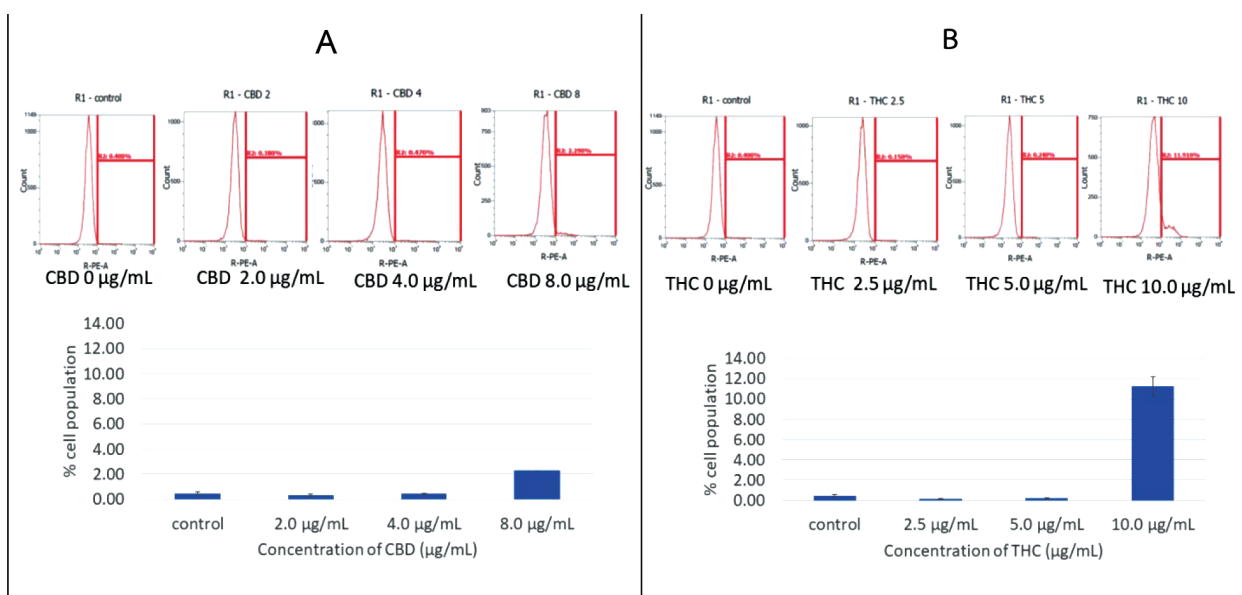


Figure 5 Caspase-3 expression in MCF-7 cells following exposure to various concentrations of CBD (A) and THC (B) for 24 hours. Cells were stained with anti-active caspase-3 antibody and analyzed by flow cytometry. Data were the mean, $n = 3$.

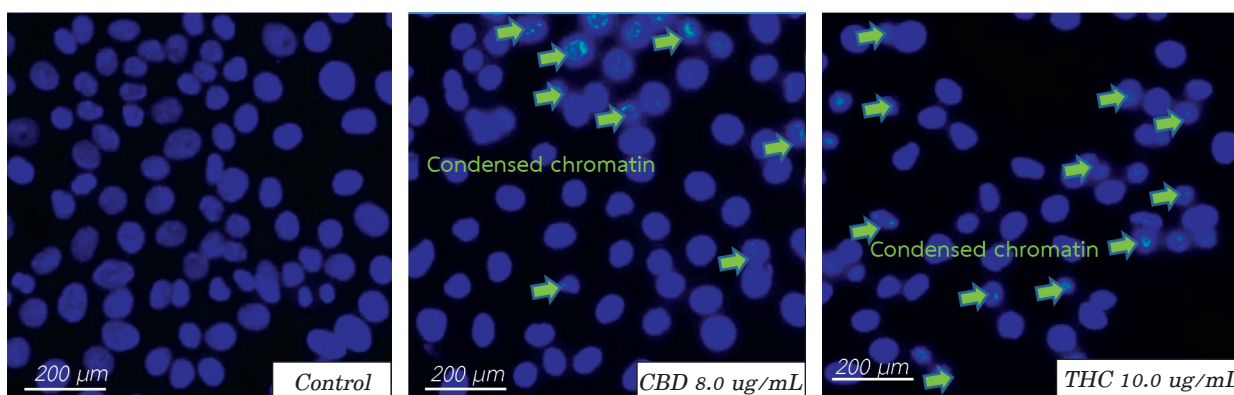


Figure 6 MCF-7 cells treated with CBD 8.0 µg/mL and THC 10.0 µg/mL for 24 hours and then stained with Hoechst 33342 for chromatin condensation. Magnification $\times 20$; scale bars at 200 µm. The bright green arrows indicate condensed chromatin.

reported at the highest constituents (more than 80%) of the cannabinoids extracted from inflorescences of industrial hemp using Supercritical fluid extraction (SFE)⁽¹³⁾ that could be decarboxylated by heating or oxidizing and transformed into CBD.⁽¹⁴⁾ This cannabis cultivar presented CBDA and CBD contents higher than some other cultivars such as CBD therapy (10 %w/w), Candida (CD-1)

(11-20 %w/w), Juanita La Lagrimosa (7-8 %w/w).⁽¹⁵⁾ The extract possessed potent cytotoxicity against breast cancer (MCF-7) and hepatic cancer cell lines (HepG2) consistent with previous studies.⁽¹⁶⁾ CBDA in TRD1 extract may contribute to the inhibition and present as an active compound, which was reported to inhibit migration of highly invasive MDA-MB-231 human breast cancer cells.⁽¹⁷⁾

CBD and THC are cannabinoids, which are known to be the main constituents in this plant. The results showed that CBD was more active against the cancer cell lines than THC (Table 1). The anti-proliferative property of CBD has been previously demonstrated in several human breast cancer cell lines including MCF-10A, MDA-MB-231, MCF-7, SK-BR-3, ZR-7-1, and the PC-3 prostate cancer cells.⁽¹⁸⁾ Crude extract of cannabis and its main compound CBD had also been found to be active on different cervical cancer cell lines and to pose cytotoxicity to breast cancer cell lines including EVSA-T, MDA-MB-231, MDA-MB-468 and SKBr3 cells.⁽¹⁹⁾ Since CBDA and THCA were not stable, thus, CBD and THC were selected to study instead.

MCF-7 cells, the most susceptible to the compounds, therefore, were chosen to investigate apoptosis induction in this study. Cells were exposed to compounds for 24 hours to investigate the induction of apoptosis. TRD1 induced apoptosis in a dose-dependent manner. Similarly, CBD and THC also induced apoptosis dose-dependent relationship. CBD and THC had been previously reported to initiate apoptosis via activation of the cannabinoid receptor (CB). However, CBD had been reported to exert this effect independently on CB1/CB2 receptors.⁽⁶⁾ CBD was also reported to induce intrinsic and extrinsic apoptosis consistent with a previous study that coexisted with autophagy by inhibiting AKT and mTOR signalling.⁽²⁰⁾ THC also was reported to show anti-proliferative activity through activation of CB2 cannabinoid receptors, blocking the progression of the cell cycle and inducing apoptosis.⁽²¹⁾ TRD1 extract showed the anti-

proliferative property and induced apoptosis in the same manner as CBD did. The cytotoxic property of TRD1 might be the effect of CBDA.⁽¹⁷⁾ However, apoptosis induction might be influenced not only by CBDA but also by its derivatives, THC and others.^(6,20,21) THC induced apoptosis and was likely to induce necrotic dead cells at the high dose of 10.0 µg/mL. Therefore, CBD mostly caused cell death by apoptosis induction while THC at high dose caused damage to the cell membrane, necrosis induction combined with apoptosis.

Caspases play an effective role in the execution of apoptosis either through the extrinsic or intrinsic pathway.⁽¹⁰⁾ In this study, caspase-3 enzyme was analyzed following treatment with CBD or THC for 24 hours. CBD and THC at high concentration of 8.0 and 10.0 µg/mL, respectively, activated caspase-3 protein. Caspase-3 protein induced by CBD was lower than the induction induced by THC. However, THC was reported to inhibit Fas-induced caspase-3 activity in A-549 cells without directly affecting the caspase-3 enzyme.⁽²²⁾ Apoptosis induction of CBD and THC in MCF-7 cells was characterized by morphological changes. The events included condensation of chromatin and formation of apoptotic blebs within the plasma membrane, cell shrinkage due to the leakage of organelles in the cytoplasm as well as the presence of bright blue stained cells at high concentrations. The CBD-treated cells were observed to display chromatin condensation in some cells. Chromatin condensation and the formation of apoptotic blebs within the plasma membrane of apoptotic cells induced by CBD and CBD-enriched cannabis extracts had been previously reported in Cervical cancer cell lines.⁽¹³⁾

Thai CBDA-enriched cannabis extract, TRD1, and CBD played a major non-psychoactive constituent of cannabis, providing anti-proliferative properties in several cancer cell lines. The crude extract and CBD also induced apoptosis induction. These compounds should be considered as a potential candidate for cancer drug development.

Conclusion

Thai cannabis extract, TRD1, CBD and THC displayed anti-proliferative properties against A-549, HepG2, PANC-1 and MCF-7 cancer cell lines. TRD1 extract at 2.5, 5.0, 10.0 and 20.0 µg/mL showed anti-proliferative property and induced apoptosis in the dose-dependent relationship as same as CBD at 2.0, 4.0, 8.0 µg/mL in MCF-7 cells. THC induced apoptosis to the same extent as necrosis at the high dose (10 µg/mL). CBD and THC moderated caspase-3 protein expression and induced chromatin condensation.

Acknowledgement

This research was supported by the Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health.

References

1. McPartland JM. Cannabis systematics at the levels of family, genus, and species. *Cannabis Cannabinoid Res* 2018; 3(1): 203-12.
2. Saepae P. Get to know Thai marijuana and its medical purpose use. [online]. 2022; [cited 2022 Sep 20]; [10 screens]. Available from: URL: <https://science.mahidol.ac.th/simple-science/2022/04/21/know-about-thai-cannabis>.
3. Small E, Cronquist A. A practical and natural taxonomy for Cannabis. *Taxon* 1976; 25: 405-35.
4. Bonini SA, Premoli M, Tambaro S, Kumar A, Maccarinelli G, Memo M, Mastinu A. Cannabis sativa: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. *J Ethnopharmacol* 2018; 227: 300-15.
5. 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).
6. Daris B, Verboten MT, Knez Z, Ferik P. Cannabinoids in cancer treatment: therapeutic potential and legislation. *Bosnian J Basic Med Sci* 2019; 19(1): 14-23.
7. Zhelyazkova M, Kirilov B, Momekov G. The pharmacological basis for application of cannabidiol in cancer chemotherapy. *Pharmacia* 2020; 67(4): 239-52.
8. Pfeffer CM, Singh ATK. Apoptosis: a target for anticancer therapy. *Int J Mol Sci* 2018; 19(2): 448. (10 pages).
9. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646-74.
10. Kruidering M, Evan GI. Caspase-8 in apoptosis: the beginning of "the end"? *IUBMB Life* 2000; 50(2): 85-90.
11. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun* 2005; 73(4): 1907-16.
12. Thongchin T, Marsud S, Thiemthieprat P, Ruengkhet S, Ontong S, Banyati P, et al. Development and method validation of cannabinoid contents in cannabis sativa L. leaves by ultra high performance liquid chromatography. *Bull Med Sci* 2021; 63(3): 506-23.

13. Jokić S, Jerković I, Pavić V, Aladić K, Molnar M, Kovač MJ, et al. Terpenes and cannabinoids in supercritical CO₂ extracts of industrial hemp inflorescences: optimization of extraction, antiradical and antibacterial activity. *Pharmaceuticals* 2022; 15(9): 1117. (21 pages).
14. Radapong S, Suppajariyawat P, Phadungkit. M. Pharmacological and toxicological effects of cannabis. *Bull Med Sci.* 2020; 62(1): 219–32.
15. Suwan W. A variety of cannabis species. [online]. 2022; [cited 2022 Jan 17]; [4 screens]. Available from: URL: <https://erp.mju.ac.th/articleDetail.aspx?qid=1065>.
16. Radapong S, Suppajariyawat P, Sahad T, Harnkit N, Phankhajon K, Primprai P, et al. Investigation of the cytotoxicity of Thai cannabis extracts on various cancer cell lines. *Bull Med Sci* 2021; 63(3): 456–66.
17. Takeda S, Okajima S, Miyoshi H, Yoshida K, Okamoto Y, Okada T, et al. Cannabidiolic acid, a major cannabinoid in fiber-type cannabis, is an inhibitor of MDA-MB-231 breast cancer cell migration. *Toxicol Lett* 2012; 214(3): 314–9.
18. Alexander A, Smith PF, Rosengren RJ. Cannabinoids in the treatment of cancer. *Cancer Lett* 2009; 285(1): 6–12.
19. Lukhele ST, Motadi LR. Cannabidiol rather than Cannabis sativa extracts inhibit cell growth and induce apoptosis in cervical cancer cells. *BMC Complement Altern Med.* 2016; 16(1): 335. (16 pages).
20. Shrivastava A, Kuzontkoski PM, Groopman JE, Prasad A. Cannabidiol induces programmed cell death in breast cancer cells by coordinating the cross-talk between apoptosis and autophagy. *Mol Cancer Ther* 2011; 10(7): 1161–72.
21. Caffarel MM, Sarrió D, Palacios J, Guzmán M, Sánchez C. Delta9-tetrahydrocannabinol inhibits cell cycle progression in human breast cancer cells through Cdc2 regulation. *Cancer Res* 2006; 66(13): 6615–21.
22. Sarafian TA, Tashkin DP, Roth MD. Marijuana smoke and Delta(9)-tetrahydrocannabinol promote necrotic cell death but inhibit Fas-mediated apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001; 174(3): 264–72.

ฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส ในเซลล์มะเร็งของสารสกัดกัญชาพันธุ์ตะนาวศรี ก้านแดง อาร์ดี วัน

ศรายุทธ ระดาพงษ์¹ ณฐภัทร หาญกิจ¹ ตีญานี สาหัด¹ พรราว ศุภจริยาวัตร¹ เสกขชกร บัวเบา¹
พรชัย สันเจริญโกโคย¹ ศิริวรรณ ชัยสมบุรณ์พันธ์¹ และ Kenneth J Ritchie²

¹สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จังหวัดนนทบุรี 11000

²Centre for Natural Products Discovery, School of Pharmacy and Biomolecular Sciences, มหาวิทยาลัย
Liverpool John Moores, Byrom Street, ลิเวอร์พูล L3 3AF สหราชอาณาจักร

บทคัดย่อ กัญชาออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งหลายชนิด ยังไม่มีรายงานกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดกัญชาไทยพันธุ์ตะนาวศรี
ก้านแดง อาร์ดี วัน (*Cannabis sativa* L. cultivar Tanao Sri Kan Dang RD1) การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษา
ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งและการเหนี่ยวนำการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสของสารสกัดกัญชาพันธุ์ตะนาวศรีก้านแดง
อาร์ดี วัน (TRD1) cannabidiol (CBD) และ Δ 9-tetrahydrocannabinol (THC) สารสกัดหยาบกัญชา TRD1
ถูกสกัดจากช่อดอกตัวเมียของกัญชาโดยใช้วิธีของไหลวิกฤตยิ่งยวด วิเคราะห์ปริมาณ CBD และ THC ในสารสกัดด้วย
วิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงด้วยวิธี MTT assay
พบว่า TRD1, CBD และ THC ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7, Hep G2, PANC-1 และ A-549 โดย TRD1, CBD
และ THC มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง MCF-7 มากที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.81, 2.69 และ 4.51 μ g/mL ตามลำดับ
สารสกัด TRD1 ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งและเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิส ในลักษณะแปรผันตามความเข้มข้น
ของสาร (2.5–10.0 μ g/mL) เช่นเดียวกับ CBD (2.0–8.0 μ g/mL) ส่วน THC ที่ความเข้มข้น 100 μ g/mL เหนี่ยวนำ
ให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสในระดับที่ใกล้เคียงกับเนโครซิส นอกจากนี้พบว่า CBD และ THC กระตุ้นการแสดงออก
ของโปรตีน caspase-3 และการรวมตัวของโครมาตินของเซลล์ MCF-7 ผลการศึกษากัญชาพันธุ์ไทย
เหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสของ TRD1, CBD และ THC แสดงถึงศักยภาพในการพัฒนากัญชาพันธุ์ไทย
เป็นยาต้านมะเร็งต่อไป อย่างไรก็ตามควรศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยาในสัตว์ทดลอง เพื่อให้ทราบประสิทธิภาพและ
ความปลอดภัยสำหรับการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ยาในอนาคต

คำสำคัญ: สารสกัดกัญชา, ตะนาวศรีก้านแดง อาร์ดี วัน, อะพอพโทซิส, Cannabidiol, Δ 9-tetrahydrocannabinol

การวัดความเข้มแสงไฟของคอลลิเมเตอร์ หลอดเอกซเรย์ด้วยแอปพลิเคชันบนสมาร์ทโฟน

สินีพร จันทรสว่าง¹ และ คทายุทธ นิภาพฤกษ์²

¹สำนักรังสีและเครื่องมือแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

²ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1/1 เชียงราย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เชียงราย 57100

บทคัดย่อ แสงไฟของหลอดเอกซเรย์จากส่วนของคอลลิเมเตอร์ (collimator) ที่ใช้ในการกำหนดพื้นที่ของลำรังสี จำเป็นต้องมีการตรวจสอบความเข้มแสงไฟให้ได้ตามมาตรฐาน ในปัจจุบันมีการใช้งานแอปพลิเคชันวัดความเข้มแสงไฟบนสมาร์ทโฟนที่สามารถดาวน์โหลดโดยไม่เสียค่าใช้จ่ายบนโทรศัพท์มือถือ เพื่อแก้ไขปัญหาการขาดแคลนเครื่องมือวัดแสงภายในโรงพยาบาล งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการวัดความเข้มแสงไฟของหลอดเอกซเรย์ด้วยแอปพลิเคชันวัดความเข้มแสงบนสมาร์ทโฟน จำนวน 3 แอปพลิเคชัน ได้แก่ Smart Luxmeter (Smart Tools co.) Lux Meter (Light Meter) (My Mobile Tools Dev) และ Lux Meter (KHTSXR) โดยเปรียบเทียบผลกับเครื่องวัดแสงอ้างอิงที่ผ่านมาตรฐาน (Yokogawa รุ่น 51001) ผลการทดสอบแอปพลิเคชันวัดแสงไฟจากหลอดไฟชนิดไดโอดเปล่งแสง (light emitting diode: LED) พบว่าทั้ง 3 แอปพลิเคชัน สามารถวัดค่าความเข้มแสงได้ใกล้เคียงกับเครื่องวัดแสงอ้างอิง โดยความคลาดเคลื่อนระหว่าง 0.9-1.4% การนำแอปพลิเคชันวัดแสงไปประยุกต์ทดสอบกับแสงไฟของคอลลิเมเตอร์ หลอดไฟเอกซเรย์ที่ระยะห่าง 1 เมตร พบว่าแอปพลิเคชันวัดแสง มีค่าความคลาดเคลื่อนเฉลี่ยระหว่าง 1.5-5.2% โดยที่แอปพลิเคชัน Lux Meter (KHTSXR) วัดค่าได้ใกล้เคียงกับเครื่องอ้างอิงมากที่สุด และเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับที่กำหนดในมาตรฐานคุณภาพเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ดังนั้น ในการตรวจวัดแสงเบื้องต้น ด้วยแอปพลิเคชันวัดแสงที่ได้รับการสอบเทียบแล้วสามารถนำมาทดแทนเครื่องวัดแสงได้

