



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

วารสาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 67 ฉบับที่ 1 มกราคม - มีนาคม 2568 • Vol. 67 No. 1 January - March 2025



ISSN 3057-1286 (Print)

ISSN 3057-1308 (Online)

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จัดทำโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เพื่อเผยแพร่ผลงานวิชาการด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ทุกสาขา

เจ้าของ	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข	
ที่ปรึกษาด้านบริหาร	นพ.ยงยศ ธรรมวุฒิ นพ.บัลลังก์ อุปพงษ์	นพ.พิเชฐ บัญญัติ
ที่ปรึกษาด้านวิชาการ	นางพิมพ์ใจ นัยโกวิท ดร.ปนัดดา ชิลวา ดร.สุมล ปวีตรานนท์	ดร.บุษราวรรณ ศรีวรรณนะ ดร.ประไพ วงศ์สินคงมั่น
บรรณาธิการบริหาร	ดร.สุภาพร ภูมิอมร	
บรรณาธิการ	ดร.เดือนถนอม พรหมขัติแก้ว	
รองบรรณาธิการ	นางสิริภากร แสงกิจพร ดร.เกรียงศักดิ์ ฤชุศาสตร์	ดร.นวลจันทร์ วิจักขณ์จินดา ดร.สิริพรรณ แสงอรุณ
คณะบรรณาธิการ	ศ.เกียรติคุณ ดร.พิไลพันธ์ พุฒินะ 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 ชูติพงษ์วิเวท ดร.อุษาวดี ถาวรระ นายสุธน วงษ์ชัย นางวิษชุดา จิตตางกูร ดร.สุภาณี ดวงธีรปรีชา รศ.ดร.นวลฉวี เวชประสิทธิ์ ดร.วันทนา ปวีณกิตติพร ดร.อรุณกร จันทรแสง	มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยนเรศวร มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยมหิดล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ นักวิชาการอิสระ 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.dmasc@dmasc.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 67 ฉบับที่ 1 มกราคม - มีนาคม 2568

Vol. 67 No. 1 January - March 2025

สารบัญ

หน้า

นิพนธ์ต้นฉบับ

- การพัฒนาและประเมินประสิทธิภาพเทคนิค Real-time PCR เพื่อการตรวจยีนดื้อยา
**vancomycin และ methicillin ในเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ
*Enterococcus spp.*** 1
วไลลักษณ์ กาญจนะพิน วรธนีย์ สังข์หิรัญ วัชรภรณ์ คำจุมพล และ วันทนา ปวีณกิตติพร
- การตรวจวินิจฉัยและระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรีย *Leptospira sp.* โดยตรงจากสิ่งส่งตรวจ
ทางคลินิกของผู้ป่วยโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุ 15
นภาพร ศรีเด่น ณัฐพล นุชนทต ชลลดา มีทรัพย์ กาญจนา สอนองบุญ ดารารัตน์ แบ่งดี
เดชา แบ่งใจ และ อาชวินทร์ โรจนวิวัฒน์
- การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวมและ
ปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระในวัคซีนป้องกันเชื้อฮีโมฟิลุส อินฟลูเอนเซ ชนิดบี 28
โดย HPAEC-PAD
ชลดา เพ็ชรไทย กนกพร โล่หอมรินทร์ชัย กัสมา บุญมาก อภิชัย ศุภสารสาทร
และ สุภาพร ภูมิอมร
- ประสิทธิภาพของเครื่องอัลตราโซนิกในการกำจัดลูกน้ำและตัวโม่งยุงลายบ้าน
(*Aedes aegypti*) ในห้องปฏิบัติการ 45
อนุพงศ์ สุขใจ วรณภา ทองไม้ กรณ์ทอง เวียงแก้ว วศิน เทพเนาว์ จัตรสุดา ลัดสูงเนิน
ชาญชัย ทองโสภา และ ทวีชัย วิษณุโยธิน
- การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะของภาพถ่ายเอกซเรย์เต้านม ภาพถ่ายอัลตราซาวด์ 56
และระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคของมะเร็งท่อน้ำนมในระยะลุกลาม
กนกกร ธิปัตย์ นาริรัตน์ อยู่ดี นนธวัชร เบญจกุล สุวรา อิศรไกรศีล และ ปฐมาภรณ์ โมลี

การประเมินวัสดุควบคุมคุณภาพการวัดอัตราการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงสำหรับ วิธี Modified Westergren นันทกร กิจธิสุข สมศักดิ์ ฟองสุภา สุดาวดี คงขำ และ ปราโมทย์ ศรีวานิชรักษ์	73
การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพา ในประเทศไทย โดยใช้วัสดุอ้างอิงแปรรูปจากเลือด วันเพ็ญ ดวงสว่าง เรณูภา ภูาลัย และ อีรวุฒิ บุญรักษา	87
การเผ่าระวังค่าปริมาณรังสีจากเครื่องเอกซเรย์ทันตกรรมแบบใส่ตัวรับภาพไว้ในช่องปาก ในพื้นที่จังหวัดตรัง พัทลุง และสตูล ปีงบประมาณ พ.ศ. 2560–2566 ศิริขวัญ ยั่วเหียง ศิริวรรณ บุญรัตน์ สุขาวลี เชื้อมหวาน และ จีราภรณ์ สงขาว	101
ความเป็นพิษเฉียบพลันและพิษกึ่งเรื้อรังทางปากของผลิตภัณฑ์ Mycoprotein ในหนูแรทสายพันธุ์ Wistar ภัสสรภรณ์ ศรีมังกรแก้ว กฤติกาญจน์ สุวรรณสโรช กอบกุล เหล่าเท้ง ธนาพร พลศักดิ์ และ วรินทร์ ฉำคู่ย์	112

รายงานจากห้องปฏิบัติการ

ผลของการใช้โปรแกรม Nongmamong Blood Glucose Meter IQC Online ในการบริหารจัดการระบบควบคุมคุณภาพเครื่องตรวจวัดน้ำตาลในเลือดชนิดพกพา ในเครือข่ายสุขภาพ อำเภอนองมะโมง จังหวัดชัยนาท สุพัตรา สุวรรณศิริ และ วิทยา จันทโรจน์	135
--	-----

บทความปริทัศน์

การพิจารณาปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อความน่าจะเป็นในการตัดสินใจรับผลิตผล ของห้องปฏิบัติการทดสอบและสอบเทียบ โลมไสล วงศ์จันทา	149
--	-----

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 67 ฉบับที่ 1 มกราคม - มีนาคม 2568

Vol. 67 No. 1 January - March 2025

CONTENTS

Page

Original Articles

- Development and Validation of a Real-time PCR Assay for Vancomycin and Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* spp.** 1
Walailak Ganjanapin, Watthanee Sunghirun, Watcharaporn Kamjumphol, and Wantana Paveenkittiporn
- Diagnosis and Identification of *Leptospira* sp. from Direct Clinical Specimens in Pyrexia of Unknown Origin Patients** 15
Napaporn Sriden, Nattapon Nukhunthod, Chonlada Meesub, Kanjana Sanongboon, Dararat Bangdee, Decha Pangjai, and Archawin Rojanawiwat
- Method Development and Validation for Determination of Total and Free Polysaccharide Content in *Haemophilus influenzae* Type B Vaccine by HPAEC-PAD** 28
Chonlada Petthai, Kanokphon Loamarintchai, Katsama Boonmak, Apichai Supasansatorn, and Supaporn Phumiamorn
- Efficiency of an Ultrasonic Device in Eliminating *Aedes aegypti* Larvae and Pupae under Laboratory Conditions** 45
Anupong Sukjai, Wannapha Thongmo, Kornthong Weangkaew, Wasin Tepnow, Chatsuda Latsungnoen, Chanchai Thongsopa, and Taweechai Wisanuyothin
- A Study of Correlation between Mammographic and Ultrasonographic Features and Histologic Grade in Invasive Ductal Carcinoma of the Breast** 56
Kanokkorn Thipat, Nareerat Yoodee, Nontawat Benjakul, Suwara Issaragrisil, and Patamaporn Molee

	Page
Evaluation of Control Materials for Erythrocyte Sedimentation Rate Measurement by Using the Modified Westergren Method <i>Nundakorn Kittisuk, Somsak Fongsupa, Sudawadee Kongkhum, and Pramote Sriwanitchrak</i>	73
A Comparative Study of the Performance of Blood Glucose Meters in Thailand Using Blood-Derived Reference Materials <i>Wanpen Duangsawang, Renuka Pooalai, and Thirawut Bunraksa</i>	87
Surveillance of Patient Entrance Dose of Intra-oral Dental Radiography in Trang, Phatthalung, and Satun Provinces During 2017–2023 <i>Sirikwan Yewhiang, Siriwan Buncharat, Suchawalee Chuamahawan, and Jeeraporn Songkow</i>	101
Acute and Sub-Chronic Oral Toxicity of Mycoprotein Product in Wistar Rats <i>Passaraporn Srimangkornkaew, Kittigan Suwannasaroj, Kobkul Laoteng, Thanaporn Palasak, and Warinthon Chamkhuy</i>	112

Laboratory Finding

The Effects of Nongmamong Blood Glucose Meter IQC Online Program for Quality Control Management System of Blood Glucose Meter in Nongmamong District Healthcare Service, Chainat <i>Supattra Suwansiri and Wittaya Juntaroje</i>	135
--	-----

Review article

Consideration of Key Factors Affecting the Probability of False Acceptance of Testing and Calibration Laboratories <i>Lomsalai Wongchanta</i>	149
---	-----

การพัฒนาและประเมินประสิทธิภาพเทคนิค Real-time PCR เพื่อการตรวจยีนดื้อยา vancomycin และ methicillin ในเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Enterococcus* spp.