คำสำคัญ: ความเข้มแสงไฟ, แอปพลิเคชันสมาร์ทโฟน, แสงไฟหลอดเอกซเรย์

Corresponding author E-mail: sineeporn.j@dmsc.mail.go.th

Received: 28 July 2022

Revised: 6 February 2023

Accepted: 7 February 2023

บทนำ

หลอดไฟมีหลักการเปลี่ยนพลังงานไฟฟ้าเป็นพลังงานแสง ช่วยให้มีความสว่างในบริเวณที่ต้องการได้อย่างทั่วถึง ความเข้มแสงที่มากหรือน้อยเกินไปจะทำให้เกิดความไม่สบายตา ส่งผลให้กล้ามเนื้อตาทำงานหนัก มีผลต่อสุขภาพและมีโอกาสกระทบกับผู้ป่วยปฏิบัติงาน⁽¹⁾ จากงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับเครื่องมือวัดความสว่างของแสงไฟโดยใช้สมาร์ตโฟนเป็นอุปกรณ์วัดค่าความเข้มแสง Gutierrez-Martinez JM และคณะ⁽²⁾ ได้ศึกษาการใช้สมาร์ตโฟนเป็นเครื่องวัดความเข้มแสงโดยใช้วิธีการตรวจวัด 3 รูปแบบ คือ การใช้เซนเซอร์วัดแสง (ambient light sensor) การใช้กล้องดิจิทัล (digital camera) และ external bluetooth luxmeter พบว่าวิธีการตรวจวัดทั้ง 3 รูปแบบ ให้ค่าที่มีความถูกต้อง สามารถเทียบได้กับเครื่องมือที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว Cerqueira D และคณะ⁽³⁾ ได้ทดสอบความเหมาะสมในการใช้สมาร์ตโฟนสำหรับวัดความสว่างในงานด้านอาชีวอนามัยและความปลอดภัย พบว่าข้อมูลมีค่าการแปรปรวน หากไม่มีการกำหนดเงื่อนไขที่ชัดเจน DIAL Gmb H⁽⁴⁾ ได้ศึกษาเปรียบเทียบความสว่างของแสงระหว่างแอปพลิเคชันในสมาร์ตโฟนและเครื่องมือวัดแสงมาตรฐาน ทั้งในระบบ iOS, Android และ Windows Phone โดยมีการเลือกโหลดแอปพลิเคชันที่สามารถโหลดได้โดยไม่เสียค่าใช้จ่ายเป็นส่วนใหญ่ โดยใช้เครื่องมือวัดแสงอ้างอิง illuminance meter (PRC Krochmann, รุ่น 106e) พบว่าแอปพลิเคชันวัดความสว่างของแสงนี้สามารถนำไปใช้งานแบบเบื้องต้นได้ งานวิจัยเหล่านี้แสดงให้เห็นว่ามีการนำสมาร์ตโฟนมาประยุกต์ใช้งานเป็นเครื่องมือวัดค่าความเข้มแสงได้

เครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยเป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับสร้างภาพเพื่อช่วยให้แพทย์สามารถวินิจฉัยโรคเครื่องเอกซเรย์ประกอบด้วย อุปกรณ์จำกัดลำรังสีหรือคอลลิเมเตอร์ อยู่บริเวณส่วนล่างของหลอดเอกซเรย์ทำหน้าที่กำหนดขอบเขตของลำรังสีที่ปล่อยออกให้เหมาะสมกับอวัยวะที่ต้องการถ่ายภาพ เนื่องจากลำรังสีไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า จึงมีลำแสงไฟมาช่วยในการกำหนดพื้นที่ของลำรังสีและระบุตำแหน่งที่ต้องการถ่ายภาพ ลำแสงไฟจึงไม่ควรมีความเข้มแสงที่

ต่ำกว่ามาตรฐาน เพราะมีโอกาสทำให้เกิดความผิดพลาดและต้องถ่ายภาพซ้ำ มีผลทำให้ผู้ป่วยได้รับรังสีเกินความจำเป็น อีกทั้งยังเพิ่มค่าใช้จ่ายทั้งของผู้ป่วยและของโรงพยาบาลมากขึ้นด้วย⁽⁵⁾ จึงเป็นเหตุผลให้มีการวัดความเข้มแสงของลำแสงไฟของหลอดเอกซเรย์เป็นประจำ โดยค่าความเข้มแสงไฟของหลอดเอกซเรย์เป็นหนึ่งในข้อกำหนดตามมาตรฐานคุณภาพเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทางการแพทย์ ต้องมีความสว่างไม่น้อยกว่า 100 ลักซ์ที่ระยะห่าง 1 เมตร ผู้ครอบครองหรือใช้งานเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทางการแพทย์ ต้องปฏิบัติตามข้อกำหนดของกฎหมายให้เป็นมาตรฐานเดียวกันทั่วประเทศ⁽⁶⁾ จินดา ทองเรือง⁽⁷⁾ ได้ศึกษาคุณภาพเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยใน 6 จังหวัดภาคกลางของประเทศไทย ระหว่างปีงบประมาณ พ.ศ. 2556-2557 พบว่า เครื่องจำกัดลำรังสี (beam limiting device) ร้อยละ 1.03 ไม่เป็นไปตามข้อกำหนด ส่วนหนึ่งเนื่องจากความเข้มของลำแสงไฟไม่เพียงพอ อาจเกิดจากอายุการใช้งานและความบกพร่องของเครื่องเอกซเรย์ และจากรายงานประจำปี 2563 ของงานรังสีและเครื่องมือแพทย์ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 8 อุดรธานี⁽⁸⁾ ซึ่งเป็นหน่วยงานที่ได้รับมอบหมายให้ตรวจสอบคุณภาพเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทางการแพทย์ พบว่ามีเครื่องเอกซเรย์ที่ไม่เข้ามาตรฐานร้อยละ 7.64 สาเหตุหนึ่งเกิดจากเครื่องจำกัดลำรังสีมีค่าความเข้มแสงไม่ตรงตามข้อกำหนด ส่วนหนึ่งมาจากเจ้าหน้าที่ห้องเอกซเรย์ไม่มีเครื่องมือสำหรับตรวจสอบซึ่งเครื่องมือวัดดังกล่าวมีราคาค่อนข้างสูง ทำให้ขาดการตรวจสอบอย่างสม่ำเสมอ ส่งผลให้คุณภาพของเครื่องเอกซเรย์ลดลงและก่อให้เกิดความผิดพลาดในการถ่ายภาพเอกซเรย์

ปัจจุบันมีการใช้งานสมาร์ตโฟนสำหรับติดต่อสื่อสาร เป็นแหล่งความรู้ และนันทนาการ รวมถึงมีแอปพลิเคชันหลากหลายสามารถเลือกใช้ประโยชน์ตามความต้องการ ผู้วิจัยสนใจศึกษาเกี่ยวกับการวัดความเข้มแสงไฟโดยใช้แอปพลิเคชันฟรีบนมือถือสมาร์ตโฟนและประยุกต์ใช้งานแอปพลิเคชันวัดแสงกับหลอดไฟของเครื่องเอกซเรย์จริง เพื่อเพิ่มแนวทางการตรวจสอบคุณภาพหลอดไฟเอกซเรย์ในงานประจำในเบื้องต้น และช่วยลดค่าใช้จ่ายในการจัดซื้อเครื่องมือวัดแสง

วัสดุและวิธีการ

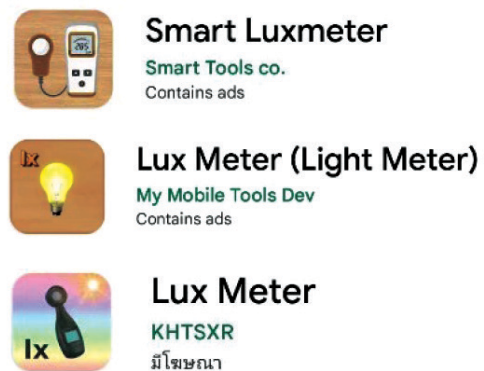
วัสดุเครื่องมือและวิธีทดสอบความเข้มแสงของหลอดไฟ การวัดความเข้มแสงไฟของหลอดเอกซเรย์ โดยใช้แอปพลิเคชันบนสมาร์ทโฟนระบบ Android (ยี่ห้อ SAMSUNG รุ่น Galaxy S7 edge, Vietnam) และใช้เครื่องวัดความเข้มแสงอ้างอิงแบบดิจิทัล (illuminance meter) (Yokogawa รุ่น 51001, Tokyo, Japan) ที่ผ่านมาตรฐานจากห้องปฏิบัติการ สอบเทียบ ค่าความถูกต้อง $\pm 4\%$ ที่ $\leq 3,000$ ลักซ์ ซึ่งมีองค์ประกอบเป็นเซนเซอร์โฟโตอิเล็กทริก แบบ ซิลิคอนโฟโตไดโอด ช่วงสเปกตรัมของแสงที่สามารถ วัดได้ตั้งแต่ช่วง 0-999,000 ลักซ์ เป็นเครื่องวัดแสง-



ภาพที่ 1 (ก) เครื่องวัดความเข้มแสงอ้างอิงแบบดิจิทัล (illuminance meter)

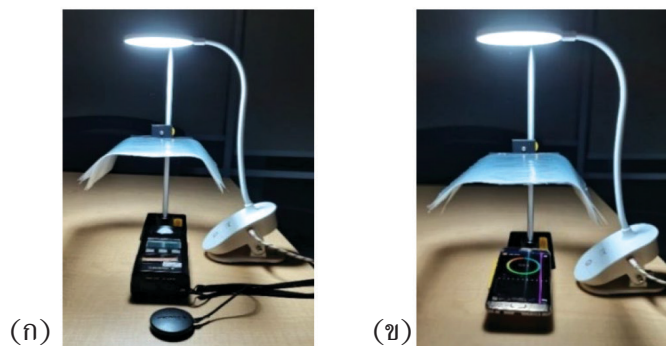
วิธีการทดสอบวัดค่าความเข้มแสงไฟโดยใช้ แหล่งกำเนิดแสงจากหลอด: LED จำนวน 18 ดวง ขนาด 2 วัตต์ (YAGE รุ่น YG-T103, China) ติดตั้ง ให้หลอดไฟอยู่สูงจากเครื่องมือวัดแสง 30 เซนติเมตร และใช้แผ่นพลาสติกใสหนา 0.05 มิลลิเมตร (Elephant, Thailand) สำหรับลดการทะลุผ่านของแสง วางกึ่งกลาง ระหว่างเครื่องวัดแสงอ้างอิงกับหลอดไฟ บันทึกค่า ความเข้มแสงไฟโดยใช้เครื่องวัดแสงอ้างอิง โดยไม่มี วัตถุปิดกั้นจากนั้นจึงเพิ่มแผ่นพลาสติกใสที่ละแผ่น ทั้งหมด 12 แผ่น เพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงของข้อมูล ทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง และหาค่าความเข้มแสงไฟเฉลี่ย หลังจากนั้นทดสอบวัดค่าความเข้มแสงไฟ โดยใช้

อ้างอิง โดยมีลักษณะ ดังแสดงในภาพที่ 1 (ก) และ นำสมาร์ตโฟนดาวน์โหลดแอปพลิเคชันวัดแสงจาก Play store โดยพิจารณาเลือกแอปพลิเคชันที่ไม่เสีย ค่าใช้จ่ายไม่จำเป็นต้องเชื่อมต่ออินเทอร์เน็ตขณะใช้งาน และมีฟังก์ชันปรับค่าแก้ไข (calibration factor) จำนวน 3 แอปพลิเคชัน ได้แก่ Smart Luxmeter (Smart Tools co.) Lux Meter (Light Meter) (My Mobile Tools Dev) และ Lux Meter (KHTSXR) โดยมีคุณสมบัติช่วงของฟังก์ชันค่าแก้ตามข้อกำหนด ทางเทคนิคของแอปพลิเคชัน (specification) คือ 40-400%, 0.0-2.0 และ 0.50-1.50 ตามลำดับ ลักษณะแอปพลิเคชัน ดังแสดงในภาพที่ 1(ข)



ภาพที่ 1 (ข) แอปพลิเคชันวัดแสง

แอปพลิเคชันวัดแสงในสมาร์ตโฟนทั้ง 3 แอปพลิเคชัน โดยวางสมาร์ตโฟนที่ตำแหน่งเดียวกับเครื่องวัดแสง อ้างอิง จัดให้แสงตรงกับตำแหน่งรูรับแสงของสมาร์ตโฟน ปรับค่าแก้ไขในแอปพลิเคชันจนได้ค่าความเข้มแสงใกล้เคียง กับค่าที่วัดได้จากเครื่องวัดแสงอ้างอิง โดยปรับค่า แก้เฉพาะขณะไม่มีแผ่นพลาสติกใสกั้นแสง จากนั้นเพิ่ม แผ่นพลาสติกใสที่ละแผ่นจนครบ 12 แผ่น บันทึกค่า ความเข้มแสงของหลอดไฟ ทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง เช่นเดียวกับ ขั้นตอนใช้เครื่องวัดแสงอ้างอิง นำข้อมูลที่ได้อาวิเคราะห์ ผลเพื่อหาค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างระหว่างเครื่องวัด แสงอ้างอิงและแอปพลิเคชันวัดแสง การติดตั้งเครื่องมือวัดแสง ดังแสดงในภาพที่ 2

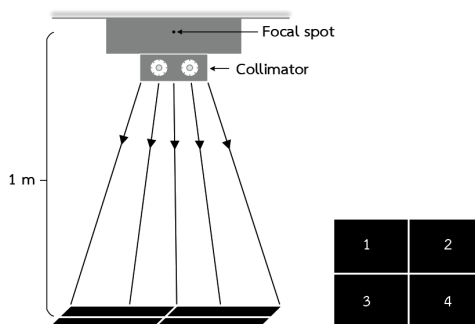


ภาพที่ 2 การทดสอบวัดความเข้มแสงไฟจากหลอด LED (ก) เครื่องวัดแสงอ้างอิง (ข) แอปพลิเคชันวัดแสงจากสมาร์ทโฟน

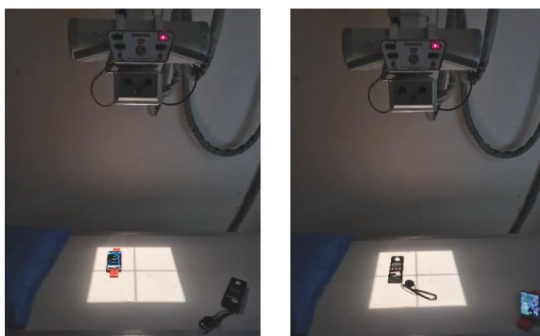
การทดสอบการใช้แอปพลิเคชันวัดลำแสงไฟของเครื่องเอกซเรย์

ทำการทดสอบโดยใช้แอปพลิเคชันวัดแสงไฟใช้งานจริงกับลำแสงไฟของเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทั่วไปที่ติดตั้งในโรงพยาบาลของรัฐและโรงพยาบาลเอกชน ทั้งหมด 3 เครื่อง โดยการวางเครื่องวัดความเข้มแสงไฟบนพื้นเตียง ปรับระยะห่างให้จุดโฟกัสพอดี (focal spot) ของหลอดเอกซเรย์ห่างจากตำแหน่งอ้างอิงของเครื่องมือวัด 1 เมตร และเปิดคอลลิเมเตอร์ขนาด 40×40 เซนติเมตร ปิดไฟภายในห้องเอกซเรย์เพื่อลดความแปรปรวนของค่าที่วัดได้ บันทึกผลจากการใช้

เครื่องวัดแสงอ้างอิง โดยทำการวัดค่าความเข้มแสงไฟ 4 ตำแหน่ง ณ บริเวณตรงกลางของพื้นที่สี่เหลี่ยมที่ถูกแบ่งออกเป็น 4 ช่องเล็ก ดังแสดงในภาพที่ 3 และมีตัวอย่างการวางตำแหน่ง ดังแสดงในภาพที่ 4 ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ย หลังจากนั้นนำสมาร์ทโฟนวาง ณ ตำแหน่งเดียวกับเครื่องวัดอ้างอิง และปรับค่าภายในแอปพลิเคชัน 1 ครั้ง เพื่อให้ได้ค่าใกล้เคียงกับเครื่องวัดอ้างอิง ก่อนการทดสอบการวัดแสง เช่นเดียวกับเครื่องวัดอ้างอิง จากนั้นนำข้อมูลมาวิเคราะห์ผลและสรุปผลการทดสอบ



ภาพที่ 3 ลักษณะลำแสงไฟของหลอดเอกซเรย์

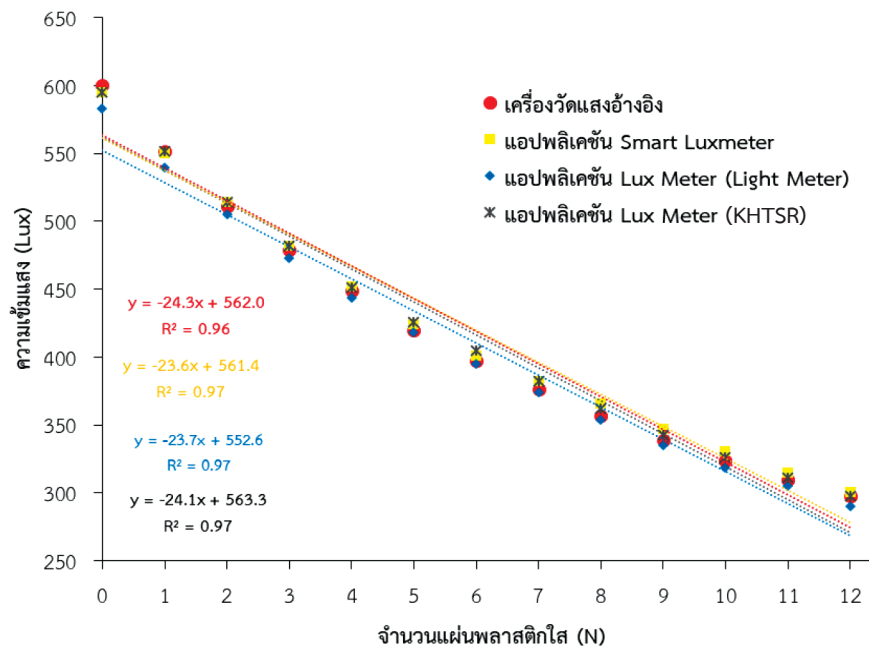


ภาพที่ 4 การวางตำแหน่งการวัดความเข้มแสงจริง

ผล

การทดสอบค่าความเข้มแสงระหว่างใช้เครื่องวัดแสงอ้างอิงและแอปพลิเคชันวัดแสง โดยใช้แสงไฟจากหลอด LED เป็นแหล่งกำเนิดแสง ดังแสดงในภาพที่ 2 ได้ปรับฟังก์ชันค่าแก้ไขของแอปพลิเคชันในสมาร์ตโฟน ให้ค่าความเข้มแสงไฟใกล้เคียงกับเครื่องวัดแสงอ้างอิง

โดยแอปพลิเคชัน Smart Luxmeter แอปพลิเคชัน Lux Meter (Light Meter) และแอปพลิเคชัน Lux Meter (KHTSXR) มีการปรับฟังก์ชันค่าแก้ไขเป็น 70%, 0.7 และ 0.72 ตามลำดับ หลังจากนั้นเพิ่มความหนาของแผ่นพลาสติกเพื่อแปรค่าความเข้มแสงให้มีค่าต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 การแปรค่าความเข้มแสงโดยใช้เครื่องวัดแสงอ้างอิงและแอปพลิเคชันวัดแสง

จากภาพที่ 5 พบว่าค่าความเข้มแสงมีแนวโน้มในทิศทางเดียวกัน โดยความเข้มแสงมีค่าลดลงตามความหนาของวัตถุที่นำมากั้น เมื่อความหนาของวัตถุที่มากขึ้นเพิ่มขึ้น การทะลุผ่านของแสงลดลงทำให้ค่าความเข้มแสงลดลง จากภาพสามารถแสดงสมการเส้นตรงวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้น (linear regression) ของเครื่องวัดแสงอ้างอิงและแอปพลิเคชันวัดแสง โดยที่ค่าความชันของกราฟหรือค่าอัตราค่าเปลี่ยนแปลงของเครื่องวัดแสงอ้างอิง เท่ากับ -24.3 ค่าความชันของแอปพลิเคชัน Smart Luxmeter แอปพลิเคชัน Lux Meter (Light Meter) และแอปพลิเคชัน Lux Meter (KHTSXR) เท่ากับ -23.6, -23.7 และ -24.1 ตามลำดับ การคำนวณหาร้อยละความ

คลาดเคลื่อนเฉลี่ยของทั้ง 3 แอปพลิเคชันเปรียบเทียบกับเครื่องวัดแสงอ้างอิง พบว่าแอปพลิเคชัน Smart Luxmeter แอปพลิเคชัน Lux Meter (Light Meter) และแอปพลิเคชัน Lux Meter (KHTSXR) มีค่าความคลาดเคลื่อนเฉลี่ยเท่ากับ 1.3%, 1.4% และ 0.9% ตามลำดับ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ 0.7, 0.8 และ 0.6 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 แอปพลิเคชัน Lux Meter (KHTSXR) มีค่าเฉลี่ยของความคลาดเคลื่อนต่ำที่สุดเท่ากับ 0.9% สามารถวัดค่าความเข้มแสงได้ใกล้เคียงค่าอ้างอิงมากกว่าแอปพลิเคชัน Smart Luxmeter และแอปพลิเคชัน Lux Meter (Light Meter) ตามลำดับ

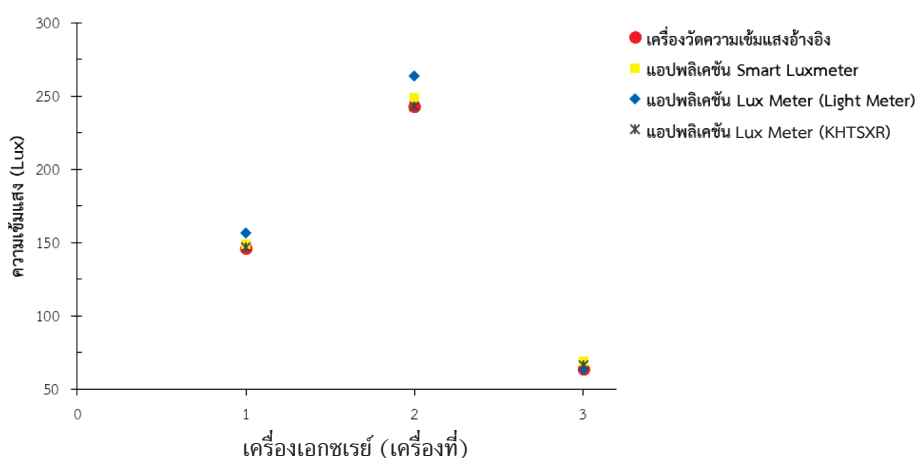
ตารางที่ 1 ค่าความคลาดเคลื่อนเฉลี่ยของแอปพลิเคชันวัดแสงจากหลอดไฟ LED

ชื่อแอปพลิเคชัน	ผู้ผลิต	ค่าปรับแก้* (Calibration factor)	ค่าความคลาดเคลื่อน เฉลี่ย (%)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)
Smart Luxmeter	SMART TOOLS	70%	1.3	0.7
Lux Meter (Light Meter)	My Mobile Tools Dev	0.7	1.4	0.8
Lux Meter	KHTSXR	0.72	0.9	0.6

*ค่าปรับแก้ คือ ฟังก์ชันหนึ่งของแต่ละแอปพลิเคชันที่สามารถกำหนดได้

การนำแอปพลิเคชันวัดแสงไปประยุกต์ใช้งานจริง โดยทดสอบกับแสงไฟจากหลอดเอกซเรย์ของเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทั่วไปทั้งหมด 3 เครื่อง ตามมาตรฐานคุณภาพเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทางการแพทย์ ประเภทเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทั่วไป กำหนดให้ค่าความเข้มแสงต้องมากกว่า 100 ลักซ์ ที่ระยะห่าง 1 เมตร พบว่าทั้ง 3 แอปพลิเคชัน สามารถวัดค่าความเข้มแสงได้ใกล้เคียงกับเครื่องวัดแสงอ้างอิง โดยมีค่าความคลาดเคลื่อน

เฉลี่ยระหว่าง 1.5-5.2% ที่แอปพลิเคชัน Smart Luxmeter มีค่าความคลาดเคลื่อนเฉลี่ย 4% ที่ค่าปรับแก้ 68% แอปพลิเคชัน Lux Meter (Light Meter) มีค่าความคลาดเคลื่อนเฉลี่ย 5.2% ที่ค่าปรับแก้ 0.7 และแอปพลิเคชัน Lux Meter (KHTSXR) มีค่าความคลาดเคลื่อนต่ำสุดเฉลี่ย 1.5% ที่ค่าปรับแก้ 0.66 ผลการทดสอบค่าความเข้มแสงไฟของหลอดเอกซเรย์ ดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 ค่าความเข้มแสงของคอลลิเมเตอร์หลอดไฟเอกซเรย์

วิจารณ์

การทดสอบวัดค่าความเข้มแสงไฟของหลอดไฟ โดยใช้แอปพลิเคชันวัดแสงบนสมาร์ตโฟนเทียบกับเครื่องวัดแสงอ้างอิง พบว่าค่าความเข้มแสงที่วัดได้มีค่าใกล้เคียงกับค่าที่วัดได้จากเครื่องอ้างอิง โดยพิจารณาจากค่าความคลาดเคลื่อนที่วัดได้ และสมการเส้นตรงในการทำนายค่าความเข้มแสงไฟซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน สอดคล้องกับงานวิจัยของสลิลา วิวัฒน์วงศ์ และคณะ⁽⁹⁾ ได้ศึกษา

ความสัมพันธ์ค่าความเข้มแสงสว่างจากเครื่องมือวัดมาตรฐานเทียบกับแอปพลิเคชันในมือถือ พบว่าการคำนวณความเข้มของแสงสว่างจากสมการเส้นตรง โดยสามารถนำแอปพลิเคชันวัดแสงไปใช้งานในระดับงานหยาดถึงงานละเอียดปานกลางได้ งานวิจัยนี้ได้ประยุกต์ใช้งานแอปพลิเคชันวัดแสงจริงกับลำแสงไฟของเครื่องเอกซเรย์ ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า

ทั้ง 3 แอปพลิเคชัน สามารถวัดค่าความเข้มแสงได้ใกล้เคียงกับเครื่องวัดแสงอ้างอิง โดยมีความคลาดเคลื่อนเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 1.5–5.2% เปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Odenwald S⁽¹⁰⁾ ที่ศึกษาเซนเซอร์บนสมาร์ตโฟนของพลเมืองในการใช้งานแอปพลิเคชันวัดแสง พบว่าแอปพลิเคชันมีความแม่นยำ $\pm 12\%$ ซึ่งเหมาะต่อการวัดแสงในเบื้องต้น การศึกษานี้พบว่าแอปพลิเคชัน Lux Meter (KHTSXR) สามารถวัดค่าความเข้มแสงได้ใกล้เคียงกับค่าอ้างอิงที่สุด (ค่าความคลาดเคลื่อนเท่ากับ 1.5%) โดยค่าที่ใช้ในการปรับแก้ของแอปพลิเคชันวัดแสงขึ้นอยู่กับประเภทของหลอดไฟและอายุการใช้งานของคอลลิเมเตอร์และจากข้อมูลเครื่องวัดแสงอ้างอิง มีค่าความถูกต้อง $\pm 4\%$ เมื่อแอปพลิเคชัน Lux Meter รวมกับค่าของเครื่องวัดอ้างอิงจะมีค่าความคลาดเคลื่อน $\pm 4\% + 1.5\%$ ซึ่งมีค่าการยอมรับค่าความคลาดเคลื่อน (maximum permissible error) น้อยกว่า 10% ตามมาตรฐานการเลือกใช้เครื่องมือวัดโดยทั่วไป⁽¹¹⁾ เป็นค่าที่ยอมรับได้และยังสามารถนำแอปพลิเคชัน Lux Meter ไปใช้งานได้จริง

เจ้าหน้าที่ห้องเอกซเรย์สามารถนำแอปพลิเคชันวัดแสงไปใช้งานได้โดยไม่เสียค่าใช้จ่ายและสามารถนำไปวัดความเข้มแสงไฟของคอลลิเมเตอร์ของเครื่องเอกซเรย์ได้เป็นประจำทุกเดือน (monthly check) สำหรับตรวจสอบเครื่องเอกซเรย์เบื้องต้นให้เป็นไปตามมาตรฐานกำหนด คำแนะนำในการใช้งาน ควรใช้สมาร์ตโฟนเครื่องเดิมทุกครั้งในการตรวจสอบเนื่องจากสมาร์ตโฟนแต่ละรุ่นมีลักษณะทางกายภาพต่างกัน เช่น ความสมบูรณ์ ขนาดรูรับแสง การติดฟิล์มรูรับแสง อายุการใช้งานของสมาร์ตโฟนและอื่นๆ ก่อนการนำแอปพลิเคชันวัดแสงไปประยุกต์ใช้งาน ควรปรับเทียบกับเครื่องวัดแสงอ้างอิงเพื่อให้ได้ค่าที่แม่นยำไปใช้งานจริง ป้องกันการคลาดเคลื่อนของผล ควรปรับเทียบค่าอย่างน้อยปีละครั้งตามมาตรฐานวิชาการและการจัดการเครื่องมือวัด เพื่อให้แอปพลิเคชันมีความถูกต้องและแม่นยำ⁽¹²⁾ เนื่องจากแอปพลิเคชันมีการอัปเดตเวอร์ชันอยู่เสมอ ผู้สนใจควรเลือกโหลดแอปพลิเคชันที่สามารถใช้งานได้จริงและเหมาะกับการใช้งานในปัจจุบัน

สรุป

การวัดความเข้มแสงไฟโดยใช้แอปพลิเคชันวัดแสงบนสมาร์ตโฟน สามารถนำมาประยุกต์ใช้งานกับการวัดความเข้มแสงไฟของหลอดเอกซเรย์ได้จริง ซึ่งค่าที่วัดได้ใกล้เคียงกับเครื่องวัดแสงอ้างอิง มีค่าความคลาดเคลื่อนเฉลี่ยระหว่าง 1.5–5.2% โดยแอปพลิเคชัน Lux Meter (KHTSXR) มีค่าความคลาดเคลื่อนต่ำสุด 1.5% แสดงว่าแอปพลิเคชัน Lux Meter สามารถวัดค่าได้ใกล้เคียงกับค่าอ้างอิงที่สุด เจ้าหน้าที่ห้องเอกซเรย์สามารถติดตั้งแอปพลิเคชันวัดแสงได้บนสมาร์ตโฟนโดยไม่เสียค่าใช้จ่าย ช่วยให้สามารถตรวจคัดกรองหลอดไฟของเครื่องเอกซเรย์เบื้องต้นให้ได้มาตรฐานอยู่เสมอ และช่วยประหยัดค่าใช้จ่าย ในการจัดหาเครื่องวัดแสง อีกทั้งควรปรับเทียบค่าก่อนนำไปใช้งานจริงอย่างน้อยปีละหนึ่งครั้ง โดยเทียบกับเครื่องมือวัดอ้างอิง

เอกสารอ้างอิง

1. วัชรภรณ์ วงศ์สกุลกาญจน์, บุษยา จูงาม, พชรกมล กลั่นบุศย์. การจัดการปัญหาแสงสว่างในสถานที่ทำงาน. ว ความปลอดภัยและสุขภาพ 2564; 14(1): 1–12.
2. Gutierrez-Martinez JM, Castillo-Martinez A, Medina-Merodio JA, Aguado-Delgado J, Martinez-Herraz JJ. Smartphones as a light measurement tool: case of study. Appl Sci 2017; 7(6): 616. (19 pages).
3. Cerqueira D, Carvalho F, Melo RB. Is it smart to use smartphones to measure illuminance for occupational health and safety purposes? In: Advances in safety management and human factors: Proceedings of the AHFE 2017 international conference on safety management and human factors. July 17–21, 2017, The Westin Bonaventure Hotel, Los Angeles. California, USA: Springer International Publishing; 2018. p. 258–268.
4. DIAL GmbH. Luxmeter App versus measuring device: Are smartphones suitable for measuring illuminance? [online]. 2016; [cited 2021 Oct 1];

- [4 screens]. Available from: URL: <https://www.dialux.com/en-GB/news-detail/luxmeter-app-versus-measuring-device-are-smart-phones-suitable-for-measuring-illuminance>.
5. วิชัย วิชาธรตระกูล, บรรจง เชื้อนแก้ว, ธาณินทร์ชินราช, พนม คำชาย, ธีรวัฒน์สุภาวัฒนพันธ์. การประเมินคุณภาพและการแก้ไขข้อบกพร่องของเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยโรคทั่วไปในโรงพยาบาลศรีนครินทร์. Srinagarind Med J 2007; 22 (suppl): 169.
 6. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. มาตรฐานคุณภาพเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยทางการแพทย์. กรุงเทพฯ: บริษัท ปิยอนด์ พับลิชชิง จำกัด; 2562.
 7. จินดา ทองเรือง. คุณภาพเครื่องเอกซเรย์วินิจฉัยใน 6 จังหวัดภาคกลางของประเทศไทย ระหว่างปีงบประมาณ 2556-2557. ว กรมวิทย พ 2559; 58(2): 73-9.
 8. ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 8 อุตรธานี. รายงานประจำปี 2563. อุตรธานี: ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 8 อุตรธานี; 2563. หน้า 54.
 9. สลีลา วิวัฒน์วงศ์, คทาฤทธิ์ ดีปรีชา, ลิขสิทธิ์ โสนันทะ, วีรภัทร มาเมือง. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มของแสงสว่างและระดับเสียงจากการวัดโดยเครื่องมือมาตรฐานเปรียบเทียบกับแอปพลิเคชันในโทรศัพท์มือถือ. เวชสารแพทย์ทหารบก 2561; 71(4): 259-63.
 10. Odenwald S. Smartphone sensors for citizen science applications: light and sound. Citizen Science: Theory and Practice 2020; 5(1): 13. (16 pages).
 11. OIML R 136-1: 2004 (E). Instruments for measuring the areas leathers. Paris, France: Organisation Internationale de Metrologie Legale; 2004.
 12. ชัยวัฒน์ เจษฎาจินต์. มาตรฐานและการจัดการเครื่องมือวัด. [ออนไลน์]. 2561; [สืบค้น 24 ต.ค. 2565]; [70 หน้า] เข้าถึงได้ที่: URL: <https://sc5.kku.ac.th/sciIT/doc/2018-Dec-18-111236.pdf>

Measurement Light Intensity from the Collimator of the X-ray Tube Using Smartphone Applications

Sineeporn Jansawang¹ and Khatayut Nigapruek²

¹Bureau of Radiation and Medical Devices, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

²Regional Medical Sciences Center 1/1 Chiang Rai, Department of Medical Sciences, Chiang Rai 57100, Thailand

ABSTRACT The light from the collimator of the X-ray tube using to define the area of the radiation beam and the light intensity is required to comply with the quality control standard. At present, there are many applications for measuring light intensity that can be freely downloaded on a smartphone which will be useful to solve the problem of a lack of lux meters in hospitals. The purpose of this research was to study the measurement of light intensity from the collimator of the X-ray tube using three smartphone applications: Smart Luxmeter (Smart Tools co.), Lux Meter (Light Meter) (My Mobile Tools Dev) and Lux Meter (KHTSXR) compared with the standard reference lux meter (Yokogawa model 51001). The result showed that after calibrating, all the three applications could measure the light intensity of a light emitting diode (LED) lamp with the close value of the standard reference lux meter. The percentages of difference were between 0.9% and 1.4%. In addition, measuring the light of the collimator from the X-ray tube at a distance of one meter from the X-ray source showed that light intensity from all the three applications had an average difference between 1.5% and 5.2%. The Lux Meter (KSTSXR) application had the lowest percentage of difference (1.5%) which was closest to the reference values and comply with the acceptable range of the quality standards of the medical diagnostic X-ray machine of the Department of Medical Sciences. In conclusion, if for light intensity screening, the calibrated lux meter applications could be used in stead of the light meter.