วไลลักษณ์ กาญจนะพิน¹ วรณิ สังข์ศิริ¹ วัชรภรณ์ คำจุมล² และ วันทนา ปวิณกิตติพร²

¹ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12 สงขลา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อำเภอเมือง สงขลา 90100

²สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA), methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) และ vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. (VRE) เป็นเชื้อแบคทีเรียดื้อยาในกลุ่มแกรมบวกที่ใช้เป็นสัญญาณเตือนการแผ่รังสีเชื้อดื้อยาระดับประเทศ การตรวจยีนดื้อยาของเชื้อกลุ่มนี้ต้องการเทคนิคที่รวดเร็วและแม่นยำสูง การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธี Real-time PCR สำหรับตรวจยีนดื้อยาสำคัญชนิด *van* และ *mec* ของกลุ่มแบคทีเรียดื้อยา VRE และ MRSA ตามลำดับ และแผ่รังสีเชื้อ VRSA ในการทดสอบรอบเดียว เพื่อใช้ติดตามสถานการณ์การดื้อยาและยีนดื้อยาอย่างต่อเนื่อง การประเมินประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาที่ใช้ 3 หลอดปฏิกิริยาในการตรวจ พบว่าสามารถตรวจยีน *vanA* ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 0.6 CFU/μL และยีน *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3* และ *mecA* ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 6.0 CFU/μL ค่า PCR efficiency ของการตรวจทั้ง 5 ยีน อยู่ในช่วง 89–103% การเปรียบเทียบความสอดคล้องของวิธีที่พัฒนากับวิธี PCR เมื่อตรวจตัวอย่างเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานที่เป็นเชื้อดื้อยา VRE และ MRSA ที่เก็บรวบรวมที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12 สงขลา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในระหว่าง พ.ศ. 2564–2566 จำนวน 132 สายพันธุ์ พบความสอดคล้องตรงกันอย่างสมบูรณ์ ($\kappa = 1.0$) ค่าความไวและความจำเพาะ ร้อยละ 100 วิธีที่พัฒนานี้สามารถรายงานผลได้เร็วขึ้น เนื่องจากสามารถตรวจยีน *van* และ *mec* ได้ในการทดสอบครั้งเดียวกัน และไม่มีขั้นตอนหลังปฏิกิริยา PCR จึงสามารถนำไปใช้ในงานประจำในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาที่มีตัวอย่างตรวจจำนวนมากได้

คำสำคัญ : เรียลไทม์พีซีอาร์, VRE, VRSA, MRSA

Corresponding author E-mail: walailak.k@dmasc.mail.go.th

Received: 16 March 2024

Revised: 22 November 2024

Accepted: 19 December 2024

บทนำ

แผนยุทธศาสตร์การจัดการการดื้อยาของประเทศไทย กำหนดให้ vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA), methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) และ vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. (VRE) เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกดื้อยาสำคัญที่ใช้เป็นสัญญาณเตือนการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาระดับประเทศ^(1,2) ดังนั้นการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยา การศึกษาวิจัยด้านเชื้อดื้อยา และการพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ให้รวดเร็ว ทันสมัย จึงมีความสำคัญและควรดำเนินการอย่างต่อเนื่อง

MRSA เป็นปัญหาสำคัญของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลและมีรายงานการพบในชุมชนเพิ่มมากขึ้น เชื้อนี้มีกลไกการดื้อยา methicillin ด้วยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผนังเซลล์ที่ penicillin binding protein (PBP) เป็นชนิด penicillin binding protein 2a (PBP2a) โดยการควบคุมของยีน *mecA* ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้ส่งผลให้ยาเข้าสู่เซลล์ได้ลดลง โดยยีนดื้อยานี้มีในโครงสร้างทางพันธุกรรมเคลื่อนที่ชนิด staphylococcal cassette chromosome (SCC) *mec* สามารถส่งต่อยีนดื้อยาจากเชื้อสายพันธุ์หนึ่งสู่อีกสายพันธุ์หนึ่งได้ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาได้อย่างรวดเร็ว⁽³⁻⁶⁾ ดังนั้น vancomycin จึงเป็นยาที่มีบทบาทสำคัญในการรักษาการติดเชื้อรุนแรงที่เกิดจากแบคทีเรียแกรมบวก จากรายงานการศึกษาในประเทศไทย พบอุบัติการณ์ของเชื้อ MRSA ในประเทศไทยมีผลความไวลดลงต่อยา vancomycin เรียกว่า vancomycin intermediate *S. aureus* (VISA) ซึ่งเป็นสัญญาณบ่งชี้ถึงโอกาสที่อาจเกิดการดื้อยา⁽⁷⁻⁹⁾ แม้ว่าปัจจุบันยังไม่พบ VRSA ในประเทศก็ตาม แต่ควรมีระบบการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยานี้ในโรงพยาบาลที่มีการพบ MRSA สูง เนื่องจากมีรายงานการพบเชื้อดื้อยา VISA และ VRSA เพิ่มขึ้นในหลายประเทศ^(10,11) จากการศึกษาพบว่าเชื้อ MRSA ไวต่อยา vancomycin ลดลง และพบยีนชนิด *vanA* มีความเกี่ยวข้องกับการดื้อยาของเชื้อ VRSA ซึ่งยีนชนิด MRSA ได้รับการถ่ายทอดยีนจาก VRE ที่มักพบการติดเชื้อร่วมกันหรือ co-infection⁽¹²⁾ นอกจากนั้น vancomycin ยังใช้เป็น

ยารักษาผู้ป่วยติดเชื้อ *Enterococcus* spp. ซึ่งเป็นหนึ่งในสาเหตุของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลที่พบได้บ่อยเช่นกัน และจากการใช้ยานี้ในการรักษาผู้ป่วยทำให้พบเชื้อดื้อยา VRE โดยเฉพาะ *E. faecium* เพิ่มมากขึ้น จากปี พ.ศ. 2555 ร้อยละ 0.7 เป็น ร้อยละ 12.8 ในปี พ.ศ. 2563^(13,14) การดื้อยา vancomycin เกิดจากยีนชนิด *van* ได้แก่ *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE* และ *vanG* ซึ่งแต่ละยีนควบคุมการดื้อยาและมีระดับการดื้อต่อยา vancomycin ต่างกัน ชนิดของยีนดื้อยาที่พบมากในเชื้อ VRE ได้แก่ *vanA*, *vanB* และ *vanC* ซึ่งอยู่บน mobile genetic element transposon ทำให้มีการถ่ายทอดไปยังเชื้ออื่นได้ง่าย ส่งผลให้เกิดการแพร่เชื้อดื้อยา vancomycin อย่างรวดเร็ว^(15,16) ทำให้ Enterococci ที่ดื้อต่อยา vancomycin กลายเป็นข้อกังวลหลักในทางแพทย์ เนื่องจากความชุกที่เพิ่มขึ้นและความสามารถในการถ่ายทอดยีนการดื้อยา vancomycin ไปยังแบคทีเรียอื่นๆ รวมถึง *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อต่อ methicillin ทำให้ต้องเฝ้าระวังเชื้อกลุ่มนี้ต่อเนื่อง^(12,17) การตรวจยีนดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้จึงควรใช้เทคนิคที่รวดเร็วและมีความแม่นยำสูง มีรายงานการพัฒนาเทคนิค Real-time PCR ใช้ในการตรวจยีนดื้อยาคือ *van* เพื่อเฝ้าระวังการดื้อยาของเชื้อ VRE และ VRSA⁽¹⁸⁻²³⁾ รวมทั้งการตรวจยีนดื้อยาคือ *mecA* ในเชื้อกลุ่ม MRSA⁽²⁴⁾ ซึ่งชนิดของเชื้อและยีนดื้อยาที่ตรวจวิเคราะห์จะแตกต่างกันตามชนิดของเชื้อที่เป็นปัญหาของประเทศหรือเชื้อที่พบเป็นปัญหาของโรงพยาบาลนั้นๆ ซึ่งเทคนิคนี้สามารถใช้ไพรเมอร์ (primer) และโพรบ (probe) ที่จำเพาะในการตรวจยีนที่หลากหลาย ไม่มีขั้นตอน post amplification detection สามารถลดขั้นตอนและลดระยะเวลาได้⁽¹⁸⁾ ปัจจุบันประเทศไทยใช้วิธี PCR ในการตรวจยีนดื้อยา ซึ่งมีขั้นตอนยุ่งยาก อีกทั้งการตรวจยีนดื้อยายังจำกัดอยู่เฉพาะในห้องปฏิบัติการผู้เชี่ยวชาญเฉพาะหรือห้องปฏิบัติการอ้างอิง แต่หากมีการพัฒนาวิธีที่รวดเร็ว ลดขั้นตอนการทำงาน และมีความถูกต้อง แม่นยำสูง จะช่วยให้การตรวจยีนดื้อยาทำได้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาของโรงพยาบาลต่างๆ ได้มากขึ้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของระบบเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาด้านจุลชีพ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจยีนดื้อยา vancomycin ชนิด *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3* และยีนดื้อยา methicillin ชนิด *mecA* ในเชื้อกลุ่ม VRE, VRSA และ MRSA ในครั้งเดียวด้วยเทคนิค Real-time PCR สำหรับตรวจวิเคราะห์หา ยีนดื้อยาในกลุ่มเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่เฝ้าระวังการดื้อยาในการทดสอบคราวเดียวกัน โดยประเมินประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาเปรียบเทียบกับวิธี PCR

วัสดุและวิธีการ

เชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียที่มียีนดื้อยา สายพันธุ์มาตรฐาน *E. faecalis* DMST 8308 และ DMST 10785 *E. gallinarum* DMST 6979 และ DMST 11914 และ *S. aureus* DMST 22168 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ใช้เป็นตัวควบคุมผลบวกของการตรวจยีนดื้อยาชนิด *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3* และ *mecA* ตามลำดับ⁽²⁵⁾ เพื่อประเมินประสิทธิภาพ ความไวและความจำเพาะของวิธี Real-time PCR ที่พัฒนา เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกสายพันธุ์มาตรฐานอื่นๆ จำนวน 23 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. aureus* (ATCC 25923, DMST 64483, DMST 59042 และ ATCC 29213), *S. pneumoniae* (ATCC 49619 และ DMST 64428), *S. epidermidis* (DMST 15505), *S. saprophyticus* (DMST 15906), *E. faecium* (DMST 65241), *E. faecalis* (DMST 65233 และ DMST 65234), *B. subtilis* (DMST 23936), *B. cereus* (DMST 24704), *S. saprophyticus* (DMST 15906), *Clostridium sporogenes* (DMST 15282), *C. perfringens* (DMST 16637), *C. bifermentans* (DMST 22355), *C. diphtheriae* (DMST 7471 และ DMST 7472) และ *C. diphtheriae* toxigenic strain ที่แยกได้จากผู้ป่วย จำนวน 4 สายพันธุ์ และเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่เก็บรวบรวมจากโรงพยาบาลเครือข่าย ในช่วงปี พ.ศ. 2564-2566 ในโครงการพัฒนาระบบเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพระดับชาติสู่ระดับโลก การพัฒนาเครือข่ายห้องปฏิบัติการอ้างอิงส่วนภูมิภาค กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จำนวน 109 สายพันธุ์