Keywords: Light intensity, Smartphone application, Light of X-ray tube

การพัฒนา Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay เพื่อวิเคราะห์ความแรงของเซรุ่มแก้พิษงูเห่า

ไพศาล พังจันทน์ และ วิภาวี วงศ์ชนะ

สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ วิธีมาตรฐานสำหรับการหาค่าความแรงของเซรุ่มแก้พิษงูเห่าในตำรายา กำหนดให้ใช้วิธีทดสอบในสัตว์ทดลอง โดยวิธี mouse neutralizing test แต่ปัจจุบันเหตุผลทางจริยธรรมด้านการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ได้มีแนวทางลดการใช้สัตว์ทดลองตามหลักการ 3Rs คณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวิธีการทดสอบความแรงของเซรุ่มแก้พิษงูเห่าโดยวิธี indirect ELISA เพื่อทดแทนวิธีการใช้สัตว์ทดลอง ผลการวิจัยพบว่าวิธีนี้มีความจำเพาะกับเซรุ่มแก้พิษงูเห่ามีความแม่นยำโดยมีค่า %Recovery เท่ากับ 93.54 วิธีมีความเป็นเส้นตรงเมื่อสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD กับค่าความเจือจางตัวอย่างเซรุ่มแก้พิษงูเห่า 1/7,500 ถึง 1/120,000 เท่า โดยมีค่า $R^2 \geq 0.99$ ซึ่งทำให้ช่วงความแรงของผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมกับการทดสอบด้วยวิธีนี้ คือ 0.2-0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วิธีมีความเที่ยงจากการทดสอบในวันเดียวกันและต่างวัน โดยมีค่า %CV เท่ากับ 7.65 และ 5.13 ตามลำดับ การศึกษาความทนของวิธีเมื่อเปลี่ยนผู้วิเคราะห์ ชนิดของเพลท และระยะเวลาการปฏิบัติกริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีทั้งหมด พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าวิธีการทดสอบความแรงของเซรุ่มแก้พิษงูเห่าโดยวิธี indirect ELISA ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความถูกต้อง สามารถนำมาใช้ในการทดสอบความแรงของเซรุ่มแก้พิษงูเห่าในห้องปฏิบัติการ และนำมาใช้ต่อยอดในการศึกษาความสัมพันธ์ค่าความแรงจากวิธี direct ELISA กับค่าความแรงจากวิธีมาตรฐานต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: ค่าความแรง, เซรุ่มแก้พิษงูเห่า, Indirect ELISA

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

Received: 24 November 2022

Revised: 16 March 2023

Accepted: 21 March 2023

บทนำ

ประเทศไทยตั้งอยู่ในภูมิศาสตร์เขตร้อนจึงมีงูอาศัยอยู่ชุกชุม หลายชนิดเป็นงูที่มีพิษร้ายแรงที่ทำให้เสียชีวิตได้ ปัจจุบันวิธีในการรักษาผู้ป่วยที่ถูกงูกัดทำโดยการให้เซรุ่มแก่พิษงูที่ตรงกับชนิดของงู และเซรุ่มแก่พิษงูต้องมีประสิทธิภาพตามที่ระบุไว้ในฉลากจึงจะเชื่อมั่นได้ว่าสามารถใช้รักษาผู้ป่วยได้ เซรุ่มแก่พิษงูเป็นยาชีววัตถุที่ใช้ในการรักษาแบบ passive immunity ผลิตโดยการนำพิษงูไปฉีดกระตุ้นในสัตว์ขนาดใหญ่ เช่น ม้า เป็นต้น เพื่อให้สร้างภูมิคุ้มกันชนิดอิมมูโนโกลบูลินจี (IgG) ที่จำเพาะต่อพิษงูชนิดนั้น ๆ จากนั้นเจาะเก็บเลือดเพื่อนำพลาสมาไปตกตะกอนด้วยเกลือให้ได้อิมมูโนโกลบูลินที่มีความบริสุทธิ์ นำไปกรองและปรับสูตรให้ได้เป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป เพื่อนำไปใช้ในการรักษาผู้ป่วยต่อไป

เนื่องจากเซรุ่มแก่พิษงูนั้นจัดเป็นยาชีววัตถุ ซึ่งมีแนวทางการควบคุมคุณภาพตามองค์การอนามัยโลก⁽¹⁾ ประเทศไทยจึงมีกฎหมายกำหนดให้ผู้ผลิตต้องมีการรับรองรุ่นการผลิตก่อนจำหน่าย สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เป็นห้องปฏิบัติการกลางที่ได้รับมอบอำนาจดังกล่าวจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กำหนดให้ผู้ผลิตต้องมีการนำส่งตัวอย่างเพื่อนำมาทดสอบทางห้องปฏิบัติการ พร้อมส่งเอกสารสรุปกระบวนการผลิตเพื่อพิจารณาพร้อมกับผลการทดสอบและยืนยันคุณภาพของผลิตภัณฑ์ว่าเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดตามที่ได้ยื่นขึ้นทะเบียนไว้ โดยหนึ่งในการทดสอบคุณภาพที่สำคัญ คือ การทดสอบความแรง (potency) ซึ่งวิธีทดสอบตามคำแนะนำขององค์การอนามัยโลกและตำรายาสากลต่าง ๆ⁽¹⁻³⁾ กำหนดให้ใช้วิธีวิเคราะห์ในสัตว์ทดลอง โดยวิธี mouse neutralizing test (MNT) เป็นวิธีทดสอบมาตรฐาน

ปัจจุบันการจัดหาสัตว์ทดลองทำได้ยากและมีราคาแพง รวมถึงการผลิตสัตว์ทดลองต้องอยู่ภายใต้พระราชบัญญัติสัตว์เพื่อนานทางวิทยาศาสตร์⁽⁴⁾ นอกจากนี้การทดสอบในสัตว์ทดลองมีความแปรปรวนของผลการทดสอบ นักวิจัยได้พยายามคิดค้นวิธีการทดสอบแทนวิธีการใช้สัตว์ทดลองตามหลักการ 3Rs (reduction, replacement and refinement) โดยหนึ่งในวิธีที่นิยม

ใช้อย่างแพร่หลาย คือ วิธี enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) โดยอาศัยหลักการจับกันอย่างจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี วิธีนี้มีการพัฒนามานาน จนเป็นที่ยอมรับว่าเป็นวิธีมาตรฐานทางชีวเคมีและเป็นวิธีที่นักวิจัยหลายรายเลือกใช้ เพื่อเป็นวิธีทดแทนการทดสอบหาความแรงของเซรุ่มแก่พิษงูในสัตว์ทดลอง⁽⁵⁻⁷⁾ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากเซรุ่มแก่พิษงูมีความจำเพาะต่อชนิดของงูตามภูมิศาสตร์ ดังนั้นแต่ละประเทศจึงมีปัญหาพิษที่แตกต่างกัน ผลการวิจัยในพื้นที่หนึ่งอาจไม่สามารถนำมาใช้ในอีกพื้นที่หนึ่งได้ คณะผู้วิจัยจึงเริ่มพัฒนาวิธี indirect ELISA เพื่อวิเคราะห์การหาความแรงของเซรุ่มแก่พิษงูเท่าที่ผลิตในประเทศ และทดสอบความถูกต้องของวิธีดังกล่าวว่าสามารถนำมาใช้ทดสอบหาความแรงของเซรุ่มแก่พิษงูเท่าในห้องปฏิบัติการได้จริง และนำมาใช้ต่อยอดในการศึกษาเปรียบเทียบกับค่าความแรงที่ได้จากวิธี MNT ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานต่อไปในอนาคต

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องอ่านผล ELISA แบบไมโครเพลทรุ่น ELx808 (BioTek, USA) เครื่องล้างไมโครเพลท (Biorad, USA) ตู้มเพาะเชื้อควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (BioTek, USA) ตู้มเพาะเชื้อควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (BioTek, USA) ตู้นเย็นควบคุมอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส (BioTek, USA) 96-well plate cat. no. 3590 (Costar, USA) และ cat. no. 439454 (Thermo Scientific, USA)

การเตรียมสารละลาย

coating buffer ประกอบด้วย 50 mM carbonate buffer pH 9.6 สารละลาย 10xPBS ประกอบด้วย 0.15M phosphate buffer saline pH 7.2 สารละลาย PBST ประกอบด้วย 0.05% Tween 20 (sigma) ใน 1xPBS washing buffer ประกอบด้วย 0.05% Tween 20 ใน 0.9% sodium chlorine (normal saline) blocking buffer

การศึกษาความถูกต้องของวิธีการ⁽⁸⁾

ELISA เป็นการใช้หลักการความจำเพาะระหว่างแอนติบอดี (antibody) และแอนติเจน (antigen) โดยใช้เอนไซม์ (enzyme) เพื่อช่วยทำให้สังเกตเห็นสีที่เกิดขึ้นเมื่อทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น (substrate) ความเข้มของสีที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนกับปริมาณของแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ปรากฏในตัวอย่าง ซึ่งในกรณีนี้แอนติเจนเป็นพิษงูและแอนติบอดีเป็นเซรุ่มแก่พิษงู

ซึ่งพิษงูเห่าชนิดผงแห้งให้มีน้ำหนัก 5-10 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วย coating buffer ให้มีปริมาณของพิษงูเห่า 0.5 ไมโครกรัมต่อหลุม ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร นำเพลทบ่มที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง ล้างด้วย washing buffer 300 ไมโครลิตรต่อหลุม 4 ครั้ง เติมเซรุ่มแก่พิษงูเห่าตัวอย่างและเซรุ่มแก่พิษงูเห่ามาตรฐานเจือจางโดยใช้ diluting buffer แบบ 2-fold dilution จำนวน 7 ค่าการเจือจางจาก 1/3,750 ถึง 1/240,000 ลงในเพลท 50 ไมโครลิตร ทำซ้ำค่าการเจือจางละ 2 หลุม จากนั้นบ่มเพลทที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย washing buffer 300 ไมโครลิตร 4 ครั้ง เติม goat anti-horse alkaline phosphatase conjugate ที่เจือจางด้วย diluting buffer อัตราส่วน 1 ต่อ 2,000 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มเพลทที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย washing buffer 300 ไมโครลิตร 4 ครั้ง เติม alkaline phosphate substrate solution ตามวิธีที่ระบุในฉลาก ลงในหลุม ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มเพลทในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เติม 2N NaOH เพื่อหยุดปฏิกิริยา ปริมาตร 50 ไมโครลิตร อ่านค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านผล ELISA

การคำนวณค่าความแรง

นำค่า OD ที่วัดได้มาคำนวณหาค่าความแรงของตัวอย่างเปรียบเทียบกับเซรุ่มแก่พิษงูเห่ามาตรฐาน

โดยใช้สถิติแบบ parallel line assay⁽⁸⁾ ด้วยโปรแกรม Bioassay Assist (National Institute of Infectious Diseases) ทั้งนี้กำหนดให้ใช้ค่า OD อย่างน้อย 4 ค่าระดับการเจือจางที่มีความเป็นเส้นตรง โดยพิจารณาค่า F value ที่แสดงใน parallelism และ linearity ว่าข้อมูลทั้งหมดไม่มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เป็นเกณฑ์ที่ยอมรับได้จากการคำนวณทางสถิติ โดยผลการทดสอบจะแสดงค่า invalid เมื่อมี parallelism หรือ linearity ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

การทดสอบความถูกต้องของวิธี⁽⁹⁾

ความเป็นเส้นตรง (linearity) และการหาช่วงของวิธี (range)

ทดสอบความเป็นเส้นตรง โดยการเจือจางเซรุ่มแก่พิษงูเห่ามาตรฐานที่ความแรงเริ่มต้น 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 7 ระดับการเจือจาง ได้แก่ 1/3,750, 1/7,500, 1/15,000, 1/30,000, 1/60,000, 1/120,000 และ 1/240,000 สร้างกราฟระหว่างค่า OD และ log ค่าความเจือจาง โดยมีเกณฑ์ว่าต้องมีอย่างน้อย 4 ค่าความเจือจางที่มีความเป็นเส้นตรง (ค่า $R^2 \geq 0.95$)

การทดสอบช่วงของวิธี โดยการเจือจางเซรุ่มแก่พิษงูเห่ามาตรฐาน จำนวน 4 ความแรง ได้แก่ 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำแต่ละตัวอย่างหาค่าความแรงตามวิธีที่ระบุ คำนวณค่าความแรงโดยใช้โปรแกรม Bioassay Assist หัวข้อ parallel line assay พิจารณา linear relationship ระหว่างค่าความแรงที่ได้จากการคำนวณเปรียบเทียบกับค่าความแรงที่วัดได้จริง โดยช่วงความแรงที่เหมาะสมของวิธีจะต้องมีค่า $R^2 \geq 0.95$

ความจำเพาะของวิธี (specificity)

หาค่าความแรงของตัวอย่างเซรุ่มแก่พิษงูเห่าเซรุ่มแก่พิษงูทาบสมิงคลา และเซรุ่มแก่พิษงูเหียวทางใหม่เปรียบเทียบกับเซรุ่มแก่พิษงูเห่ามาตรฐาน ผลการทดสอบของตัวอย่างเซรุ่มแก่พิษงูชนิดอื่นต้องให้ผลลบ (non-reaction) หรือไม่สามารหาค่าได้ (invalid)

ความแม่นยำของวิธี (accuracy)

เตรียมตัวอย่างเซรัมแก้พิษงูเห่า ความแรง 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด เติมเซรัมแก้พิษงูเห่า ความแรง 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่ 1 และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 20 ไมโครลิตร แทนเซรัมแก้พิษงูเห่า ความแรง 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในหลอดที่ 2 นำตัวอย่างทั้งสองหลอดไปหาค่าความแรงเปรียบเทียบกับเซรัมแก้พิษงูเห่ามาตรฐาน แล้วคำนวณหาค่า %Recovery การเปรียบเทียบค่าความแรงที่เพิ่มขึ้นจากการเติมเซรัมแก้พิษงูเห่าเข้มข้นลงไปเทียบกับหลอดที่เติมน้ำกลั่น โดยมีเกณฑ์ยอมรับอยู่ระหว่าง 80-120% ของความแรงที่คาดไว้ จากสูตร

$$\%Recovery = \frac{\text{ความแรงที่วัดได้} \times 100}{\text{ความแรงที่คาดไว้}}$$

ความเที่ยงของวิธี (precision)

หาค่าความแรงของตัวอย่างเซรัมแก้พิษงูเห่า จำนวน 1 รุ่นการผลิต จำนวน 6 ครั้ง ในวันเดียวกัน เพื่อหาค่า repeatability และหาค่าความแรงของตัวอย่างเซรัมแก้พิษงูเห่าจำนวน 1 รุ่นการผลิต จำนวน 3 ครั้ง แบบต่างวันกัน เพื่อหาค่า intermediate precision นำผลการทดสอบมาคำนวณเปอร์เซ็นต์สัมประสิทธิ์ความแปรผัน (%CV) โดยมีเกณฑ์การยอมรับค่า %CV ต้องน้อยกว่า 10%

ความทนของวิธี (robustness)**การเปลี่ยนผู้วิเคราะห์**

ทดสอบตัวอย่างเซรัมแก้พิษงูเห่าชุดเดียวกัน โดยผู้วิเคราะห์ 2 คน ๆ ละ 3 ครั้ง จากนั้นเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างนักวิเคราะห์

การเปลี่ยนยี่ห้อเพลท

ทดสอบตัวอย่างเซรัมแก้พิษงูเห่าชุดเดียวกัน โดยใช้เพลทยี่ห้อ Costar และ Thermo Scientific ยี่ห้อละ 3 ครั้ง

การเปลี่ยนแปลงระยะเวลาการทำปฏิกิริยา**ระหว่างเซรัมแก้พิษงูเห่าและพิษงูเห่า**

ทดสอบช่วงเวลาในการบ่มตัวอย่างเซรัมแก้พิษงูเห่า เพื่อให้ทำปฏิกิริยากับพิษงูเห่าในหลุมที่ระยะเวลา 30 90 และ 120 นาที เปรียบเทียบผลการทดสอบที่ได้กับการบ่มที่ระยะเวลา 60 นาที

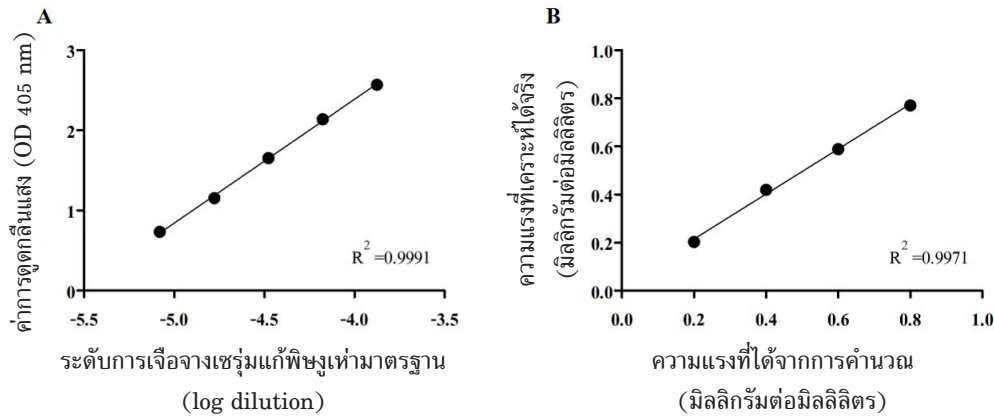
อุณหภูมิในขั้นตอนการเคลือบเพลท

ทดสอบระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอนการเคลือบเพลท 3 สภาวะ ได้แก่ บ่มที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เปรียบเทียบค่าความแรงที่ได้กับที่สภาวะ 2-8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

เกณฑ์กำหนดของการทดสอบความทนของวิธีทั้งหมด คือ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทดสอบโดยวิธี Independent t-test หรือ one-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผล

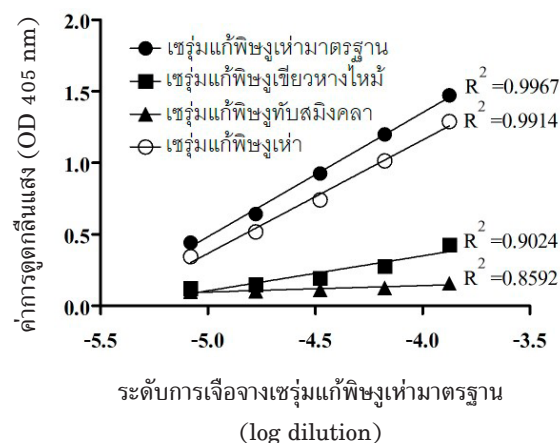
การทดสอบความเป็นเส้นตรง และช่วงความแรงที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ พบว่าที่ระดับความแรงตั้งต้น 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ค่าการเจือจาง 5 ระดับ ตั้งแต่ 1/7,500, 1/15,000, 1/30,000, 1/60,000 และ 1/120,000 สามารถสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่า OD กับค่า log ของระดับการเจือจางที่ค่า R^2 เท่ากับ 0.9991 ดังแสดงในภาพที่ 1A และพบว่าเซรัมแก้พิษงูเห่าที่มีค่าความแรงเริ่มต้น 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเจือจางเป็น 0.6, 0.4 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นช่วงที่สามารถนำมาทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ได้ จากการคำนวณความแรงได้เท่ากับ 0.77, 0.59, 0.42 และ 0.21 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9971 ในกราฟ linear relationship ดังแสดงในภาพที่ 1B แต่ที่ความแรง 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าการเจือจางที่เหมาะสมลดลงเหลือเพียงช่วง 4 ระดับ คือ 1/7,500 ถึง 1/60,000



ภาพที่ 1 ความเป็นเส้นตรงและช่วงความแรงของวิธีต่อเซรุ่มแก้พิษงูเห่า (A) ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (OD 405 nm) กับระดับการเจือจางเซรุ่มแก้พิษงูเห่ามาตรฐาน (log dilution) 5 ระดับการเจือจาง โดยเริ่มจากเซรุ่มแก้พิษงูเห่าที่มีค่าความแรงเริ่มต้น 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ (B) linear relationship ของค่าความแรงของเซรุ่มแก้พิษงูเห่ามาตรฐาน ระหว่างค่าความแรงที่วัดได้จริงกับค่าความแรงที่ได้จากการคำนวณ โดยค่า R^2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรใน linear regression model

การทดสอบหาความจำเพาะของวิธี พบว่าวิธีนี้ มีความจำเพาะต่อเซรุ่มแก้พิษงูเห่า แต่ไม่จำเพาะต่อเซรุ่มแก้พิษงูพิษมิงคลา และเซรุ่มแก้พิษงูเขียวหางไหม้ แสดงจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD และ log dilution ดังแสดงในภาพที่ 2 เมื่อวิเคราะห์ค่าความแรง โดยใช้ parallel line assay พบว่าตัวอย่างเซรุ่มแก้พิษงูเห่าแสดงค่า F value ในหัวข้อ parallelism

และ linearity ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และสามารถหาค่าความแรงได้ เท่ากับ 0.78 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ไม่สามารถคำนวณหาค่าความแรงในตัวอย่างเซรุ่มแก้พิษงูพิษมิงคลาและเซรุ่มแก้พิษงูเขียวหางไหม้เนื่องจากให้ผล invalid ในการทดสอบทางสถิติ โดยใช้ parallel line assay



ภาพที่ 2 ความจำเพาะของวิธีต่อเซรุ่มแก้พิษงูเห่า เซรุ่มแก้พิษงูพิษมิงคลา และเซรุ่มแก้พิษงูเขียวหางไหม้ โดยพิจารณาจากความสัมพันธ์ระหว่างการดูดกลืนแสง (OD 405 nm) กับระดับการเจือจางเซรุ่มแก้พิษงูเห่ามาตรฐาน (log dilution) 5 ระดับการเจือจาง ของตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด เปรียบเทียบกับเซรุ่มพิษงูเห่ามาตรฐาน ค่า R^2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรใน linear regression model

การทดสอบความแม่นยำของวิธี พบว่าเมื่อหาค่าความแรงของตัวอย่างเซรัมแก๊พิษงูเห่าที่ถูกเติมด้วยเซรัมแก๊พิษงูเห่าเข้มข้น จำนวน 3 ครั้ง ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำไปคำนวณค่าความแรงที่เพิ่มขึ้นโดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เติมด้วยน้ำกลั่น ได้ค่า %Recovery อยู่ระหว่าง 80-120% ดังแสดงในตารางที่ 1

การทดสอบความเที่ยงของวิธี พบว่าวิธีมีความเที่ยงเมื่อทำการทดสอบค่าความแรงในวันเดียวกัน และต่างวันกันมีค่า %CV เท่ากับ 7.65% และ 5.13% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 การทดสอบความแม่นยำในการหาความแรงของตัวอย่างเซรัมแก๊พิษงูเห่า

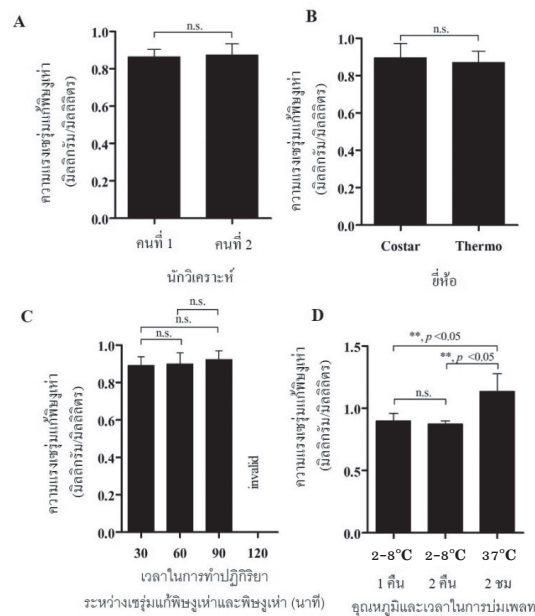
ครั้งที่	ความแรงของตัวอย่างเซรัมแก๊พิษงูเห่า (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)		%Recovery
	ความแรงที่ต้องการ	ผลที่ได้จาก Spike	
1	0.06	0.59	98.21
2	0.60	0.58	96.32
3	0.60	0.52	86.09
%Recovery			93.54

ตารางที่ 2 การทดสอบความเที่ยงของวิธีในการหาค่าความแรงของตัวอย่างเซรัมแก๊พิษงูเห่า

ความเที่ยงของวิธี	ความแรงของตัวอย่างเซรัมแก๊พิษงูเห่า (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)						ค่าเฉลี่ย	SD	%CV
	1	2	3	4	5	6			
Repeatability (6 ชั่วโมง 1 วัน)	0.89	0.81	0.76	0.77	0.75	0.72	0.78	0.06	7.65
Intermediate precision (3 วัน)	0.78	0.74	0.82	-	-	-	0.78	0.04	5.13

การทดสอบความทนของวิธี โดยการเปรียบเทียบผลระหว่างผู้วิเคราะห์สองคน และการทดสอบความทนของวิธีโดยใช้เพลทต่างยี่ห้อกัน พบว่าให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในภาพที่ 3A และ 3B การเปลี่ยนแปลงระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างเซรัมแก๊พิษงูเห่าและพิษงูเห่าที่ 30, 90 และ 120 นาที เปรียบเทียบกับเวลา 60 นาที พบว่าที่เวลา 30 และ 90 นาที ให้ผลไม่แตกต่างกันกับที่เวลา 60 นาที

ซึ่งไม่สามารถคำนวณค่าความแรงได้จากการทดสอบที่ 120 นาที ดังแสดงในภาพที่ 3C การทดสอบความทนของวิธีต่อระยะเวลาในการบ่มเพลทที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส พบว่าค่าความแรงที่ได้ระหว่าง 1 และ 2 คืน ไม่แตกต่างกัน ยกเว้นที่สภาวะ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ค่าความแรงของตัวอย่างเซรัมแก๊พิษงูเห่าที่ได้สูงกว่าจากสภาวะอื่น ดังแสดงในภาพที่ 3D



ภาพที่ 3 ความทนของวิธีในการหาค่าความแรงในสภาวะที่แตกต่างกัน (A) นักวิเคราะห์ต่างคน (B) ชนิดของเพลท (C) ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างเซรัมแก้พิษงูเข้ากับพิษงูในเพลทที่ 30, 60 และ 90 นาที และ (D) การเปลี่ยนอุณหภูมิในการบ่มเพลทในขั้นตอนการเคลือบเพลทด้วยพิษงู (*มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, n.s. ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ)

วิจารณ์

การพัฒนาวิธี indirect ELISA เพื่อวิเคราะห์หาความแรงของเซรัมแก้พิษงู พบว่า วิธีมีความจำเพาะต่อเซรัมแก้พิษงูและมีช่วงความเป็นเส้นตรง อย่างไรก็ตามเมื่อกำหนดให้ความแรงตั้งต้น เท่ากับ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบเพียง 4 ค่าความเจือจางที่ยังคงความเป็นเส้นตรง คือ 1/7,500, 1/15,000, 1/30,000, และ 1/60,000 ซึ่งเพียงพอต่อการนำมาคำนวณค่าทางสถิติ ทั้งนี้ อาจเกิดจากตัวอย่างถูกเจือจางจนปริมาณแอนติบอดีไม่เพียงพอที่จะทำให้เกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสมกับแอนติเจนได้ จากข้อมูลผู้ผลิตที่ผ่านมาเซรัมแก้พิษงูที่ส่งตรวจวิเคราะห์มีความแรงระหว่าง 0.6 – 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นไปตามข้อกำหนดของผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป ดังนั้นช่วงของวิธีจึงครอบคลุมการวิเคราะห์ค่าความแรงของผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้จากการทดสอบความทนของวิธีต่อปัจจัยด้านอุณหภูมิและเวลาในการบ่มมีผลต่อการวิเคราะห์ค่าความแรงเซรัมแก้พิษงูซึ่งอาจเกิดจากปัจจัยความคงตัวและปฏิกิริยาจับกันของโปรตีนในสภาวะดังกล่าวไม่เหมาะสมกับวิธี

การพัฒนาวิธีการทดสอบความแรงของเซรัมแก้พิษงูไทย (*Naja kaouthia*) เริ่มตั้งแต่ ค.ศ. 1991 โดย Rungsiwongse J. และ Ratanabangkoon K.⁽¹⁰⁾ ได้พัฒนาวิธี ELISA ในการประเมินค่าความแรงของเซรัมแก้พิษงูไทยที่ผลิตจากม้า กำหนดให้เซรัมแก้พิษงูที่ผ่านการผลิตหนึ่งเป็นค่าผลบวก (positive control) และศึกษาเปรียบเทียบการเคลือบเพลทด้วย crude venom, toxin fraction และ purified neurotoxin ที่ได้จากพิษงูไทย พบว่าการใช้ purified neurotoxin เคลือบเพลทให้ค่า correlation coefficients (r) ที่ดีที่สุดคือ 0.95 ($p < 0.001$) อย่างไรก็ตามการเตรียม purified neurotoxin มีกระบวนการที่อาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงาน ในขณะที่ crude venom ที่เก็บจากงูสามารถนำมาเก็บในรูปผงแห้ง มีความเป็นพิษที่น้อยกว่า และมีความคงตัวสูง ทั้งนี้ผลจากการศึกษาความถูกต้องของวิธีซึ่งใช้ crude venom พิษงูแห้งในการเคลือบเพลทแสดงให้เห็นว่าวิธีสามารถวิเคราะห์ค่าความแรงเซรัมแก้พิษงูได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ

ในปี ค.ศ. 2014 Kumar S และคณะ⁽¹¹⁾ ได้พัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ความแรงของเซรุ่มแก้พิษงูเห่าอินเดีย (*Naja naja*) ด้วยวิธี ELISA เพื่อใช้หาค่าความแรงผลิตภัณฑ์เบื้องต้น (screening test) ในกระบวนการผลิต โดยใช้เซรุ่มแก้พิษงูเห่าอินเดีย ความแรง 0.66 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารมาตรฐาน เพื่อกำหนดค่า inverse antibody titre แล้วทดสอบตัวอย่างเซรุ่มจากกระบวนการผลิตโดยวิธี ELISA และวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างมาเปรียบเทียบกับค่าของสารมาตรฐานเพื่อหาค่า inverse antibody titre สำหรับคำนวณค่าความแรง หน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะเดียวกันนำตัวอย่างดังกล่าวไปทดสอบหาค่าความแรงโดยวิธี MNT ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานโดยตรง เมื่อเปรียบเทียบค่าความแรงที่ได้จากทั้งสองวิธี พบว่ามีความสัมพันธ์กันจากการศึกษาของ Kumar S และคณะ⁽¹¹⁾ แสดงให้เห็นว่าวิธี ELISA และ MNT เป็นวิธีที่ใช้แทนกันได้ ทั้งนี้วิธี ELISA ที่ Kumar S และคณะ พัฒนาขึ้นมีวัตถุประสงค์เพื่อหาค่าความแรงของผลิตภัณฑ์ที่อยู่ระหว่างการผลิต ซึ่งยังไม่เป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป และใช้เซรุ่มแก้พิษงูเห่าอินเดียสารมาตรฐานในการหาค่าความแรง โดยไม่มีการแสดงผลเปรียบเทียบค่าความแรงที่ผลิตได้กับเซรุ่มแก้พิษงูเห่ามาตรฐาน ขณะที่การศึกษาในรายงานฉบับนี้พัฒนาหาค่าความแรงของผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปเพื่อการปล่อยผ่านและใช้โปรแกรมทางสถิติ parallel line assay ในการหาค่าความแรงเปรียบเทียบกับความแรงเซรุ่มแก้พิษงูมาตรฐานที่ทราบค่า ซึ่งวิธีทางสถิติดังกล่าวมีระบุในตำรายามาตรฐานสากล

ในปี ค.ศ. 2018 Khaing EM และคณะ⁽¹²⁾ ได้พัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธี วิเคราะห์ความแรงของเซรุ่มแก้พิษงูแมวเซา (*Daboia siamensis*) ซึ่งเป็นงูพิษที่พบในประเทศไทย ด้วยวิธี ELISA ในตัวอย่างที่เป็นเลือดม้าที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ก่อนจะนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป โดยใช้วิธีการคำนวณค่าความแรงของตัวอย่างจากการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงกับสารมาตรฐานเช่นเดียวกันกับ Kumar S และคณะ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า การพัฒนาวิธีการ

ตรวจหาความแรงของเซรุ่มแก้พิษงูโดยวิธี ELISA สามารถขยายขอบข่ายการนำไปใช้ในเซรุ่มแก้พิษงูอื่น ๆ ได้นอกจากเซรุ่มแก้พิษงูเห่า

การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงทิศทางที่นักวิจัยมุ่งเน้นหาวิธีที่สามารถทดแทนการใช้สัตว์ทดลอง สำหรับทดสอบเซรุ่มแก้พิษงูที่อยู่ในขั้นตอนระหว่างการผลิตเป็นหลัก เนื่องจากปัจจุบันคำแนะนำขององค์การอนามัยโลกและตำรายาสากล กำหนดให้วิธีการทดสอบความแรงโดยวิธี MNT เป็นวิธีมาตรฐานในการทดสอบเพื่อปล่อยผ่านผลิตภัณฑ์และเพื่อการวางจำหน่าย

จากวิธีการใช้สัตว์ทดลอง หรือ MNT เป็นวิธีมาตรฐาน เนื่องจากวัดประสิทธิภาพจากความสามารถของเซรุ่มแก้พิษงูในการป้องกันชีวิตของสัตว์ทดลอง ให้อายุชีวิตจากพิษงู อย่างไรก็ตามแนวโน้มของจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลองทั่วโลกที่มีความเข้มงวดขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลักดันการลดการใช้สัตว์ทดลองตามหลักการ 3Rs หากมีข้อมูลการเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างการใช้อัตว์ทดลองและ ELISA ว่าทั้งสองวิธีสามารถใช้ทดแทนกันได้ สามารถใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการนำวิธี ELISA มาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการให้ผลิตภัณฑ์วางจำหน่ายได้ เช่นเดียวกับการทดสอบความแรงผลิตภัณฑ์ human tetanus immunoglobulin ที่มีระบุในตำรายาสากล⁽¹³⁾ อย่างไรก็ตามการจัดเตรียมสารมาตรฐานเซรุ่มแก้พิษงูเห่าระดับประเทศมีความสำคัญเพื่อให้เกิดมาตรฐานร่วมกันในการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป ระหว่างหน่วยงานกำกับภาครัฐและผู้ผลิต รวมถึงการนำสารมาตรฐานมาใช้ในการศึกษาค่าความแรงเปรียบเทียบระหว่างทั้งสองวิธี นอกจากนี้คาดหวังว่าจะสามารถถ่ายทอดวิธี Indirect ELISA ให้กับผู้ผลิตในประเทศ สำหรับนำไปใช้คัดกรองความแรงพลาสมาของม้าที่ถูกเจาะเก็บเลือด หรือการตรวจวิเคราะห์ระหว่างกระบวนการผลิต ซึ่งไม่ได้มีข้อจำกัดว่าต้องใช้วิธีมาตรฐานในการทดสอบ เป็นการลดการใช้สัตว์ทดลองของผู้ผลิตลง และเป็นข้อมูลสนับสนุนทางวิชาการในด้านที่เกี่ยวข้องกับจรรยาบรรณการใช้สัตว์เพื่อนงานทางวิทยาศาสตร์ตามหลักการ 3Rs ต่อไป

สรุป

วิธี indirect ELISA ในการวิเคราะห์ความแรงเซรุ่มแก้พิษงูเห่าที่พัฒนาขึ้น มีความจำเพาะและผ่านเกณฑ์ตรวจสอบความถูกต้องในทุกหัวข้อที่กำหนดไว้ ทั้งนี้สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ความแรงเซรุ่มแก้พิษงูเห่าในห้องปฏิบัติการได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สถานเสาวภา สภากาชาดไทย ที่อนุเคราะห์พิษงูและเซรุ่มแก้พิษงูเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัย และขอขอบคุณ ดร.สุภาพร ภูมิอมร ผู้อำนวยการสถาบันชีววัตถุ ที่ให้ความสำคัญกับการพัฒนาวิธี เพื่อลดการใช้สัตว์ทดลองและสนับสนุนให้มีการเผยแพร่ผลการศึกษาในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. WHO Expert Committee on Biological Standardization, sixty-seventh report (WHO technical report series no. 1004). Geneva: World Health Organization; 2017. p. 197-388.
2. Department of Medical Sciences. Thai Pharmacopoeia II 2011 volume I part 1. Nonthaburi: Department of Medical Sciences Ministry of Public Health; 2011. p. 707-708.
3. Council of Europe. European Pharmacopoeia. 11th ed. Strasbourg, France: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare; 2023. p. 1238.
4. พระราชบัญญัติสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ พ.ศ. 2558. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 132 ตอนที่ 18 ก (วันที่ 13 มีนาคม 2558). หน้า 1-16.
5. Rial A, Morais V, Rossi S, Massaldi H. A new ELISA for determination of potency in snake antivenoms. *Toxicon* 2006; 48(4): 462-6.
6. Ibrahim NM, Farid NM. Comparison between two in vitro ELISA-based assays in the determination of antivenom potency. *J Appl Sci Res* 2009; 5(9): 1223-9.
7. Pornmuttakun D, Ratanabanangkoon K. Development of an in vitro potency assay for antivenom against Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*). *Toxicon* 2014; 77: 1-5.
8. ทิพวรรณ นิ่งน้อย. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.
9. Council of Europe. European Pharmacopoeia. 11th ed. Strasbourg, France: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare; 2023. p. 723-726.
10. Rungsiwongse J, Ratanabanangkoon K. Development of an ELISA to assess the potency of horse therapeutic antivenom against Thai cobra venom. *J Immunol Methods* 1991; 136(1): 37-43.
11. Kumar S, Kumar S, Behl Y, Gupta RK. Development and standardization of ELISA as pre-screen test for the potency estimation during commercial production of antisnake venom serum (ASVS). *Am J Biomed Sci* 2014; 6: 20-31.
12. Khaing EM, Hurtado PR, Hurtado E, Zaw A, White J, Warrell DA, et al. Development of an ELISA assay to determine neutralising capacity of horse serum following immunisation with *Daboia siamensis* venom in Myanmar. *Toxicon* 2018; 151: 163-8.
13. Council of Europe. European Pharmacopoeia. 11th ed. Strasbourg, France: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare; 2023. p. 3011-3013.