ที่มีการตรวจด้วยวิธี PCR⁽²⁶⁻²⁸⁾ แบ่งเป็นสายพันธุ์ vancomycin-resistant Enterococci (VRE) จำนวน 52 สายพันธุ์ vancomycin susceptible Enterococci (VSE) จำนวน 12 สายพันธุ์ methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) จำนวน 35 สายพันธุ์ Methicillin susceptible *S. aureus* จำนวน 5 สายพันธุ์ *E. faecalis* จำนวน 5 สายพันธุ์ เชื้อทั้งหมดเก็บรักษาในกลีเซอรอล (glycerol) ความเข้มข้น 15% ที่ตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส (Haier, ULT Freezer, Haier Biomedical, China)

การสกัดสารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรียที่เก็บรักษามาเพาะเลี้ยงใน tryptic soy agar (Biomed, Thailand) บ่มที่ตู้เพาะเชื้อ (Mettler, IF450, Mettler, Germany) อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อโคโลนีของเชื้อ จำนวน 1 loop ลงในหลอด microcentrifuge ที่มีสารละลาย lysis buffer (0.25% SDS และ 0.05 M NaOH) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ปิดฝาให้สนิทด้วยแผ่นพาราฟิล์ม ผสมให้เข้ากัน และนำไปต้มที่อ่างควบคุมอุณหภูมิแบบแห้ง (Biosan, Thermo Block TDB-120, Biosan, Latvia) อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง (Eppendorf, C5430, Eppendorf, Germany) ที่ความเร็วรอบ 12,000 g เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาใช้ปิเปต (Biohit, Proline, Sartorius, Finland) ดูดส่วนใสที่มี DNA ของเชื้อลงในหลอด microcentrifuge เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และนำไปสกัดสารพันธุกรรมด้วยชุดน้ำยา nucleic acid extraction kit B-200 (Zybio, B-200, Zybio, China) โดยใช้เครื่องสกัดสารพันธุกรรมอัตโนมัติ (Zybio, รุ่น EXM3000, China) ได้ตัวอย่าง DNA ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และวัดความบริสุทธิ์ของ DNA ที่สกัดด้วยเครื่อง Nanodrop Lite Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA) จากนั้นเก็บตัวอย่าง DNA ระหว่างรอการตรวจตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Haier, Deep Freezer, Haier Biomedical, China)

การตรวจหายีนดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ด้วย วิธี Real-time PCR

การตรวจหายีนดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3* และ *mecA* ด้วยวิธี Real-time PCR ประยุกต์ใช้ไพรเมอร์ (primer) และ โพรบ (probe) ที่จำเพาะกับแต่ละยีนจาก Flipse J และคณะ⁽²⁰⁾ และ Galia L และคณะ⁽²⁴⁾ สังเคราะห์โดย Bionics Co. Ltd. (Seoul, South Korea) รายละเอียดของ primer และ probe ดังแสดงในตารางที่ 1 การตรวจแบ่งเป็น 3 หลอด/ปฏิกิริยา โดยหลอดที่ 1 ทำปฏิกิริยาแบบ duplex สำหรับยีน *vanA*, *vanB* หลอดที่ 2 ทำปฏิกิริยาแบบ duplex สำหรับยีน *vanC1*, *vanC2/C3* และหลอดที่ 3 ทำปฏิกิริยาแบบ single สำหรับยีน *mecA*

ทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของ primer และ probe ที่ความเข้มข้น 100, 200, 400 และ 800 nM/reaction และทดสอบหาอุณหภูมิเหมาะสมในการทำปฏิกิริยา โดยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม CFX96 (Bio-Rad, USA) ประกอบด้วยขั้นตอน initiation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อ denature และกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ polymerase จากนั้นเพิ่มจำนวน 42 รอบ โดย denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที ส่วนขั้นตอน annealing และ extension ทดลองใช้อุณหภูมิเดียวกันที่ระหว่างอุณหภูมิ 56-62 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที เลือกความเข้มข้นของ primer, probe และอุณหภูมิสำหรับการทำปฏิกิริยา โดยพิจารณาจากค่า Ct และ s curve จากกราฟที่เกิดขึ้น เพื่อใช้ในการประเมินวิธี Real-time PCR ต่อไป

เตรียมหลอดปฏิกิริยา ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย PCR master mix (Roche Light Cycler[®] 480 Probe Master, USA), forward primer, reverse primer และ probe สำหรับแต่ละยีน ปิเปิด DNA template ความเข้มข้น 3 ng/ μ L ปริมาตร 5 ไมโครลิตร โดยใช้ DNA ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานชนิด *E. faecalis* DMST 8308 และ DMST 10785, *E. gallinarum* DMST 6979 และ DMST

11914, *S. aureus* DMST 22168 เป็นตัวควบคุมผลบวก ในการตรวจยีนดื้อยาชนิด *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3* และ *mecA* ตามลำดับ และ DNase- RNase free water ใช้เป็นตัวควบคุมแบบไม่มี DNA ต้นแบบ (no template control; NTC) ในการทดสอบ

การประเมินประสิทธิภาพของวิธี Real-time PCR ที่พัฒนา

ประเมินประสิทธิภาพของวิธี Real-time PCR โดยการหาช่วงปริมาณเชื้อ (detection range) และ ค่าความเข้มข้นของเชื้อปริมาณต่ำสุด (limit of quantification; LOQ) ที่ primer และ probe จำเพาะของแต่ละยีนสามารถตรวจได้ด้วยเทคนิคที่พัฒนาขึ้น โดยเชื้อโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน จำนวน 5 สายพันธุ์ ดังที่กล่าวข้างต้น ซึ่งเพาะเลี้ยงบน tryptic soy agar ใส่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิตร และปรับความขุ่นของเชื้อให้เท่ากับ 0.5 MacFarland Standard หรือเท่ากับ 1.5×10^8 CFU/mL นำเชื้อ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ไปสกัดได้ DNA ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อเป็นตัวควบคุมปฏิกิริยาผลบวก นำ DNA ที่สกัดได้จากที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 6 ความเข้มข้น (10 fold serial dilution) เริ่มจากความเข้มข้น 6.0×10^4 - 0.6 CFU/ μ L จากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี Real-time PCR ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ และสร้าง standard curve คำนวณค่า PCR efficiency, coefficient of correlation (R^2) และ linearity ด้วยโปรแกรม Bio-Rad CFX Manager ของเครื่อง CFX96 Real-Time PCR Detection System โดยค่า PCR efficiency เป็นการประเมินประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมาย (PCR amplicon) ในการตรวจวิเคราะห์ โดยปฏิกิริยาที่ดีควรมีค่า efficiency อยู่ระหว่าง 90-110% ส่วน R^2 เป็นการประเมินความสัมพันธ์เชิงเส้นของตัวแปรในการทดสอบโดยการเจือจาง DNA ของตัวควบคุมผลบวก ซึ่งค่า R^2 ควรมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 0.98 และ linearity ของการวัดควรมีช่วงการวัดที่กว้างและสามารถตรวจ DNA ได้ในระดับต่ำ

ตารางที่ 1 Primer และ probe สำหรับการตรวจหา *van* และ *mec* โดยวิธี Real-time PCR

Target gene	Primer/probe	Sequence (5' → 3')	T _m * °C	PCR product (bp)
<i>vanA</i>	<i>vanA</i> _forward	GCCGGAAGGCTCTGAA	56.03	67
	<i>vanA</i> _reverse	TCCTCGCTCCTCTGCTGAA	59.34	
	<i>vanA</i> _probe-FAM	ACGCAGTTATAACCGTTCCCGCAGACC		
<i>vanB</i>	<i>vanB</i> _forward	CGCAGCTTGCATGGACAA	57.24	58
	<i>vanB</i> _reverse	GGCGATGCCCCGATT	54.11	
	<i>vanB</i> _probe-HEX	TCACTGGCCTACATTC		
<i>vanC1</i>	<i>vanC1</i> _forward	CTTATGTTGGTTGCCATGTCG	55.54	138
	<i>vanC1</i> _reverse	CGATTGTGGCAGGATCGTT	55.84	
	<i>vanC1</i> _probe-FAM	TGGCTCTTGCATCAACTTGCTGATACCA		
<i>vanC2/C3</i>	<i>vanC2/3</i> _forward	GCACTCCAATCATCTCCCTATG	56.72	113
	<i>vanC2/3</i> _reverse	CAYGTGTCTTGTCTGGATGTT	54.27	
	<i>vanC2/3</i> _probe-HEX	TAYGACCTCTCTTTGATCGGGATCRCC		
<i>mecA</i>	<i>mecA</i> _forward	CAATGCCAAAATCTCAGGTAAAGTG	57.69	107
	<i>mecA</i> _reverse	AACCATCGTTACGGATTGCTTC	56.68	
	<i>mecA</i> _probe-FAM	ATGAGCTATATGAGAACGG		

หมายเหตุ: *คำนวณ melting temperature (T_m) ด้วยวิธี Nearest Neighbor โดย OligoCalc <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>

การทดสอบความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) เชิงวิเคราะห์ของวิธีตรวจ

การตรวจหาเชื้อดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ด้วยวิธี Real-time PCR โดยการหาปริมาณ DNA ที่ primer และ probe จำเพาะของแต่ละยีน โดยนำ DNA ที่สกัดเพื่อเป็นตัวอย่างผลบวก เจือจางที่ความเข้มข้น ต่างๆ จำนวน 6 ความเข้มข้น เริ่มจากความเข้มข้นของ เชื้อเท่ากับ $6.0 \times 10^4 - 0.6$ CFU/ μ L จากนั้นวิเคราะห์ ด้วยวิธี Real-time PCR และสร้าง standard curve เพื่อใช้สำหรับอ้างอิงการเปรียบเทียบหาความเข้มข้นของ เชื้อที่สามารถตรวจพบได้ ดำเนินการทดสอบ primer, probe และสภาวะของปฏิกิริยาที่เหมาะสม โดยเตรียม DNA ของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกสายพันธุ์มาตรฐาน อื่นๆ จำนวน 23 ชนิด และ DNA ของเชื้อแบคทีเรีย ดื้อยาชนิด VRE, MRSA และแบคทีเรียสายพันธุ์ ไม่ดื้อยาที่ได้รับการตรวจยืนยันด้วยวิธี PCR จาก สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข⁽²⁶⁻²⁸⁾ จำนวน 109 สายพันธุ์ มาตรวจด้วยวิธี Real-time PCR ที่พัฒนา