Development of Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Potency Testing of Cobra Antivenin

Paisan Pangjunan and Wipawee Wongchana

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

ABSTRACT The potency test of cobra antivenin using a mouse neutralizing test is a standard method that is recommended in Thai Pharmacopoeia while the 3Rs principle is recently mentioned according to animal ethics. For that reason, indirect ELISA was developed and validated to replace the use of animals. The results showed that the method was specific to cobra antivenin. The percentage of recovery showed the accuracy of the method at 93.54%. The linearity was acceptable ($R^2 \geq 0.99$) when the relationship between the cobra antivenin serum sample serial dilution from 1/7,500 to 1/120,000 and the OD was plotted. The method was suitable for testing the sample at concentrations ranging between 0.2 and 0.8 mg/ml. The repeatability and intermediate precision showed percentages of coefficient of variation (%CV) were 7.65% and 5.13% respectively. The robustness was acceptable by varying the analysts, assay plates, and reaction times between antigen and antibody which did not show a significant difference. Taken together, the indirect ELISA method proposed to test the potency of cobra antivenin was reliable. It could be applied to study the correlation between the potency value obtained from indirect ELISA and the standard method in the future.

Keywords: Potency test, Cobra antivenin, Indirect ELISA

ช่วงค่าอ้างอิงฮอร์โมนไทรอยด์สติมูเลติงของทารก เกิดก่อนกำหนดและน้ำหนักแรกเกิดน้อย

จารณี พิงโพธิ์สก เพ็ญพรรณ ทองเงา ปิยนันท์ ทิพย์ละคร เพ็ญกมล เทียมศิริ เปี่ยมบุญกุล กระแสร์
และ หรรษา ไทศรี

สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ ทารกเกิดก่อนกำหนดและ/หรือทารกน้ำหนักแรกเกิดน้อย มีระดับ thyroid stimulating hormone (TSH) ต่ำ ทำให้การตรวจคัดกรองได้ผลลบลงและไม่พบทารกที่เป็นภาวะพร่องฮอร์โมนไทรอยด์แต่กำเนิด (congenital hypothyroidism) เพื่อหาช่วงค่าอ้างอิง (reference intervals; RIs) ที่ 2.5th-97.5th percentile และเวลาที่เหมาะสมสำหรับตรวจคัดกรองซ้ำ การศึกษานี้ได้วิเคราะห์ระดับ TSH ของทารกแรกเกิดอายุ 2-7 วัน จากข้อมูลระดับ TSH รวมถึงอายุครรภ์ (gestation ages; GAs) หน่วยเป็นสัปดาห์ และน้ำหนักแรกเกิด (birth weights; BWs) หน่วยเป็นกรัม ย้อนหลัง 2 ปี (2563-2564) ของศูนย์ปฏิบัติการตรวจคัดกรองสุขภาพทารกแรกเกิดแห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยแบ่งทารกเป็น 8 กลุ่ม ตาม GAs และ BWs พบว่า BW ที่ต่ำลงไม่มีผลต่อระดับ TSH ของทารกเกิดที่ GA ≥ 37 ในขณะที่ระดับ TSH ของทารกเกิดที่ GA ≤ 36 มีแนวโน้มต่ำลงตาม GA และ BW ที่ลดลงของทารก ผลการศึกษาพบว่าระดับ TSH ของทารกเกิดที่ GA 32-36 มีค่าใกล้เคียงกับทารกเกิดครบกำหนด โดยกลุ่มทารกที่มี BW มากกว่าหรือเท่ากับ 2,500, 1,500-2,499 และ 1,000-1,499 มี TSH RIs (ในหน่วย mU/L) เท่ากับ 1.67-13.68, 1.56-13.81 และ 0.93-14.46 ตามลำดับ ในขณะที่ทารกเกิดที่ GA < 32 มีค่า TSH RIs ต่ำลงอย่างเห็นได้ชัดในช่วง 0.07-7.22, 0.89-10.14 และ 1.14-10.67 สำหรับทารกเกิดที่ GA < 28 BW $< 1,000$ -2,499, GA 28-31 BW 1,000-1,499 และ GA 28-31 BW 1,500-2,499 ตามลำดับ ดังนั้นเพื่อป้องกันการเกิดผลลบลงจากการตรวจคัดกรอง TSH ในทารกเกิดก่อนกำหนด จึงควรตรวจซ้ำที่อายุของทารกนับจากวันที่มารดามีประจำเดือนครั้งสุดท้ายจนถึงปัจจุบันที่ 32 สัปดาห์ และ ≥ 34 สัปดาห์ ตามลำดับ

คำสำคัญ: ฮอร์โมนไทรอยด์สติมูเลติง, ช่วงค่าอ้างอิง, เกิดก่อนกำหนด, ทารกน้ำหนักแรกเกิดน้อย, ภาวะพร่องฮอร์โมนไทรอยด์แต่กำเนิด

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

Received: 30 October 2022

Revised: 22 March 2023

Accepted: 22 March 2023

บทนำ

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยศูนย์ปฏิบัติการตรวจคัดกรองสุขภาพทารกแรกเกิดแห่งชาติ (ศปก.) ได้ให้บริการตรวจคัดกรองภาวะพร่องฮอร์โมนไทรอยด์แต่กำเนิด (congenital hypothyroidism; CHT) ด้วยการตรวจหาระดับฮอร์โมนไทรอยด์สติมูเลติง (thyroid stimulating hormone; TSH) ในตัวอย่างกระดาศับเลือดที่เก็บจากทารกแรกเกิดอายุมากกว่า 48 ชั่วโมง โดยใช้ยาตรวจวิเคราะห์ชนิด enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ที่ ศปก. พัฒนาและผลิตขึ้นใช้เอง ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2539⁽¹⁾ ซึ่งผลการตรวจคัดกรองระดับ TSH ในตัวอย่างกระดาศับเลือดที่มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 25 มิลลิยูนิตต่อลิตร (milli unit per liter; mU/L) ถือเป็นผลผิดปกติ (TSH cutoff $\geq$ 25 mU/L) มีความเสี่ยงต่อการเป็นโรค CHT⁽¹⁾ และต้องตรวจยืนยันซ้ำด้วยการตรวจหาระดับ TSH และ free thyroxine (FT4) ในตัวอย่างซีรัมของทารก โดยทารกในช่วงอายุ 1 เดือน ที่มีระดับ TSH สูงกว่า 11 mU/L และระดับ FT4 น้อยกว่า 0.83 นาโนกรัมต่อเดซิลิตร ให้ถือว่าทารกนั้นเป็นโรค CHT⁽²⁾ ทารกที่ได้รับการวินิจฉัยและรักษาด้วยการให้ยา levothyroxine (L-T4) อย่างรวดเร็วภายในอายุ 2-4 สัปดาห์ หลังคลอด สามารถป้องกันการเกิดภาวะสติปัญญาบกพร่องจากการขาดฮอร์โมนไทรอยด์ในทารกแรกเกิดได้⁽³⁻⁵⁾ แต่หากได้รับการรักษาล่าช้า จะไม่สามารถแก้ไขสติปัญญาบกพร่องและพัฒนาการทางร่างกายของทารกได้^(6,7) จากการดำเนินงานของ ศปก. ในปี พ.ศ. 2559-2561 พบอุบัติการณ์ของโรค CHT ในประเทศไทยเท่ากับ 5.55 ต่อทารกเกิด 10,000 ราย⁽⁸⁾

แนวทางการวินิจฉัยและรักษาโรค CHT ปี พ.ศ. 2564 ของสมาคมต่อมไร้ท่อเด็กและวัยรุ่นไทย⁽⁵⁾ มีแนวปฏิบัติในการวินิจฉัยโรค CHT ในทารกเกิดก่อนกำหนดที่อายุครรภ์น้อยกว่า 37 สัปดาห์ (preterm; PT) และทารกมีน้ำหนักแรกเกิดน้อยกว่า 2,500 กรัม (low birth weight; LBW) ให้ทารกในกลุ่มดังกล่าวต้องส่งตัวอย่างตรวจคัดกรองโรค CHT จำนวน 2 ครั้ง คือ เมื่อแรกเกิด (อายุ 48-72 ชั่วโมง) และเมื่อทารก

อายุประมาณ 2 สัปดาห์ ในกรณีที่ทารกเกิดเมื่ออายุครรภ์น้อยกว่า 32 สัปดาห์ แนะนำให้ตรวจคัดกรองซ้ำทุก 2 สัปดาห์ จนอายุครรภ์ครบ 37 สัปดาห์ ทั้งนี้เพื่อป้องกันการเกิดผลลบลง (false negative) จากสาเหตุที่แกนของไฮโปทาลามัส-พิทูอิทารี-ไทรอยด์ (Hypothalamic-pituitary-thyroid axis) ของทารก PT และ/หรือ LBW ยังพัฒนาได้ไม่สมบูรณ์ ทำให้หลัง TSH ได้ล่าช้าหรือน้อยกว่าทารกปกติ การตรวจคัดกรองเพียงครั้งเดียวเมื่อตอนแรกเกิดอาจได้ค่า TSH ต่ำ การใช้ค่า TSH cutoff เท่ากับของทารกปกติ จึงทำให้เกิดเป็นผลลบลงได้^(9,10) มีรายงานการศึกษาถึงระดับ TSH ของทารกแรกเกิดโดยทารกปกติที่อายุแรกเกิดน้อยกว่าหรือเท่ากับ 6 วัน มีค่าปกติ (normal range) ของ TSH อยู่ในช่วง 0.7-15.2 mU/L⁽²⁾ และมีการศึกษาพบว่าทารกปกติที่อายุ 49-72 ชั่วโมง มีช่วงค่าอ้างอิง (reference interval) ของ TSH ที่เปอร์เซ็นต์ความถี่สะสมที่ 2.5th - 97.5th เปอร์เซ็นไทล์ (2.5th-97.5th percentiles) เท่ากับ 1.00-17.30 mU/L⁽¹¹⁾ สำหรับทารก PT เกิดที่อายุครรภ์ 31-34 สัปดาห์ และ 25-36 สัปดาห์ มีระดับ TSH ที่อายุ 7 วัน เท่ากับ 3.60 ± 4.80 ($\bar{X} \pm SD$)^(2,12) และ 0.80-2.00 mU/L⁽¹³⁾ ตามลำดับ ส่วนทารก PT และ LBW ซึ่งเกิดที่อายุครรภ์ 22-27 สัปดาห์ มีน้ำหนักแรกเกิดเฉลี่ย 811 กรัม และเกิดที่อายุครรภ์ 28-31 สัปดาห์ มีน้ำหนักแรกเกิดเฉลี่ย 1,383 กรัม มีระดับ TSH อ้างอิงที่อายุ 3-4 สัปดาห์ ที่ 25th-95th percentiles เท่ากับ 8.20-9.00 และ 11.00-11.80 mU/L ตามลำดับ⁽¹⁴⁾ นอกจากนี้พบว่าทารก PT และ LBW ซึ่งเกิดที่อายุครรภ์ 26-36 สัปดาห์ มีน้ำหนักแรกเกิดเฉลี่ย 1,923.3 กรัม มีช่วงค่า TSH อ้างอิงที่อายุ 2-3 สัปดาห์ ที่ 25th-95th percentiles เท่ากับ 1.01-10.14 mU/L⁽¹⁵⁾ เป็นต้น

ในปี พ.ศ. 2564 ศปก. ได้ตรวจคัดกรองโรค CHT ในทารกแรกเกิดจำนวน 501,882 ราย ในจำนวนนี้มีทารกเกิดก่อนกำหนดจำนวน 43,502 ราย (ร้อยละ 8.67) ทารกน้ำหนักแรกเกิดน้อยกว่า 2,500 กรัม จำนวน 47,465 ราย (ร้อยละ 9.46) และทารกเกิดก่อนกำหนดและมีน้ำหนักแรกเกิดน้อยกว่า 2,500 กรัม จำนวน

23,141 ราย (ร้อยละ 4.61) ซึ่งทารกจำนวนทั้งหมดนี้ ต้องถูกเก็บตัวอย่างเพื่อส่งตรวจคัดกรองซ้ำครั้งที่ 2 ถึงแม้ว่าการตรวจคัดกรองโรค CHT ช่วยป้องกันการเกิดผลลบลงได้ แต่การดำเนินการดังกล่าวทำให้ต้นทุนต่อหน่วยของการตรวจคัดกรองโรค CHT สูงขึ้น เพิ่มภาระงานของเจ้าหน้าที่ในการติดตามทารก การเก็บและนำส่งตัวอย่างเพื่อตรวจคัดกรองซ้ำ มีความเสี่ยงที่อาจจะไม่สามารถติดตามตัวอย่างได้ การวินิจฉัยโรคช้ากว่าทารกปกติ คณะผู้วิจัยจึงได้วิเคราะห์ช่วงค่าอ้างอิงของ TSH ในตัวอย่างกระดาศับเลือดของทารกที่เกิดก่อนกำหนด ทารกน้ำหนักน้อยและทารกปกติที่ส่งตรวจคัดกรองโรค CHT ในช่วงปี พ.ศ. 2563 และ 2564 สำหรับนำไปใช้เป็นเกณฑ์อ้างอิงสำหรับตรวจวินิจฉัยและติดตามตัวอย่างตรวจคัดกรองโรคซ้ำในกลุ่มตัวอย่างดังกล่าว เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการให้บริการตรวจคัดกรองโรค CHT

วัสดุและวิธีการ

เกณฑ์การคัดเลือกข้อมูล

การศึกษานี้เป็นแบบย้อนหลัง (retrospective study) โดยรวบรวมข้อมูลผลการตรวจวิเคราะห์ TSH ในตัวอย่างกระดาศับเลือดของทารก 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มทารกปกติเกิดที่อายุครรภ์ ≥ 37 สัปดาห์ และมีน้ำหนักแรกเกิด $\geq 2,500$ กรัม กลุ่มทารกเกิดที่อายุครรภ์ ≥ 37 สัปดาห์ และมีน้ำหนักแรกเกิด $< 2,500$ กรัม กลุ่มทารกเกิดที่อายุครรภ์ < 37 สัปดาห์และมีน้ำหนักแรกเกิด $\geq 2,500$ กรัม และกลุ่มทารกเกิดที่อายุครรภ์ < 37 สัปดาห์และมีน้ำหนักแรกเกิด $< 2,500$ กรัม ที่ส่งตรวจคัดกรองโรค CHT ในปี พ.ศ. 2563 และ 2564

ตัวอย่างกระดาศับเลือดของทารกที่นำข้อมูลมาศึกษาต้องมีคุณสมบัติ ดังนี้ (1) เป็นทารกไทยที่ถูกเจาะเก็บเลือดลงบนกระดาศับที่อายุ 2-7 วัน โดยใบประวัติไม่ระบุว่าเป็นโรคหรือมีภาวะผิดปกติ เช่น ปอดอักเสบ (pneumonia) ภาวะติดเชื้อเร็ว (early onset sepsis; EOS) ภาวะหายใจลำบาก (respiratory distress syndrome; RDS) หรือ หายใจเร็วชั่วคราว

(transient tachypnea of the newborn; TTNB) ภาวะสูดสำลักขี้เทา (meconium aspiration syndrome; MAS) เป็นต้น รวมทั้งต้องไม่ได้รับยาปฏิชีวนะหรือยาอื่น เช่น แอมพิซิลลิน (ampicillin) เพนนิซิลลิน (penicillin) เจนตามัยซิน (gentamicin) คลอกซาซิลลิน (cloxacillin) เซฟแทกซิม (cefotaxime) เป็นต้น (2) ตัวอย่างกระดาศับเลือดมีสภาพบูรณ์ โดยมีหยดเลือดเต็มวงที่ซึมทะลุถึงด้านหลังของวงกระดาศ และไม่เป็นปื้นเชื้อจุลินทรีย์และ/หรือสารเคมี และ (3) มีผลตรวจวิเคราะห์ระดับ TSH ด้วยชุดน้ำยา ELISA ของ ศปก. และใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์ที่อิมมูโนเอสเสย์อัตโนมัติแบบการวัดสีในการตรวจวิเคราะห์ที่ผลการตรวจคัดกรองโรค CHT เป็นผลลบ ($TSH < 25$ mU/L)

การแบ่งกลุ่มทารกแรกเกิด

นำข้อมูลผลการวิเคราะห์ระดับ TSH ของทารกแรกเกิดที่ผ่านการคัดเลือกตามเกณฑ์มาจัดกลุ่ม โดยแยกตามอายุครรภ์⁽¹⁶⁾ และน้ำหนักแรกเกิด⁽¹⁷⁾ ตามเกณฑ์องค์การอนามัยโลก (World Health Organization; WHO) ดังนี้