อ่านผล และประเมินผลความไวและความจำเพาะของวิธี ที่พัฒนาขึ้นด้วยการคำนวณทางสถิติ

การคำนวณทางสถิติ

ประเมินความสอดคล้องของวิธี Real-time PCR กับวิธี PCR ด้วยสถิติ kappa analysis และประเมินค่า sensitivity, specificity, accuracy, positive predictive value และ negative predictive value โดยคำนวณด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป MedCalc-version 22.026

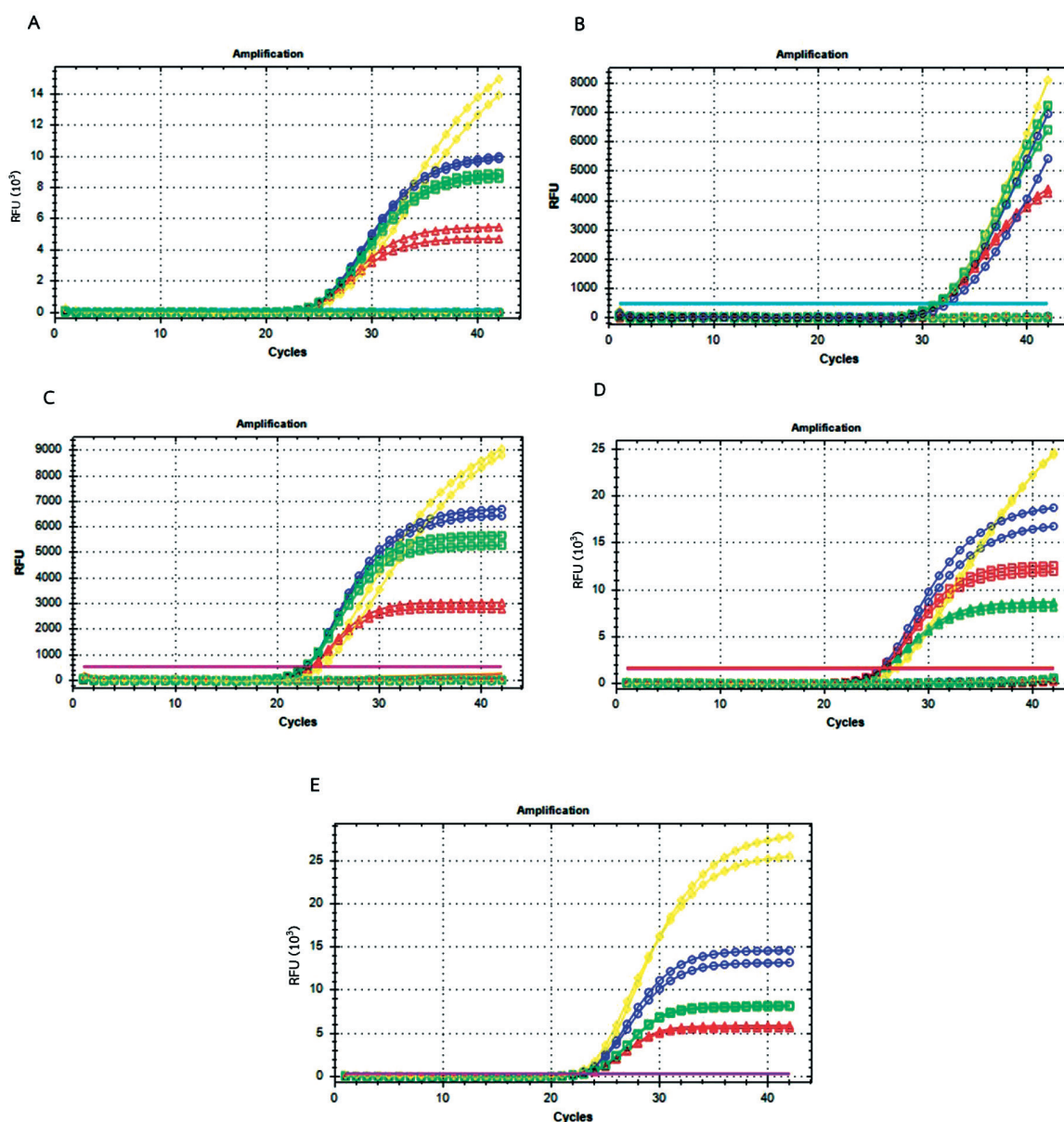
จริยธรรมการวิจัย

การศึกษานี้ผ่านการรับรองจริยธรรมการวิจัย จากคณะกรรมการพิจารณาการศึกษาวิจัยในคน กรม วิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข รหัสเอกสาร รับรองหมายเลข DMSc-EC027 อนุมัติวันที่ 25 ตุลาคม พ.ศ. 2567

ผล

วิธี Real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นสำหรับตรวจหายีนดื้อยาในเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกกลุ่ม VRSA, VRE และ MRSA โดยทดสอบกับแบคทีเรียดื้อยาสายพันธุ์มาตรฐาน *E. faecalis* DMST 8308 และ DMST 10785, *E. gallinarum* DMST 6979 และ DMST 11914 และ *S. aureus* DMST 22168 ที่มียีนดื้อยา *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3* และ *mecA* ตามลำดับ เป็นตัวควบคุมผลบวก ด้วยชุด primer และ

probe ของแต่ละยีนในการทดสอบเพียงครั้งเดียว ดำเนินการทดสอบความเข้มข้นของ primer และ probe ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาเป็น 400 nM forward primer, 400 nM reverse primer, 200 nM probe สำหรับทุกยีน ดังแสดงในภาพที่ 1 มีสภาวะของปฏิกิริยา Real-time PCR ที่เหมาะสมในการทดสอบยีนทั้ง 5 ชนิด คือ 95 องศาเซลเซียส 15 นาที จำนวน 1 รอบ และ 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที, 60 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 42 รอบ ผลการทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 2



ภาพที่ 1 Amplification curve จากปฏิกิริยา Real-time PCR ของการตรวจยีนชนิด *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3* และ *mecA* ดังภาพ A-E ตามลำดับ โดยพิจารณาจากความเข้มข้นของ primer ที่ 100, 200, 400 และ 800 nM ต่อปฏิกิริยา ซึ่งแสดงด้วยกราฟสีแดง, สีเขียว, สีน้ำเงิน และสีเหลือง ตามลำดับ

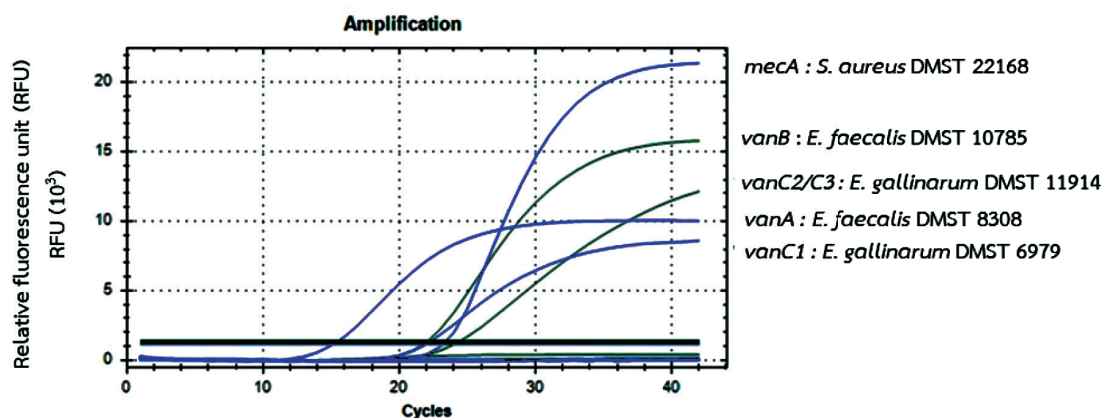
และกราฟแสดงลักษณะเป็น s-curve และไม่พบสัญญาณรบกวน (noise band) ในการทดสอบทุกยีน อีกทั้งพบผลการทดสอบถูกต้องเมื่อทดสอบกับ DNA ของตัวควบคุมผลบวกและตัวควบคุมผลลบ ร้อยละ 100 ดังแสดงในภาพที่ 2 เมื่อตรวจผลผลิต PCR ของยีน *vanA*, *vanB*,

vanC1, *vanC2/C3* และ *mecA* มีขนาด 67, 58, 138, 113 และ 107 bp ตามลำดับ โดยการเปรียบเทียบขนาดกับ 100 bp DNA ladder (New England Biolabs Inc., USA) ใน 2% agarose ภายหลังจากการทำ electrophoresis ดังแสดงในภาพที่ 3

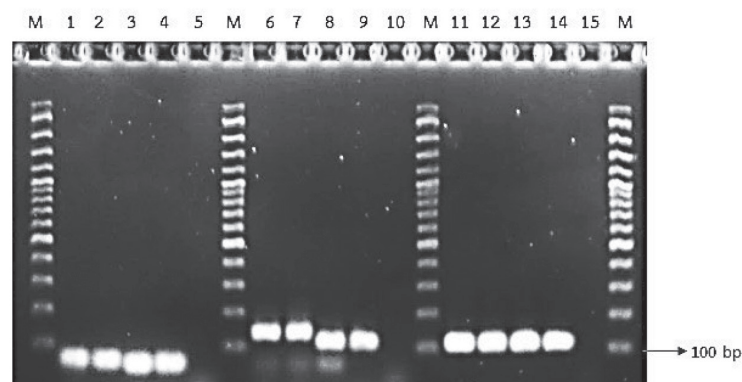
ตารางที่ 2 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมนำมาใช้ในช่วง annealing ของปฏิกิริยา Real-time PCR ที่สามารถตรวจทุกยีนได้ในครั้งเดียว

ยีนเป้าหมาย	Annealing temperature/Mean-Cq value					
	62.0 °C	61.0 °C	60.0 °C	57.8 °C	57 °C	56 °C
<i>vanA</i>	27.72	27.56	27.62	27.78	27.72	23.48
<i>vanB</i>	28.80	27.07	25.84	24.64	24.71	ND
<i>vanC1</i>	26.13	25.50	25.28	25.32	25.37	ND
<i>vanC2/C3</i>	25.91	25.85	25.98	26.82	26.03	ND
<i>mecA</i>	30.91	31.09	31.20	32.38	ND	ND

หมายเหตุ: ND = not detected



ภาพที่ 2 Amplification curve ของการตรวจยีนชนิด *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3* และ *mecA* ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานที่เป็นตัวควบคุมผลบวกของแต่ละยีนด้วยวิธี Real-time PCR



ภาพที่ 3 Gel electrophoresis ผลการตรวจยีนด้วยวิธี Real-time PCR แสดงผลผลิต PCR ชนิด *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3* และ *mecA* มีขนาด 67, 58, 138, 113 และ 107 bp ตามลำดับ Lane M: DNA Ladder, Lane 1,2: *vanA*, Lane 3,4: *vanB*, Lane 6,7: *vanC1*, Lane 8,9: *vanC2/C3* Lane 11-14: *mecA* และ Lane 5,10,15: Negative control

การทดสอบความไว (sensitivity)

ความไวในการตรวจหาชิ้นดีเอ็นเอของเชื้อ *Enterococcus* spp. ที่ดื้อยา vancomycin และ methicillin ด้วยวิธี Real-time PCR พบว่าวิธีนี้สามารถตรวจยีนชนิด *vanA* ที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 0.6 CFU/ μ L และยีนชนิด *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3* และ *mecA* ที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 6.0 CFU/ μ L ดังแสดงในตารางที่ 3

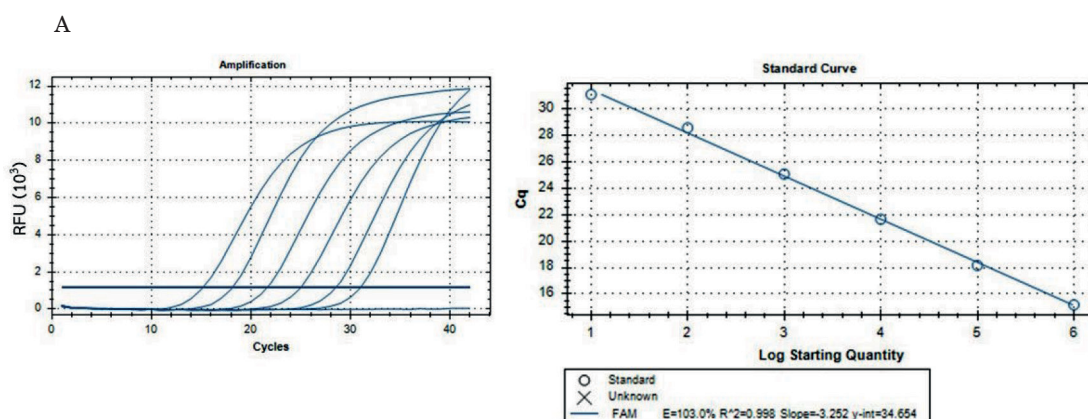
ผลการประเมินประสิทธิภาพของวิธี Real-time PCR

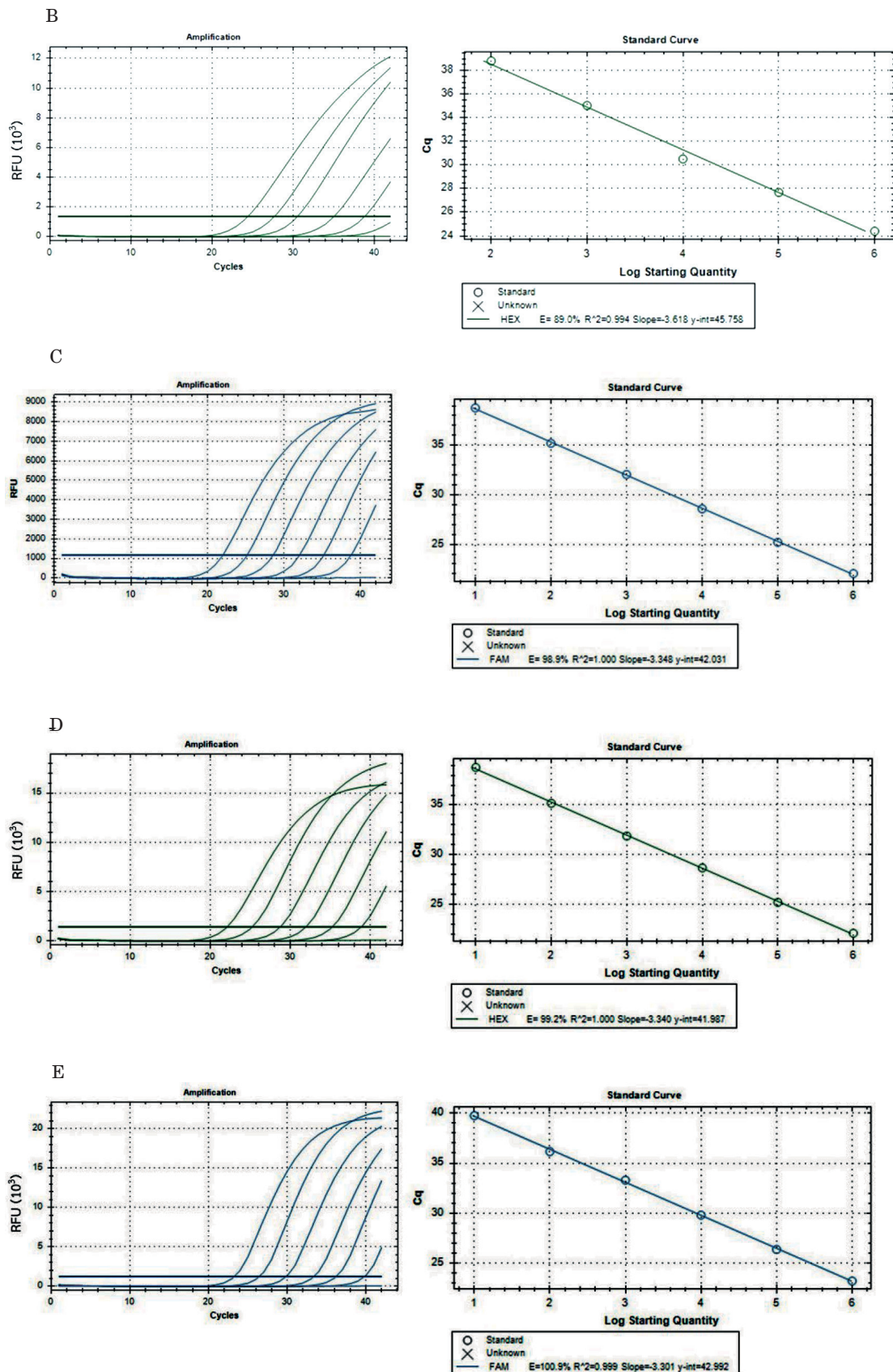
การประเมินประสิทธิภาพของวิธี Real-time PCR ที่พัฒนา โดยพิจารณาจากค่า PCR efficiency,

coefficient of correlation (R^2) และความเป็นเส้นตรง (linearity) ซึ่งสามารถคำนวณได้จาก standard curve ของการตรวจ DNA ของตัวควบคุมผลบวกที่ 6 ความเข้มข้น ในช่วง $6.0 \times 10^4 - 0.6$ CFU/ μ L พบว่า PCR efficiency ของการตรวจยีนชนิดต่างๆ ด้วยเทคนิค Real-time PCR อยู่ในช่วง 89%-103% และค่า R^2 อยู่ในช่วง 0.994 - 1.000 โดยมีค่า slope อยู่ในช่วง -3.252 ถึง -3.618 ดังแสดงในตารางที่ 3 และ linearity อยู่ในช่วงความเข้มข้นของเชื้อ $6.0 \times 10^4 - 0.6$ CFU/ μ L amplification curve, standard curve, ค่า efficiency, R^2 และ linearity ของการตรวจยีนชนิด *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3* และ *mecA* ด้วยเทคนิค Real-time PCR ดังแสดงในภาพที่ 4

ตารางที่ 3 ค่า sensitivity, PCR efficiency, coefficient of correlation (R^2) และ slope ของการตรวจยีนชนิดต่างๆ ด้วยเทคนิค Real-time PCR

ชนิดของยีน	Sensitivity (ความเข้มข้นต่ำสุด ของเชื้อแบคทีเรีย ที่ตรวจพบยีน)	% PCR efficiency	R^2	Slope
<i>vanA</i>	0.6 CFU/ μ L	103.0	0.998	-3.252
<i>vanB</i>	6.0 CFU/ μ L	89.0	0.994	-3.618
<i>vanC1</i>	6.0 CFU/ μ L	98.9	1.000	-3.348
<i>vanC2/C3</i>	6.0 CFU/ μ L	99.2	1.000	-3.340
<i>mecA</i>	6.0 CFU/ μ L	100.9	0.999	-3.301





ภาพที่ 4 Amplification curve, standard curve, ค่า efficiency, R^2 และ linearity ของการตรวจยีนชนิด *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3* และ *mecA* ดังภาพ A-E ตามลำดับ ความเข้มข้น $6.0 \times 10^4 - 0.6$ CFU/ μ L ด้วยเทคนิค Real-time PCR (ค่า relative fluorescence unit (RFU) คือ ค่าสารเรืองแสงสัมพัทธ์ และค่า quantification cycle (Cq) คือ จำนวนรอบที่สัญญาณแสงของตัวอย่างตัดกับเส้น threshold)

การทดสอบความจำเพาะ (specificity)

การทดสอบความจำเพาะของ primer, probe และสภาวะของปฏิกิริยาที่เหมาะสมของวิธีนี้กับ DNA ของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกสายพันธุ์มาตรฐาน ดำเนินการทดสอบความจำเพาะของวิธีด้วยเชื้อแบคทีเรียดื้อยาชนิด VRE, MRSA และแบคทีเรียสายพันธุ์ไม่ดื้อยาที่ได้รับการตรวจยืนยันด้วยวิธี conventional PCR จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข จำนวน 132 สายพันธุ์⁽²⁶⁾ พบว่าให้ผลสอดคล้องร้อยละ 100