1. ทารกเกิดที่อายุครรภ์น้อยมากที่สุด (extremely preterm; EPT) อายุครรภ์ < 28 สัปดาห์
2. ทารกเกิดที่อายุครรภ์น้อยมาก (very preterm; VPT) อายุครรภ์ 28-31 สัปดาห์
3. ทารกเกิดที่อายุครรภ์น้อย (preterm; PT) อายุครรภ์ 32-36 สัปดาห์
4. ทารกเกิดที่อายุครรภ์ปกติ อายุครรภ์ ≥ 37 สัปดาห์
5. ทารกเกิดที่น้ำหนักน้อยมากที่สุด (extremely low birth weight; ELBW) น้ำหนัก $< 1,000$ กรัม
6. ทารกเกิดที่น้ำหนักน้อยมาก (very low birth weight; VLBW) น้ำหนัก 1,000-1,499 กรัม
7. ทารกเกิดที่น้ำหนักน้อย (low birth weight; LBW) น้ำหนัก 1,500-2,499 กรัม
8. ทารกเกิดที่น้ำหนักปกติ น้ำหนัก $\geq 2,500$ กรัม

การตรวจวิเคราะห์ระดับ TSH

ตรวจคัดกรองโรค CHT ด้วยการตรวจวัดระดับ TSH ในตัวอย่างกระดาศับเลือด โดยใช้ชุดน้ำยา ELISA ของศปก. ที่พัฒนาและผลิตขึ้นใช้เอง ชุดน้ำยาทุก lot การผลิตผ่านการทวนสอบความถูกต้องทางด้านความเที่ยง (precision) มีค่าสัมประสิทธิ์ความผันแปร (coefficient of variation; CV) น้อยกว่าร้อยละ 20 ความแม่นยำ (accuracy) มีร้อยละการกลับคืน (%recovery) ของสารมาตรฐาน TSH อยู่ในช่วง 80–120 ความไว (sensitivity) พบขีดจำกัดการตรวจพบ (limit of detection) และขีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantification) ของ TSH มีค่าในช่วง 0.20–3.00 mU/L มีความเป็นเส้นตรง (linearity) ของช่วงความเข้มข้น TSH ที่ค่า correlation coefficient (r) มากกว่า 0.9900 อยู่ในช่วง 1–90 mU/L และมีความจำเพาะ (specificity) โดยไม่พบปฏิกิริยาข้ามกับฮอร์โมนฮิวแมนคลอริโอติกโกนาโดโทรปิน (human chorionic gonadotropin; HCG) ฮอร์โมนฟอลลิเคิลสติมูเลติง (follicle stimulating; FSH) และฮอร์โมนลูทีไนซิง (luteinizing hormone; LH)^(18,19)

ตรวจวิเคราะห์ระดับ TSH โดยใช้เครื่องอิมมูโนเอสเสย์อัตโนมัติแบบการวัดสี (Explorer™ G3 Workstation; PerkinElmer, USA) มีขั้นตอนเตรียมตัวอย่าง โดยเจาะกระดาศับเลือดที่มีสารมาตรฐาน TSH ความเข้มข้น 0, 5, 10, 20, 40, 80 และ 160 mU/L และตัวอย่างกระดาศับเลือดของทารกให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1/8 นิ้ว จำนวน 1 วง (เท่ากับปริมาตรซีรัม 1.37–1.71 ไมโครลิตร) ใส่ในไมโครไตเตอร์เพลทชนิด 96 หลุม ที่เคลือบด้วย mouse anti-TSH เติมนัฟเฟอร์สำหรับสกัดเลือดออกจากกระดาศับ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร นำเพลทเก็บในกล่องพลาสติกที่มีความชื้นปิดกล่องให้สนิทและวางไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 16–18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเทของเหลวและกระดาศับทิ้ง ล้างเพลทด้วยน้ำเกลือ 1 ครั้ง ซับเพลทให้แห้ง แล้วนำเพลทเข้าเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ ซึ่งมีขั้นตอนเติมนัฟเฟอร์สำหรับล้างเพลท ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ล้างเพลทซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นเติมนัฟเฟอร์ละลาย

คอนจูเกตของ anti-TSH-HRP ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในไมโครไตเตอร์เพลท บ่มปฏิกิริยาเป็นระยะเวลา 100 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างเพลทซ้ำ 3 ครั้ง เติมนัฟเฟอร์ละลายที่ทำให้เกิดสี ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงในไมโครไตเตอร์เพลท วางเพลทไว้ในที่มืด เมื่อครบเวลา 20 นาที เติมนัฟเฟอร์ละลายหยุดปฏิกิริยา ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในไมโครไตเตอร์เพลทวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450:620 นาโนเมตร ประมวลผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมการประมวลผล (Gen5 3.09; Agilent Technologies, USA) สร้างเส้นโค้งมาตรฐานจากค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นต่างๆ ของสารมาตรฐาน TSH ในกระดาศับเลือด นำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างกระดาศับเลือดมาเทียบกับเส้นโค้งมาตรฐานเพื่ออ่านค่าความเข้มข้น โดยค่าความเข้มข้นที่ได้เป็นค่าความเข้มข้นของ TSH ในซีรัม

การวิเคราะห์ช่วงค่า TSH อ้างอิง

นำข้อมูลระดับ TSH ของทารกแรกเกิดมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม IBM® SPSS Statistics version 23 (IBM Corp., New York, USA) โดยขั้นตอนการวิเคราะห์ช่วงค่า TSH อ้างอิงมีรายละเอียด ดังนี้

การตัดข้อมูล TSH ที่เป็นค่าผิดปกติออกจากชุดข้อมูล

ตัดข้อมูล TSH ที่เป็นค่าผิดปกติ (outliers) ออกจากชุดข้อมูลด้วยวิธีของ Turkey⁽²⁰⁾ โดยคำนวณจากสูตร
ข้อมูลค่าผิดปกติ = ข้อมูลที่มีค่าน้อยกว่า $Q1 - 1.5 \text{ IQR}$
และมีค่ามากกว่า $Q3 + 1.5 \text{ IQR}$

$Q1$ = ค่าของข้อมูลที่เปอร์เซ็นต์ไทล์เท่ากับ 25

$Q3$ = ค่าของข้อมูลที่เปอร์เซ็นต์ไทล์เท่ากับ 75

$\text{IQR} = Q3 - Q1$ (interquartile range)

หลังจากตัด TSH ค่าผิดปกติออกจากชุดข้อมูลแล้ว คำนวณหา TSH ค่าผิดปกติซ้ำจนไม่พบข้อมูลค่าผิดปกติในชุดข้อมูลอีก โดยหลังจากตัดข้อมูลค่า TSH ผิดปกติออกไปแล้วต้องมีจำนวนตัวอย่างของทารกแรกเกิดแต่ละกลุ่มไม่น้อยกว่า 120 ตัวอย่าง⁽²¹⁾

การวิเคราะห์ช่วงค่า TSH อ้างอิง

วิเคราะห์ช่วงค่า TSH อ้างอิง⁽²¹⁾ โดยนำชุดข้อมูลที่ตัดค่า TSH ผิดปกติออก นำมาตรวจสอบการแจกแจงของข้อมูลว่าเป็นแบบปกติ (normal distribution) หรือไม่ โดยใช้สถิติ Kolmogorov-smirnov ทดสอบที่ระดับนัยสำคัญ (∞) เท่ากับ 0.05 ชุดข้อมูล TSH ที่มีการแจกแจงแบบปกติให้วิเคราะห์ช่วงค่าอ้างอิง โดยใช้วิธีพารามิเตอร์ (parametric method) โดยคำนวณค่าเฉลี่ยเลขคณิต (mean; $\bar{X}$) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; SD) ช่วงค่า TSH อ้างอิงเท่ากับ $\bar{X} \pm 2SD$ และทดสอบความแตกต่างของระดับ TSH ระหว่างกลุ่มตัวอย่างด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียวชนิด Completely randomized design ที่ ∞ เท่ากับ 0.05

กรณีที่ชุดข้อมูล TSH มีการแจกแจงแบบไม่ปกติ (non-normal distribution) ให้เปลี่ยนแปลงรูปแบบข้อมูลโดยใช้ Box-Cox transformation แล้วใช้สถิติ Kolmogorov-smirnov ตรวจสอบการแจกแจงของข้อมูลที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ถ้าพบว่าชุดข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติให้วิเคราะห์ช่วงค่าอ้างอิงโดยใช้วิธีพารามิเตอร์ ($\bar{X} \pm 2SD$) แต่กรณีที่พบว่าชุดข้อมูลยังคงมีการแจกแจงแบบไม่ปกติ โดยขนาดตัวอย่างมีจำนวนมากกว่าหรือเท่ากับ 120 ตัวอย่าง และมีค่า skewness (K) มากกว่าเท่ากับ 0.5 ให้วิเคราะห์ช่วงค่า TSH อ้างอิงด้วยวิธีไม่ใช้พารามิเตอร์ (non-parametric method) คำนวณค่ามัธยฐานและค่า TSH อ้างอิงที่เปอร์เซ็นต์ความถี่สะสม (cumulative frequency) ของข้อมูล โดยช่วงค่า TSH อ้างอิง คือ ช่วงของค่า TSH ที่เปอร์เซ็นต์ความถี่สะสมที่ 2.5th–97.5th percentiles และทดสอบความแตกต่างของระดับ TSH ระหว่างกลุ่มตัวอย่าง ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว โดยใช้ Kruskal-Wallis test ที่ ∞ เท่ากับ 0.05

การขออนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาการศึกษาวิจัยในคน

ใช้ข้อมูลตัวอย่างจากโครงการวิจัยที่ได้รับการขออนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาการศึกษาวิจัยในคน กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ รหัสโครงการวิจัยที่ 8/2564 เมื่อวันที่ 8 มิถุนายน 2564

ผล

เมื่อจำแนกกลุ่มทารกแรกเกิดตามอายุครรภ์มารดาที่ทารกเกิดและน้ำหนักแรกเกิดตามเกณฑ์ WHO สามารถแบ่งได้เป็น 8 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยจำนวนทารกแรกเกิดที่ผ่านเกณฑ์การคัดเลือกข้อมูลมีทั้งหมด 131,812 ตัวอย่าง หลังจากตัดข้อมูลค่า TSH ผิดปกติออกจากกลุ่มตัวอย่างทำให้เหลือจำนวนตัวอย่างของทารกแรกเกิด 128,496 ตัวอย่าง ซึ่งอายุครรภ์มารดาที่ทารกเกิดน้อยสุดและมากที่สุด มีค่าเท่ากับ 21 และ 48 สัปดาห์ ตามลำดับ ส่วนน้ำหนักของทารกแรกเกิดน้อยสุดและมากที่สุด มีค่าเท่ากับ 556 และ 6,030 กรัม ตามลำดับ โดยกลุ่ม 4 ทารก EPT และ ELBW to LBW (GA < 28 สัปดาห์ BW < 1,000–2,499 กรัม) เป็นการจัดรวมทารก ELBW, VLBW และ LBW ให้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน เพื่อให้มีตัวอย่างไม่น้อยกว่า 120 ตัวอย่าง ซึ่งเหมาะสมต่อการวิเคราะห์ช่วงค่า TSH อ้างอิง

จากการทดสอบการแจกแจงข้อมูล TSH พบว่าข้อมูล TSH ของทุกกลุ่มทารกแรกเกิดมีการแจกแจงแบบไม่ปกติทั้งก่อนและหลังการเปลี่ยนแปลงข้อมูลด้วย Box-Cox transformation ($p < 0.05$) จึงวิเคราะห์ช่วงค่า TSH อ้างอิงที่ 2.5th–97.5th percentiles ค่ามัธยฐาน ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยพบว่าทารกเกิดครบอายุครรภ์ที่ GA $\geq$ 37 สัปดาห์ มีช่วงค่า TSH อ้างอิงและมัธยฐานไม่ต่ำลงตามน้ำหนักแรกเกิดที่ลดลง ในขณะที่ทารกเกิดก่อนกำหนดที่ GA $\leq$ 36 สัปดาห์ มีช่วงค่า TSH อ้างอิงและมัธยฐานต่ำลงตามอายุครรภ์และน้ำหนักแรกเกิดที่ลดลง โดยทารก EPT และ ELBW to LBW (GA < 28 สัปดาห์ BW < 1,000–2,499 กรัม) มีช่วงค่า TSH อ้างอิงและมัธยฐานต่ำสุดที่ 0.07–7.22 และ 2.34 mU/L ตามลำดับ ซึ่งค่าล่างมีค่าใกล้เคียงและค่าบนของช่วงค่า TSH อ้างอิงและมัธยฐาน มีค่าต่ำกว่าทารกปกติ 1.35 และ 2.62 เท่า ตามลำดับ และเมื่อทดสอบด้วย Kruskal-Wallis test พบว่าระดับ TSH ของกลุ่มทารกแรกเกิดทั้ง 8 กลุ่ม มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 1 กลุ่มทารกแรกเกิดจำแนกตามอายุครรภ์มารดาที่ทารกเกิดและน้ำหนักแรกเกิดตามเกณฑ์ WHO

กลุ่มที่	ลักษณะทารกแรกเกิด	เกณฑ์ WHO	จำนวนทารกแรกเกิดทั้งหมด (ตัวอย่าง) (n = 131,812)	จำนวนทารกแรกเกิดที่นำข้อมูลมาวิเคราะห์* (ตัวอย่าง) (n = 128,496)	อายุครรภ์มารดาที่ทารกเกิด น้อยสุด-มากที่สุด (สัปดาห์)	น้ำหนักทารกแรกเกิด น้อยสุด-มากที่สุด (กรัม)
1	ทารกปกติ (GA $\geq$ 37 สัปดาห์ และ BW $\geq$ 2,500 กรัม)	4,8	120,000	117,011	37-48	2,500-6,030
2	ทารก LBW (GA $\geq$ 37 สัปดาห์ และ BW 1,500-2,499 กรัม)	4,7	5,159	5,047	37-42	1,510-2,468
3	ทารก PT (GA 32-36 สัปดาห์ และ BW $\geq$ 2,500 กรัม)	3,8	1,426	1,384	32-36	2,500-4,980
4	ทารก EPT และ ELBW to LBW (GA < 28 สัปดาห์ และ BW < 1,000-2,499 กรัม)	1,5,6,7	161	149	21-27	506-1,700
5	ทารก VPT และ VLBW (GA 28-31 สัปดาห์ และ BW 1,000-1,499 กรัม)	2,6	318	305	28-31	1,000-1,495
6	ทารก VPT และ LBW (GA 28-31 สัปดาห์ และ BW 1,500-2,499 กรัม)	2,7	272	258	28-31	1,500-2,480
7	ทารก PT และ VLBW (GA 32-36 สัปดาห์ และ BW 1,000-1,499 กรัม)	3,6	160	157	32-36	1,040-1,493
8	ทารก PT และ LBW (GA 32-36 สัปดาห์ และ BW 1,500-2,499 กรัม)	3,7	4,316	4,185	32-36	1,500-2,496

หมายเหตุ: * จำนวนตัวอย่างหลังจากตัดจำนวนทารกแรกเกิดที่มีค่า TSH ผิดปกติ (outlier) ออกจากกลุ่มตัวอย่าง
 GA = Gestation age, BW = Birth weight, PT = Preterm, VPT = Very preterm,
 EPT = Extremely preterm, LBW = Low birth weight, VLBW = Very low birth weight,
 ELBW = Extremely low birth weight

ตารางที่ 2 ช่วงค่า TSH อ้างอิงและมัธยฐานของกลุ่มทารกแรกเกิดจำแนกตามอายุครรภ์มารดาที่ทารกเกิด และน้ำหนักแรกเกิดตามเกณฑ์ WHO

อายุครรภ์มารดา ที่ทารกเกิด (สัปดาห์)	ช่วงค่า TSH อ้างอิง ที่ P2.5 th –P97.5 th (มัธยฐาน)*, **			
	น้ำหนักทารกแรกเกิด (กรัม)			
	≥ 2,500	1,500–2,499	1,000–1,499	< 1,000
≥ 37	1.84–13.77 (6.14)	1.79–14.61 (6.53)	–	–
32–36	1.67–13.68 (5.98)	1.56–13.81 (5.88)	0.93–14.46 (5.76)	–
28–31	–	1.14–10.67 (4.50)	0.89–10.14 (4.10)	–
<28	–	0.07–7.22 (2.34)		

หมายเหตุ: * ช่วงค่า TSH อ้างอิง ที่ P2.5th–P97.5th และมัธยฐานมีหน่วยเป็น mU/L

** Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$)

P2.5th–P97.5th = ความถี่สะสมที่ 2.5th–97.5th percentiles

วิจารณ์

จากการวิเคราะห์ช่วงค่า TSH อ้างอิงในตัวอย่าง กระดาษซับเลือดของทารกแรกเกิด (อายุ 2–7 วัน) ที่ส่งตรวจคัดกรองโรค CHT พบว่าทารกปกติ ($GA \geq 37$ สัปดาห์ BW $\geq 2,500$ กรัม) มีช่วงค่า TSH อ้างอิงที่ 2.5th–97.5th percentiles เท่ากับ 1.84–13.77 mU/L ซึ่งอยู่ในช่วงค่าปกติของทารกอายุน้อยกว่าหรือเท่ากับ 6 วัน⁽²⁾ และอยู่ในช่วงค่า TSH อ้างอิงที่ 2.5th–97.5th percentiles ของทารกอายุ 49–72 ชั่วโมง⁽¹¹⁾ โดยมีช่วงค่า TSH เท่ากับ 0.7–15.2 และ 1.00–17.30 mU/L ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาช่วงค่า TSH อ้างอิงและมัธยฐาน ในกลุ่มทารกเกิดก่อนกำหนดที่อายุครรภ์ ≤ 36 สัปดาห์ พบว่ามีระดับต่ำลงตามอายุครรภ์และน้ำหนักแรกเกิด ที่ลดลง ซึ่งสาเหตุเกิดจากแกนไฮโปทาลามัส-พิทูอิทารี-ไทรอยด์ ของทารกเกิดก่อนกำหนด และ/หรือทารก น้ำหนักแรกเกิดน้อยยังพัฒนาได้ไม่สมบูรณ์ ทำให้หลัง TSH ได้น้อย โดยจะหลัง TSH มากขึ้นตามอายุครรภ์ และน้ำหนักแรกเกิดที่เพิ่มมากขึ้น^(9,10,22) ผลการศึกษา สอดคล้องกับผลการศึกษาที่เปรียบเทียบระดับ TSH ของทารกเกิดก่อนกำหนดและทารกน้ำหนักแรกเกิดน้อย