วิจารณ์

วิธี Real-time PCR เป็นวิธีที่พัฒนาเพื่อการตรวจยืนยันดื้อยาชนิด *van* cluster และ *mecA* ในกลุ่มเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกชนิด VRSA, VRE และ MRSA ที่ใช้เป็นสัญญาณเตือนการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยา จากเดิมเป็นเทคนิค PCR และมีสภาวะการทำปฏิกิริยาของแต่ละยีนต่างกัน ซึ่งมีความยุ่งยากที่ต้องทำการตรวจทีละยีนเป้าหมาย ทำให้ใช้เวลานานในการตรวจวิเคราะห์ การศึกษานี้จึงพัฒนาเทคนิค Real-time PCR โดยใช้ primer และ probe ที่จำเพาะกับยีน 5 ยีน ได้แก่ *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3* และ *mecA* ใน 3 หลอดปฏิกิริยาที่ใช้สภาวะเดียวกันในการเพิ่มปริมาณ โดยสามารถตรวจตัวอย่าง DNA ที่สกัดจากเซลล์แบคทีเรีย ความเข้มข้นเท่ากับ 0.6 CFU/ μ L สำหรับการตรวจยีนชนิด *vanA* และ 6.0 CFU/ μ L สำหรับการตรวจยีนชนิด *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3* และ *mecA* ซึ่งจากการศึกษาของ Dehbashi S และคณะ⁽²²⁾, Cha CH และคณะ⁽³⁰⁾ และ Babady NE และคณะ⁽³¹⁾ รายงานค่าความเข้มข้นต่ำสุดของเทคนิค Real-time PCR ที่สามารถตรวจพบเชื้อ VRE เท่ากับ 0.01, 0.1 และ 0.1 CFU/ μ L ตามลำดับ และการศึกษาของ Galia L และคณะ⁽²⁴⁾ พบค่า detection limit ของการตรวจยีน *mecA* เท่ากับ 0.514 CFU/ μ L ซึ่งค่า detection limit ของเทคนิค Real-time PCR จะแตกต่างกันตามขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่างทดสอบ แต่จากรายงานทั้งหมดที่กล่าวมา แสดงว่าวิธีนี้มีความไวเพียงพอหากใช้เป็นวิธีตรวจเชื้อแบคทีเรียดื้อยาชนิด VRSA MRSA และ VRE ที่แยกจากตัวอย่างผู้ป่วย ข้อจำกัดของการศึกษานี้

คือ ค่าความเข้มข้นของแบคทีเรียจากการศึกษาเป็นค่าโดยประมาณจากการใช้เชื้อเริ่มต้น 0.5 MacFarland standard หรือเท่ากับ 1×10^8 CFU/mL นำมาสกัดและทดสอบด้วยเทคนิคที่พัฒนาขึ้น จึงควรนำเทคนิคนี้ทดสอบกับตัวอย่าง DNA ที่ทราบค่าความเข้มข้นจะสามารถทำให้ระบุค่า detection limit ของปฏิกิริยาได้แม่นยำยิ่งขึ้น วิธีนี้พัฒนาขึ้นเพื่อให้ตรวจเชิงคุณภาพ จึงอาจไม่จำเป็นต้องทราบปริมาณเชื้อที่ชัดเจน นอกจากนี้ ค่า PCR efficiency ของวิธีอยู่ในช่วง 89% - 103% ซึ่งเป็นค่าประสิทธิภาพในการสร้าง PCR amplicon แบบ 2n ในแต่ละรอบของปฏิกิริยา ที่ประเมินภาพรวมประสิทธิภาพของ primer probe น้ำยา และสภาวะที่ใช้ว่าจำเพาะต่อยีนเป้าหมาย โดยปฏิกิริยาที่ดีจะมีค่า efficiency ระหว่าง 90%-110%⁽²⁹⁾ การศึกษานี้พบการตรวจยีน *vanB* มีค่า PCR efficiency ที่ 89% ซึ่งอาจมีสาเหตุจากความจำเพาะของ primer และ probe ต่อยีน *vanB* หรือสภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ต้องมีการปรับให้เหมาะสมมากยิ่งขึ้น จากการตรวจ *vanB* ด้วยวิธีที่พัฒนานี้ให้ผลถูกต้องร้อยละ 100 เมื่อทดสอบซ้ำกับตัวอย่างควบคุมผลบวกและไม่พบสัญญาณรบกวน (noise band) ในการทดสอบ การประเมินความสัมพันธ์เชิงเส้นของตัวแปรในการทดสอบหรือค่า coefficient of correlation (R^2) โดยทำการเจือจาง DNA control ซึ่งค่า R^2 ควรมากกว่าหรือเท่ากับ 0.98 ซึ่งเทคนิค Real-time PCR นี้มีค่าอยู่ในช่วง 0.994-1.000 ซึ่งเป็นเกณฑ์ที่สามารถยอมรับได้ จากผลดังกล่าวข้างต้นสามารถสรุปได้ว่าเทคนิคนี้มีประสิทธิภาพในการตรวจยืนยันดื้อยาและมีความสอดคล้องของผลการตรวจของวิธีที่พัฒนากับวิธี PCR สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Flipse J และคณะ⁽²⁰⁾ และ Galia L และคณะ⁽²⁴⁾ ที่ได้นำเทคนิค Real-time PCR มาใช้ในการตรวจเชื้อดื้อยาในกลุ่ม VRE และ MRSA ซึ่งให้ผลการตรวจสอดคล้องกับวิธีมาตรฐาน ค่าความไวและความจำเพาะร้อยละ 100 เช่นกัน

วิธีที่พัฒนานี้สามารถรายงานผลได้เร็วขึ้นและลดขั้นตอนการทำ gel electrophoresis หลังการทำ PCR เหมาะกับการนำมาใช้ตรวจการระบาดของเชื้อดื้อยาแกรมบวกที่เป็นปัญหาบ่อย และสามารถนำไปใช้

ในงานประจำในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาเพื่อเฝ้าระวังอย่างต่อเนื่อง จากรายงานการศึกษาเชื้อดื้อยากลุ่ม VRE จากตัวอย่างที่ส่งตรวจยืนยันที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ระหว่างปี พ.ศ. 2564-2566 ตรวจไม่พบยีนชนิด *vanB*, *vanC1* และ *vanC2/C3* จากเชื้อแบคทีเรียที่ส่งตรวจยืนยัน แต่พบยีนดื้อยาชนิด *vanA* ทั้งหมดร้อยละ 100⁽²⁶⁻²⁸⁾ จึงเป็นข้อจำกัดของการศึกษานี้ที่ทดสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาเพื่อตรวจยีนทั้ง 3 ชนิดโดยใช้เชื้อควบคุมผลบวกในการทดสอบเท่านั้น การเตรียมความพร้อมทางห้องปฏิบัติการเพื่อให้สามารถตรวจยีนดื้อยาทั้ง 3 ชนิดได้ แม้วังยังไม่มีพบการแพร่ของยีนเหล่านี้ในประเทศไทย แต่มีความจำเป็นอย่างมากต่อระบบการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาของประเทศไทยและเพื่อสนับสนุนให้ระบบการเตือนภัยทางห้องปฏิบัติการ (lab alert) ให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น เทคนิคนี้จึงสามารถนำไปใช้ในงานประจำของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาของโรงพยาบาล เพื่อช่วยสนับสนุนกลยุทธ์การเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาและ lab alert ให้ทันต่อการควบคุมการระบาดของเชื้อดื้อยา

สรุป

วิธี Real-time PCR เพื่อตรวจหาเชื้อดื้อยาสำคัญ vancomycin และ methicillin ของกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก โดยใช้การทดสอบ 3 หลอดปฏิบัติการในรอบเดียวที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถตรวจตัวอย่าง DNA ที่สกัดจากเซลล์แบคทีเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.6 CFU/ μ L สำหรับการตรวจยีนชนิด *vanA* และ 6.0 CFU/ μ L สำหรับการตรวจยีนชนิด *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3* และ *mecA* ค่า PCR efficiency อยู่ในช่วง 89% - 103% มีความไวและความจำเพาะของวิธี ร้อยละ 100 จึงสามารถรายงานผลได้เร็วขึ้นและช่วยลดขั้นตอนภายหลังปฏิบัติการ PCR

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากโครงการพัฒนาระบบเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพระดับชาติสู่ระดับโลก การพัฒนาเครือข่ายห้องปฏิบัติการอ้างอิงใน

ภูมิภาค (Modified Enhancing Incorporation of Global and National Antimicrobial Resistance Surveillance; Tier Lab Network) ศูนย์ความร่วมมือไทย-สหรัฐ ด้านสาธารณสุข (Thailand MOPH-U.S.CDC Collaboration; TUC) และโครงการการเสริมความเข้มแข็งเครือข่ายระบบเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพประเทศไทย และขอขอบคุณผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12 สงขลา เจ้าหน้าที่กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก และเจ้าหน้าที่ฝ่ายแบคทีเรียทั่วไป สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้คำแนะนำช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

1. คณะกรรมการประสานและบูรณาการงานต่อต้านจุลชีพ. แผนยุทธศาสตร์การจัดการการดื้อยาต้านจุลชีพประเทศไทย พ.ศ. 2560-2564. นนทบุรี: กระทรวงสาธารณสุข; 2558.
2. นิธิมา สุ่มประดิษฐ์, ศิริตรี สุทธจิตต์, ลิตานันท์ พูนผลทรัพย์, รุ่งทิพย์ ชวนชื่น, ภูษิต ประคองสาย. ภูมิทัศน์ของสถานการณ์และการจัดการการดื้อยาต้านจุลชีพในประเทศไทย. นนทบุรี: กระทรวงสาธารณสุข; 2558.
3. อรุณลักษณ์ ลูลิตานนท์, อธิรัตน์ ดำนา, อรุณวดี ชนวงษ์, พัทธพันธ์ ศรีเบญจลักษณ์, นิชา เจริญศรี, เสกสิทธิ์ สังคีรี และคณะ. การติดตามสถานการณ์ของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ที่ไวต่อ vancomycin และ chlorhexidine ลดลง ในโรงพยาบาลศรีนครินทร์. ว เทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด 2555; 24(1): 22-8.
4. ธันว วังสุก, ดารณี นุตาลัย. การทดสอบความไวสารต้านจุลชีพ vancomycin, daptomycin และ linezolid ของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. ว การแพทย์และวิทยาศาสตร์สุขภาพ 2558; 22(3): 25-33.
5. Santimaleeworagun W, Preechachuwong P, Samret W, Jitwasinkul T. The first report of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate harboring type IV SCCmec in Thailand. Pathogens 2021; 10(4): 430. (8 pages).

6. Thunyaharn S, Boonsiri T, Visawapoka U, Santimaleeworagun W, Nitchapanit S, Noonai A, et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other Staphylococcal nasal carriage among healthcare workers, Pramongkutklao Hospital. *J Southeast Asian Med Res* 2022; 6: e0122. (10 pages).
7. Trakulsomboon S, Danchaivijitr S, Rongruang Y, Dhiraputra C, Susaemgrat W, Ito T, et al. First report of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Thailand. *J Clin Microbiol* 2001; 39(2): 591-5.
8. Lulitanond A, Chanawong A, Sribenjalux P, Kaewkes W, Charoensri N, Leumsai D, et al. Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Srinagarind Hospital. *J Infect Dis Antimicrob Agents* 2005; 22(1): 9-14.
9. Lulitanond A, Engchanil C, Chaimanee P, Vorachit M, Ito T, Hiramatsu K. The first vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients in Thailand. *J Clin Microbiol* 2009; 47(7): 2311-6.
10. Ejaz M, Syed MA, Jackson CR, Sharif M, Farya R. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* non-susceptible to vancomycin in South Asia. *Antibiotics* 2023; 12(6): 972. (14 pages).
11. Kest H, Kaushik A. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: formidable threat or silence before the storm? *J Infect Dis Epidemiol* 2019; 5(5): 93. (9 pages).
12. Cong Y, Yang S, Rao X. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: a review of case updating and clinical features. *J Adv Res* 2020; 21:169-76.
13. ศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. Antimicrobial resistant 2000-2022. [ออนไลน์]. 2567; [สืบค้น 31 ม.ค. 2567]. เข้าถึงได้ที่: URL: <http://narst.dmso.moph.go.th>.
14. Hemapanpaioa J, Changpradub D, Thunyaharn S, Santimaleeworagun W. Vancomycin-resistant enterococcal infection in a Thai university hospital: clinical characteristics, treatment outcomes, and synergistic effect. *Infect Drug Resist* 2019; 12: 2049-57.
15. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*. 2009; 155(6): 1749-57.
16. นิชา เจริญศรี, วรวิทย์ เลิศธรรม, บัณฑิต พรหมรักษา, ลำไย วงสกร, สุจิตา เคนพรม, พรทิพย์ ปั่นล่อ และคณะ. สปีชีส์และการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *Enterococci* ที่พบในสิ่งส่งตรวจจากโรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ว. เทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด 2557; 26(2): 117-28.
17. Zirakzadeh A, Patel R. Vancomycin-resistant enterococci: colonization, infection, detection, and treatment. *Mayo Clin Proc* 2006; 81(4): 529-36.
18. Farivar TN, Najafipour R, Johari P, Aslanimehr M, Peymani A, Hashemi HJ, et al. Development and evaluation of a quadruplex Taq man real-time PCR assay for simultaneous detection of clinical isolates of *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* and their *vanA* and *vanB* genotype. *Iran J Microbiol* 2014; 6(5): 335-40.
19. Zeyni B, Arabestani MR, Mashuf RY, Tahmasebi H. Evaluation of real-time PCR-based DNA melting method for detection of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in clinical isolates. *J Babol Univ Med Sci* 2017; 19(2): 26-33.
20. Flipse J, von Wintersdorf CJH, van Niekerk JM, Jamin C, van Tie FH, Hasman H, et al. Appearance of vanD-positive *Enterococcus faecium* in a tertiary hospital in the Netherlands: prevalence of *vanC* and *vanD* in hospitalized patients. *Sci Rep* 2019; 9(1): 6949. (9 pages).
21. He YH, Ruan GJ, Hao H, Xue F, Ma YK, Zhu SN, et al. Real-time PCR for the rapid

- detection of *vanA*, *vanB*, and *vanM* genes. J Microbiol Immunol Infect 2020; 53: 746–50.
22. Dehbashi S, Tahmasebi H, Sedighi P, Davarian F, Arabestani MR. Development of high-resolution melting curve analysis in rapid detection of *vanA* gene, *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from clinical isolates. Trop Med Health 2020; 48: 8. (12 pages).
23. Zerrouki H, Rebiahi SA, Hadjadj L, Rolain JM, Diene SM. Real-time PCR assay for rapid and simultaneous detection of *vanA* and *vanB* genes in clinical strains. Diagnostics 2021; 11(11): 2081. (7 pages).
24. Galia L, Ligozzi M, Bertoncelli A, Mazzariol A. Real-time PCR assay for detection of *Staphylococcus aureus*, Panton-Valentine Leucocidin, and Methicillin Resistance directly from clinical samples. AIMS Microbiol 2019; 5(2): 138–46.
25. กระทรวงสาธารณสุข, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. แนวทางการเฝ้าระวังการดื้อยาต้านจุลชีพภายใต้แนวคิดสุขภาพหนึ่งเดียวประเทศไทย. [ออนไลน์]. 2567; [สืบค้น 31 ม.ค. 2567]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://www.pcd.go.th/publication/33383>.
26. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. รายงานประจำปีโครงการการเสริมความเข้มแข็งเครือข่ายเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพประเทศไทย ตั้งแต่ 1 กันยายน 2564 – 28 กุมภาพันธ์ 2565. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2565.
27. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. รายงานประจำปีโครงการการเสริมความเข้มแข็งเครือข่ายเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพประเทศไทย ตั้งแต่ 1 กันยายน 2564 – 31 สิงหาคม 2565. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2565.
28. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. รายงานประจำปีโครงการการเสริมความเข้มแข็งเครือข่ายเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพประเทศไทย ตั้งแต่ 1 กันยายน 2565 – 31 สิงหาคม 2566. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2566.
29. Rogers-Broadway KR, Karteris E. Amplification efficiency and thermal stability of qPCR instrumentation: current landscape and future perspectives. Exp Ther Med 2015; 10(4): 1261–4.
30. Cha CH, An HK, Kim JU. Detection of vancomycin-resistant enterococci using multiplex real-time PCR assay and melting curve analysis. Korean J Lab Med 2010; 30(2): 138–46.
31. Babady NE, Gilhuley K, Ciancimino-Bordelon D, Tang Y-W. Performance characteristics of the Cepheid Xpert *vanA* assay for rapid identification of patients at high risk for carriage of vancomycin-resistant *Enterococci*. J Clin Microbiol 2012; 50(11): 3659–63.

Development and Validation of a Real-time PCR Assay for Vancomycin and Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* spp.

Walailak Ganjanapin¹, Watthanee Sunghirun¹, Watcharaporn Kamjumhol², and
Wantana Paveenkittiporn²

¹ Regional Medical Science Center 12 Songkhla, Department of Medical Sciences, Muang District,
Songkhla 90100, Thailand

² National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), and vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. (VRE) are Gram-positive, drug-resistant bacteria that serve as key indicators in national drug-resistance surveillance. Detecting drug-resistance genes in these bacteria requires rapid and highly accurate techniques. To support continuous drug resistance monitoring, this study aimed to develop a real-time PCR method for detecting the primary resistance genes, *van* and *mecA*, in VRE and MRSA, respectively, and for monitoring VRSA, which can be conducted using a single thermal profile condition. The developed method, which used three reaction tubes, demonstrated a limit of detection (LOD) for the *vanA* gene at 0.6 CFU/ μ L and the *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3*, and *mecA* genes at 6.0 CFU/ μ L. The PCR efficiency ranged from 89% to 103%. Comparative analysis against conventional PCR with 132 strains of VRE and MRSA revealed complete concordance ($\kappa = 1.0$), with 100% sensitivity and specificity. This real-time PCR method allows simultaneous detection of *van* and *mec* genes in a single protocol without a post-PCR step, thereby reducing operational time compared to individual PCR tests and enabling high-throughput sample analysis.

Keywords: Real-time PCR, VRE, VRSA, MRSA

การตรวจวินิจฉัยและระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรีย *Leptospira* sp. โดยตรงจากสิ่งส่งตรวจทางคลินิกของผู้ป่วยโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุ

นภาพร ศรีเด่น ญัฐพล นุขุนทด ชลลดา มีทรัพย์ กาญจนา สอนงบุญ ดารารัตน์ แบ่งดี เดชา แบ่งใจ และ อาชวินทร์ ไรจนวิวัฒน์

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ โรคเลปโตสไปโรซิสเป็นโรคติดต่อจากสัตว์สู่คนที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียเลปโตสไปรา (*Leptospira*) ปัจจุบันการวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการใช้การทดสอบทางซีโรโลยีด้วยวิธี IFA และการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อด้วยวิธี Real-time PCR การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อ *Leptospira* ด้วยวิธี IFA ร่วมกับวิธี Real-time PCR และระบุชนิดของแบคทีเรีย *Leptospira* จากสิ่งส่งตรวจทางคลินิกโดยตรงของผู้ป่วยโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุ การศึกษาครั้งนี้มีตัวอย่างผู้ป่วยโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุทั้งสิ้น 2,110 ตัวอย่าง โดยพบการติดเชื้อ *Leptospira* จำนวน 33 ตัวอย่าง (1.56%) ตัวอย่างที่พบการติดเชื้อถูกนำมาระบุชนิดโดยการศึกษายีน *16S rRNA* (*rrs2*) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ผลการศึกษาพบว่า มีเพียง 14 ตัวอย่างเท่านั้น ที่สามารถระบุชนิดได้ โดยตัวอย่างถูกแบ่งเป็นกลุ่มย่อยที่มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับสายพันธุ์ก่อโรคหลัก จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. weilii* จำนวน 8 ตัวอย่าง *L. interrogans* จำนวน 5 ตัวอย่าง และ *L. alexanderi* จำนวน 1 ตัวอย่าง ซึ่งแบคทีเรีย *L. weilii* และ *L. alexanderi* ไม่เคยมีการรายงานการตรวจพบและระบุชนิดจากสิ่งส่งตรวจทางคลินิกโดยตรงในประเทศไทยมาก่อน การศึกษาครั้งนี้จึงสามารถอนุมานได้ว่า *L. weilii* และ *L. alexanderi* มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นชนิดที่ระบาดในประเทศไทยนอกเหนือจาก *L. interrogans*

คำสำคัญ: การตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส, การระบุชนิดเลปโตสไปรา, ไข้ไม่ทราบสาเหตุ, วิวัฒนาการชาติพันธุ์

Corresponding author E-mail: napaporn.sr@dmasc.mail.go.th

Received: 29 August 2024

Revised: 11 December 2024

Accepted: 27 December 2024

บทนำ

โรคเลปโตสไปโรสิส (Leptospirosis) เป็นโรคในกลุ่มโรคติดต่อจากสัตว์สู่คน (zoonotic disease) ที่มีอุบัติการณ์ของโรคทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทยเขตร้อน⁽¹⁾ สำหรับสถานการณ์ในประเทศไทยจากข้อมูลเฝ้าระวังโรคในระบบเฝ้าระวัง 506 โดยสำนักโรคเลปโตสไปโรสิสในปี พ.ศ. 2565 จำนวน 3,688 ราย และปี พ.ศ. 2566 จำนวน 4,627 ราย โดยมีอัตราการตายคงที่ที่ 0.07 คนต่อแสนประชากร⁽²⁾ โดยผู้ป่วยส่วนใหญ่ประกอบอาชีพเกษตรกรรม พบอัตราป่วยสูงสุดในภาคกลาง รองลงมา คือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ และภาคใต้ ตามลำดับ