โดย Murphy N และคณะ⁽²³⁾ พบว่าระดับ TSH เฉลี่ย ($\bar{X} \pm 2SD$) ในช่วง 24 ชั่วโมงแรกหลังคลอดของทารก เกิดก่อนกำหนดที่อายุครรภ์ 24–27 สัปดาห์ มีค่าต่ำที่สุด (2.3 ± 1.5 mU/L) และมีค่าสูงขึ้นเมื่ออายุครรภ์ เพิ่มมากขึ้นที่ 28–30 สัปดาห์ (4.6 ± 2.6 mU/L) และ 31–34 สัปดาห์ (7.3 ± 4.8 mU/L) ตามลำดับ ส่วน Cavazere P และคณะ⁽²⁴⁾ พบว่าระดับ TSH ของทารกน้ำหนักแรกเกิดน้อย ($< 2,500$ กรัม) มีค่าสูงขึ้น ตามน้ำหนักแรกเกิดที่เพิ่มมากขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบ ระดับ TSH ของทารกน้ำหนักแรกเกิดน้อยที่น้ำหนัก เท่ากัน พบว่า ระดับ TSH ของทารกมีค่าสูงขึ้นตามอายุ ของทารกที่เพิ่มมากขึ้น

ผลการวิเคราะห์ช่วงค่า TSH อ้างอิงที่ P2.5th–P97.5th ดังแสดงในตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่าทารก เกิดก่อนกำหนดที่อายุครรภ์ 32–36 สัปดาห์ มีค่าบนของ TSH อ้างอิงใกล้เคียงกับของทารกปกติ แสดงว่าทารกเกิด ที่อายุครรภ์ ≥ 32 สัปดาห์ ส่วนใหญ่มีการหลัง TSH ได้ เทียบเท่ากับทารกปกติ แต่ยังพบทารกที่หลัง TSH ได้ ต่ำกว่าทารกปกติอยู่ในกลุ่มดังกล่าว เนื่องจากพบค่าล่าง ของค่าอ้างอิงต่ำกว่าของทารกปกติโดยมีระดับ TSH ต่ำลง ตามน้ำหนักแรกเกิดที่ลดลง เมื่อเปรียบเทียบที่อายุครรภ์ เท่ากัน นอกจากนี้พบว่าทารกเกิดก่อนกำหนดที่อายุครรภ์

28–31 สัปดาห์ ใช้เวลาประมาณ 4 สัปดาห์ จึงสามารถหลัง TSH ได้มากขึ้นเทียบเท่ากับของทารกปกติ ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลของ Segura SA และคณะ⁽²⁵⁾ ที่ระบุว่าแกนไฮโปทาลามัส-พิทูอิทารี-ไทรอยด์ของทารกเกิดก่อนกำหนด สามารถพัฒนาได้สมบูรณ์มากขึ้นหลังจากเกิดประมาณ 4–6 สัปดาห์ ส่งผลให้สามารถหลัง TSH ได้มากขึ้น ดังนั้นการให้บริการตรวจคัดกรองโรค CHT ของ สปก. ในกลุ่มทารกเกิดก่อนกำหนด โดยใช้ TSH cutoff เท่ากับของทารกปกติ ($TSH \geq 25$ mU/L) ในการติดตามทารกมาเก็บตัวอย่างซีรัม เพื่อตรวจยืนยันโรค ควรตรวจคัดกรองซ้ำที่อายุของทารกนับต่อจากอายุครรภ์มารดา โดยคิดจากวันที่มารดามีประจำเดือนครั้งสุดท้ายจนถึงปัจจุบัน (postmenstrual age) ที่ 32 และ ≥ 34 สัปดาห์ ตามลำดับ การตรวจคัดกรองซ้ำเป็นระยะที่ครอบคลุมอายุทารกที่ครบอายุครรภ์ตั้งแต่ 32 สัปดาห์ขึ้นไป จนถึงครบกำหนดคลอดสามารถป้องกันการเกิดผลลบลงได้ เนื่องจากทารกเกิดที่อายุครรภ์ตั้งแต่ 32 สัปดาห์ขึ้นไป มีการหลัง TSH มากขึ้นในปริมาณที่เทียบเท่ากับทารกปกติ มีรายงานการศึกษาของ Mcgrath N และคณะ⁽²⁶⁾ พบว่าทารกเกิดที่อายุครรภ์น้อยกว่า 32 สัปดาห์ เมื่อตรวจคัดกรองซ้ำครั้งที่ 2 ที่อายุทารกประมาณ 2 สัปดาห์ ยังคงพบผลลบลง ดังนั้นจึงควรตรวจหาระดับ TSH ซ้ำเป็นระยะที่อายุ 2 และ 4 สัปดาห์ และจนเมื่อทารกมีอายุครบกำหนดคลอดปกติหรือเมื่อครบกำหนดออกจากโรงพยาบาล จึงจะป้องกันการเกิดผลลบลงได้ ซึ่ง Kaluarachchi DC และคณะ⁽²⁷⁾ พบการตรวจหาระดับ TSH ซ้ำเป็นระยะตามเวลาดังกล่าวสามารถป้องกันการเกิดผลลบลงในทารกที่เกิดก่อนกำหนดและส่งผลให้พบอุบัติการณ์ของโรคสูงขึ้น

ช่วงค่า TSH อ้างอิงที่ได้จากการศึกษานี้ มีข้อจำกัดที่ไม่สามารถใช้เป็นค่าอ้างอิงในกลุ่มทารกแฝดที่เกิดก่อนกำหนดและ/หรือมีน้ำหนักรากเกิดน้อย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในทารกแฝดเพศเดียวกัน (monozygotic twin) ซึ่งพบว่าการตรวจคัดกรองภายหลังจากคลอด 48 ชั่วโมงมีค่าระดับ TSH ต่ำกว่าทารกปกติ⁽⁵⁾ ซึ่งเป็นผลจากทารก

แฝดส่วนใหญ่เกิดก่อนกำหนดและมีน้ำหนักแรกเกิดน้อย อีกทั้งเกิดการผสมกันของ fetal blood twin ทำให้ระดับ TSH ที่วิเคราะห์ได้มีค่าต่ำกว่าความเป็นจริง เกิดเป็นผลลบลงได้⁽²⁸⁾ ดังนั้นจึงควรวิเคราะห์ช่วงค่า TSH อ้างอิงสำหรับทารกแฝดโดยเฉพาะ เพื่อที่จะนำมาใช้เป็นเกณฑ์อ้างอิงสำหรับตรวจวินิจฉัยและติดตามตัวอย่างตรวจคัดกรองโรคซ้ำสำหรับทารกแฝดต่อไป

สรุป

จากการวิเคราะห์ช่วงค่า TSH อ้างอิงที่ 2.5th–97.5th percentiles ในตัวอย่างกระดาดซับเลือดของทารกแรกเกิด (อายุ 2–7 วัน) ที่ส่งตรวจคัดกรองโรค CHT พบว่าทารกเกิดก่อนกำหนดที่อายุครรภ์ ≤ 36 สัปดาห์ มีระดับ TSH ต่ำลงตามอายุครรภ์และน้ำหนักแรกเกิดที่ลดลง นอกจากนี้พบว่าทารกเกิดก่อนกำหนดที่อายุครรภ์ ≥ 32 สัปดาห์ ส่วนใหญ่มีการหลัง TSH ได้เทียบเท่ากับทารกปกติ ดังนั้นการให้บริการตรวจคัดกรองโรค CHT ในกลุ่มทารกเกิดก่อนกำหนดโดยใช้ TSH cutoff เท่ากับของทารกปกติ ($TSH \geq 25$ mU/L) ควรตรวจคัดกรองซ้ำที่อายุของทารกนับจากวันที่มารดามีประจำเดือนครั้งสุดท้ายจนถึงปัจจุบัน (postmenstrual age) ที่ 32 และ ≥ 34 สัปดาห์ ตามลำดับ ทั้งนี้เพื่อป้องกันการเกิดผลลบลงและไม่พบทารกที่เป็น CHT จากการตรวจคัดกรองโรค

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรมปี พ.ศ. 2565 และ 2566 และขอขอบคุณศูนย์ปฏิบัติการตรวจคัดกรองสุขภาพทารกแรกเกิดแห่งชาติ สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่ได้ให้การสนับสนุนข้อมูลของตัวอย่างสำหรับการศึกษาครั้งนี้ รวมทั้งขอขอบคุณผู้ที่เกี่ยวข้องในการดำเนินงานตรวจคัดกรองสุขภาพทารกแรกเกิดทุกท่าน

เอกสารอ้างอิง

- Charoensiriwatana W, Janejai N, Boonwanich W, Krasao P, Chaisomchit S, Waiyasilp S. Neonatal screening program in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2003; 34(Suppl 3): 94-100.
- Atteih S, Ratner J, Endocrinology. In: Klein K, Mcdaniel L, Molloy M, editors. *The harriet lane book*. 22nd ed. Philadelphia: Elsevier; 2021. p. 235-239.
- Rastogi MV, LaFranchi SH. Congenital hypothyroidism. *Orphanet J Rare Dis* 2010; 5: 17. (22 pages).
- Yarahmadi SH, Tabibi SJ, Alimohammadzadeh Kh, Ainy E, Gooya MM, Mojarrad M, et al. Cost-benefit and effectiveness of newborn screening of congenital hypothyroidism: Findings from a national program in Iran. *Int J Endocrinol Metab* 2010; 1: 1-6.
- สมาคมต่อมไร้ท่อเด็กและวัยรุ่นไทย. แนวทางการวินิจฉัยและรักษา Congenital Hypothyroidism. [ออนไลน์]. กุมภาพันธ์ 2564; [สืบค้น 6 พ.ค. 2564]; [9 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://thaipedendo.org/guideline-for-congenital-hypothyroidism/>.
- Nagasaki K, Minamitani K, Anzo M, Adachi M, Ishii T, Onigata K, et al. Guidelines for mass screening of congenital hypothyroidism (2014 revision). *Clin Pediatr Endocrinol* 2015; 24(3): 107-33.
- Büyükgöbüz A. Newborn screening for congenital hypothyroidism. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2013; 5(Suppl 1): 8-12.
- เปี่ยมบุญกุล กระแสร์, เพ็ญพรรณ ทองเงา, จารณี พึ่งโพธิ์สภ, วิยะดา เจริญศิริวัฒน์, ھرรษา ไทยศรี, อาชวินทร์ ไรจนวิวัฒน์. ภาวะพร่องไทรอยด์ฮอร์โมนแต่กำเนิดในทารกแรกเกิดใน 4 ภูมิภาคของประเทศไทย ช่วงปี พ.ศ. 2559 ถึง 2561. *ว กรรมวิทย์ พ* 2564; 63(2): 259-74.
- Niwa F, Kawai M, Kanazawa H, Iwanaga K, Matsukura T, Hasegawa T, et al. Hyperthyrotropinemia at 2 weeks of age indicates thyroid dysfunction and predicts the occurrence of delayed elevation of thyrotropin in very low birth weight infants. *Clin Endocrinol* 2012; 77(2): 255-61.
- Léger J, Olivieri A, Donaldson M, Torresani T, Krude H, Vliet GV, et al. European Society for Paediatric Endocrinology consensus guidelines on screening, diagnosis, and management of congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99(2): 363-84.
- Jayasuriya MS, Choy KW, Chin LK, Doery J, Stewart A, Bergman P, et al. Reference intervals for neonatal thyroid function tests in the first 7 days of life. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2018; 31(10): 1113-6.
- LaFranchi SH. Thyroid function in preterm/ low birth weight infants: impact on diagnosis and management of thyroid dysfunction. *Front Endocrinol*. 2021; 12: 666207. (9 pages).
- Clark SJ, Deming DD, Emery JR, Adams LM, Carlton EI, Nelson JC. Reference ranges for thyroid function tests in premature infants beyond the first week of life. *J Perinatol* 2001; 21(8): 531-6.
- Kaluarachchi DC, Allen DB, Eickhoff JC, Dawe SJ, Baker MW. Thyroid-stimulating hormone reference ranges for preterm infants. *Pediatrics* 2019; 144(2): e20190290. (7 pages).
- Wang Y, Wu X, Hong K, Fu X, Chen T, Zhu M, et al. Establishment of reference intervals for thyroid hormones in premature infants beyond the first week of life using Beckman Coulter Unicel DxI 800. *Clin Biochem* 2019; 74: 19-23.
- World Health Organization. Preterm birth. [online]. 2018; [cited 2022 Jan 16]; [131 screens]. Available from: URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/preterm-birth>.



17. World Health Organization. ICD-10: international statistical classification of diseases and related health problems: tenth revision, 2nd ed. [online]. 2004; [cited 2022 Jan 16]; [131 screens]. Available from: URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42980>.
18. Magnusson B, Ornemark U, editors. Eurachem guide: the fitness for purpose of analytical method-A laboratory guide to method validation and related topics. 2nd ed. [online]. 2014; [cited 2022 Dec 16]; [62 screens]. Available from: URL: <https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/mv>.
19. Westgard JO. Basic method validation. 3rd ed. Madison: Westgard Quality Corporation, Inc; 2008. p. 1-256.
20. Tukey JW. Exploratory data analysis, volume 2. Addison-Wesley series in behavioral science. Reading, MA: Addison-Wesley Publishing Company; 1977.
21. Higgins V, Asgari S, Adeli K. Choosing the best statistical method for reference interval estimation. Clin Biochem 2019; 71: 14-6.
22. Lafranchi S. Thyroid function in the preterm infant. Thyroid 1999; 9(1): 71-8.
23. Murphy N, Hume R, Toor HV, Matthews TG, Ogston SA, Wu SY, et al. The hypothalamic-pituitary-thyroid axis in preterm infants; changes in the first 24 hours of postnatal life. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89(6): 2824-31.
24. Cavarzere P, Camilot M, Popa FI, Lauriola S, Teofoli F, Gaudino R, et al. Congenital hypothyroidism with delayed TSH elevation in low-birth-weight infants: incidence, diagnosis and management. Eur J Endocrinol 2016; 175: 395-402.
25. Segura SA, Casano-Sancho P, Guindulain MC. Assessment of thyroid function in the preterm and/or very low birth weight newborn. An Pediatr 2021; 95: 277.e1-8.
26. Mcgrath N, Hawkes CP, Mayne P, Murphy NP. Optimal timing of repeat newborn screening for congenital hypothyroidism in preterm infants to detect delayed thyroid-stimulating hormone elevation. J Pediatr 2019; 205: 77-82.
27. Kaluarachchi DC, Allen DB, Eickhoff JC, Dawe SJ, Baker MW. Increased congenital hypothyroidism detection in preterm infants with serial newborn screening. J Pediatr 2019; 207: 220-5.
28. Jiang X, Huang Y, Feng Y, Tang F, Jia X, Chen Q, et al. Same-sex twin have a high incidence of congenital hypothyroidism and a high probability to be missed at newborn screening. Clin Chim Acta 2020; 502: 111-5.

Thyroid Stimulating Hormone Reference Intervals of Preterm and Low Birth Weight Neonates

Jaranee Phoungphosop, Penpan Thong-ngao, Piyanan Thiplakorn, Piangkamol Tiamsiri, Piamnukul Krasao, and Hansa Thaisri

Medical Life Sciences Institute, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Preterm (PT) and/or low birth weight neonates with low levels of thyroid stimulating hormone (TSH) caused false negative results, leading to the missing case of congenital hypothyroidism screening. To determine TSH reference intervals (RIs) at 2.5th–97.5th percentiles and optimal timing for repeat screening, this study analyzed TSH levels in neonates at the age of 2–7 days. Two-year data of TSH levels during 2020–2021 including gestation ages (GAs) as weeks and birth weights (BW) as grams were obtained from the Neonatal Screening Operation Center, Department of Medical Sciences. Eight groups of neonates were categorized according to GAs and BWs, it was shown that the lower BW were not related to TSH levels in neonates born at GA ≥ 37 , whereas those of neonates born at GA ≤ 36 were provided a trend of the lower TSH levels correlated with lower GAs and BWs. The TSH levels of neonates born at the range of GA during 32–36 were nearly the same level as term neonates. It was found that neonates with BW $\geq 2,500$, 1,500–2,499, and 1,000–1,499 had TSH RIs at 1.67–13.68, 1.56–13.81, and 0.93–14.46 mU/L, respectively. On the other hand, neonates born at GA < 32 had remarkably the lower TSH RIs at 0.07–7.22, 0.89–10.14, and 1.14–10.67 mU/L in neonates born at GA < 28 with BW $< 1,000$ –2,499, GA 28–31 with BW 1,000–1,499 and GA 28–31 with BW 1,500–2,499, respectively. Therefore, to prevent false negative results of TSH screening in PT neonates, the repeated samples should be performed at the postmenstrual age of 32 and ≥ 34 weeks, respectively.

Keywords: Thyroid stimulating hormone, Reference interval, Preterm, Low birth weight neonates, Congenital hypothyroidism

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	
Executive Editor	Prapai Wongsinkongman	
Editor	Nuanjan Wichukchinda	
Assistant Editor	Apiwat Tawatsin	Siripakorn Sangkitporn
	Piyada Wangroongsarb	
Editorial Board	Pilaipan Puthavathana	Mahidol University
	Prasert Auewarakul	Mahidol University
	Danai Tiwawech	Naresuan University
	Suwanna Charunut	Huachiew Chalermprakiet University
	Padet Siriyasatien	Chulalongkorn University
	Pornpimol Kongtip	Mahidol University
	Srisurang Tantimavanich	Mahidol University
	Sunee Sirivichayakul	Chulalongkorn University
	Chanitra Thuwajit	Mahidol University
	Pintip Pongpech	Independent Scholar
	Salakchit Chutipongvivate	Independent Scholar
	Usavadee Thavara	Independent Scholar
	Suthon Vongsheree	Independent Scholar
	Wichuda Chittangkura	Independent Scholar
	Supanee Duangteraprecha	Independent Scholar
	Nuanchawee Wetprasit	Independent Scholar
	Wantana Paveenkittiporn	Independent Scholar
	Uryakorn Chansang	Independent Scholar
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
	Pawinee Sukcharoen	Department of Medical Sciences
Office	Medical Sciences Technical Office Department of Medical Sciences	
	88/7 Soi Tiwanond 14, Tiwanond Rd., Nonthaburi 11000, Thailand.	
	Tel. 0-2951-0000 ext. 99662 Fax: 0-2951-1297	
	E-mail : bull.dmsc@dmisc.mail.go.th	
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>