โรคเลปโตสไปโรสิส เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Leptospira* โดยแบคทีเรียชนิดนี้อาศัยอยู่ในบริเวณใต้ของโฮสต์กักเก็บโรค (reservoir host) จำพวกสัตว์ฟันแทะ (rodent) เช่น กระจ่าง หนู โดยไม่ทำให้โฮสต์กักเก็บโรคแสดงอาการของโรค แต่แบคทีเรีย *Leptospira* จะถูกขับออกพร้อมปัสสาวะของโฮสต์ลงสู่สิ่งแวดล้อมส่งผลให้สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่น เช่น โค กระบือ สุนัข สุกร หรือแม้กระทั่งคนที่สัมผัสกับแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนของปัสสาวะที่มีเชื้อแบคทีเรีย *Leptospira* ติดเชื้อและเกิดโรคเลปโตสไปโรสิสได้⁽³⁾ โดยทั่วไปผู้ป่วยจะมีอาการไข้สูง ปวดศีรษะ ปวดกล้ามเนื้อรุนแรงโดยเฉพาะกล้ามเนื้อน่อง ร่วมกับการมีประวัติสัมผัสกับน้ำหรือสิ่งแวดล้อมที่มีพื้นที่แฉะ หรือสัมผัสโดยตรงกับสิ่งขับถ่ายของสัตว์ ในผู้ป่วยที่มีประวัติอาการไม่ชัดเจนแต่มีอาการไข้สูงมากกว่าหรือเท่ากับ 38.5°C เป็นเวลานานกว่า 1 สัปดาห์ รวมถึงการชักประวัติการเจ็บป่วยและตรวจร่างกายแล้วไม่สามารถอธิบายสาเหตุของไข้ได้ จะถูกจัดว่าเป็นโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุ⁽⁴⁾ จากการศึกษาก่อนหน้านี้ในประเทศไทย พบว่ามีผู้ป่วยยืนยันโรคเลปโตสไปโรสิสในผู้ป่วยไข้ไม่ทราบสาเหตุอยู่ในช่วงสูง 20–40%⁽⁵⁾ ข้อมูลจากการเฝ้าระวังโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุนี้จึงสามารถถูกใช้เพื่อติดตามสถานการณ์โรคเลปโตสไปโรสิสได้ เนื่องจากโรคนี้นักมาพร้อมอาการไข้ที่ไม่ชัดเจนและอาจยังไม่ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ในครั้งแรกที่มารับการรักษาในโรงพยาบาล

แบคทีเรีย *Leptospira* เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม Spirochete ที่มีจำนวนชนิด (species) มากกว่า 64 ชนิดทั่วโลก^(6,7) โดยสามารถแบ่งเป็นกลุ่มสายพันธุ์ก่อโรคหลัก (primary pathogenic strain, P1) กลุ่มสายพันธุ์ก่อโรคไม่รุนแรง (pathogenic but low-virulent strain, P2) และกลุ่มสายพันธุ์ไม่ก่อโรค (saprophytes, S)^(6,8) จากการศึกษาก่อนหน้านี้ในประเทศไทยจังหวัดน่าน พบแบคทีเรีย *L. interrogans* จากตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยยืนยันโรคเลปโตสไปโรสิส อีกทั้งพบแบคทีเรีย *L. interrogans* และ *L. weilii* จากตัวอย่างปัสสาวะของสุนัข สุกร และแพะที่ไม่แสดงอาการของโรคเลปโตสไปโรสิส⁽⁹⁾ ซึ่งทั้งสองสายพันธุ์ถูกจัดอยู่ในกลุ่มสายพันธุ์ก่อโรคหลัก การศึกษาสายพันธุ์ของแบคทีเรีย *Leptospira* โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุจึงมีความสำคัญเป็นอย่างมากที่จะช่วยเพิ่มเติมองค์ความรู้เกี่ยวกับโรคเลปโตสไปโรสิสในประเทศไทยให้ดียิ่งขึ้น

ปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิสใช้เทคนิคทางซีโรโลยี ซึ่งเป็นเทคนิคการตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจยืนยันทางห้องปฏิบัติการ (gold standard method) โดยวิธีที่ใช้ ได้แก่ วิธี Macroscopic Agglutination Test (MAT) และวิธี Indirect Immunofluorescence Assay (IFA) ซึ่งวิธีเหล่านี้จำเป็นต้องรอรระดับภูมิคุ้มกันเพื่อตรวจสอบปริมาณแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรีย *Leptospira* รวมทั้งต้องอาศัยเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่มีความชำนาญในการอ่านและแปลผลจากความก้าวหน้าของเทคนิคทางอณูชีววิทยาในปัจจุบันทำให้การรายงานผู้ป่วยตามระบบเฝ้าระวังโรค (ระบบ ร. 506) ของกรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุขสามารถรายงานโดยใช้ผลการตรวจสอบสารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย *Leptospira* sp. ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อรายงานผู้ป่วยยืนยันโรคเลปโตสไปโรสิสได้⁽⁴⁾ การตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิสจึงมีความสำคัญอย่างมากต่อการรายงานผลการติดเชื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มผู้ป่วยโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุที่มักมาพร้อมกับอาการที่ไม่ชัดเจน งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิส

ด้วยวิธีมาตรฐานทางซีโรโลยีร่วมกับวิธีทางอณูชีววิทยา และศึกษาชนิดของเชื้อแบคทีเรีย *Leptospira* จากสิ่งส่งตรวจทางคลินิกโดยตรงของผู้ป่วยโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุ เพื่อทำให้เกิดความรู้ ความเข้าใจ ในสายพันธุ์ของแบคทีเรียชนิดนี้ที่จะเป็นประโยชน์ ต่องานด้านการแพทย์และการสาธารณสุขของประเทศไทย ต่อไป

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

สไลด์หลุมชนิด 21 หลุม (Epredia, Breda, Netherlands), เครื่องบ่มอุณหภูมิ 37°C (Memmert, Germany), กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Nikon, Japan), ตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C (Mitsubishi Electric, Thailand), เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมชนิด real-time PCR รุ่น CFX96 C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad, USA) และเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม รุ่น MJ Mini 48-Well Personal Thermal Cycler (Bio-Rad, USA)

สารมาตรฐานและสารเคมี

สารละลาย phosphate buffer saline (Caisson, Utah, USA), สารละลาย conjugate working solution ชนิด anti-human-IgG-FITC และ ชนิด anti-human-IgM-FITC (Agilent, Glostrup, Denmark), ชุดน้ำยาสำเร็จรูป DNeasy Blood & Tissue Kits (QIAGEN, Germany), น้ำยา 2X THUNDERBIRD™ Probe qPCR mix (TOYOBO, Japan), Nuclease-free water (Bio Basic, Ontario, Canada), น้ำยา 2X KOD One™ PCR Master Mix -Blue- (TOYOBO, Japan), agarose (Bio Basic, Ontario, Canada) และ สารละลาย 1X Tris-Borate-EDTA (TBE) buffer (Invitrogen, New York, USA)

กลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา

กลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาต้องเข้าเกณฑ์คัดเข้าตาม นิยามของโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุของสำนักโรคบาติวิทยา

กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ได้แก่ ผู้ป่วยมี ไข้สูงมากกว่าหรือเท่ากับ 38.5°C เป็นเวลานานกว่า 1 สัปดาห์ รวมถึงซักประวัติการเจ็บป่วยและตรวจร่างกาย แล้วไม่สามารถอธิบายสาเหตุของไข้ได้ โดยคัดเลือก สิ่งส่งตรวจชนิดเลือด EDTA-blood และซีรัมที่เหลือจากการตรวจวิเคราะห์ ในปี พ.ศ. 2566-2567 (สิ้นสุด ณ วันที่ 31 พฤษภาคม พ.ศ. 2567) สิ่งส่งตรวจมีปริมาณ 1-2 มิลลิลิตร คัดเลือกตัวอย่างที่เข้าเกณฑ์จากศูนย์ วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1/1 เชียงราย ศูนย์วิทยาศาสตร์ การแพทย์ที่ 5 สมุทรสงคราม ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ 8 อุดรธานี ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 9 นครราชสีมา และศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11 สุราษฎร์ธานี จากนั้น ส่งที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์ การแพทย์ ควบคุมให้มีอุณหภูมิ 4°C ตลอดระยะเวลา ขนส่ง

การคำนวณขนาดกลุ่มตัวอย่าง

ค่าอุบัติการณ์โรคเลปโตสไปโรสิสในผู้ป่วยไข้ ไม่ทราบสาเหตุ จากการศึกษาก่อนหน้าในประเทศไทย พบว่ามีผู้ป่วยยืนยันโรคเลปโตสไปโรสิสในผู้ป่วยไข้ ไม่ทราบสาเหตุอยู่ในช่วงร้อยละ 20-40⁽⁵⁾ การคำนวณ ขนาดกลุ่มตัวอย่างจึงเลือกค่าอุบัติการณ์ที่ร้อยละ 20 ซึ่งเป็นร้อยละของการตรวจพบเชื้อที่น้อยที่สุด เพื่อคำนวณ ขนาดตัวอย่างและให้ครอบคลุมการเก็บตัวอย่างได้ มากที่สุด โดยคำนวณจากสูตรค่าประมาณสัดส่วน⁽¹⁰⁾

$$n = \frac{p(1-p)z^2}{d^2}$$

กำหนดให้ n คือ จำนวนกลุ่มตัวอย่างที่ต้องการ

p คือ ค่าอุบัติการณ์การเกิดโรคเลปโต- สไปโรสิสในผู้ป่วยไข้ไม่ทราบสาเหตุ

d คือ ค่าสัดส่วนของความคลาดเคลื่อน ที่ยอมให้เกิดขึ้นได้

z คือ ค่าความเชื่อมั่นที่ระดับนัยสำคัญ ทางสถิติ 0.05

แทนค่า ค่า p = 0.2

ค่า d ควรมีค่าไม่เกิน 20% ของค่า p ดังนั้น

$$\text{ค่า } d = 0.2 \times 0.2 = 0.04$$

$$\text{ค่า } z = 1.96$$

$$n = \frac{0.2(1-0.2) 1.96^2}{0.04^2}$$

$$n = 384.2$$

ดังนั้นการศึกษานี้ใช้ตัวอย่างอย่างน้อย 385 ตัวอย่างต่อไป

การตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสด้วยวิธี Indirect Immunofluorescence Assay (IFA)

ตรวจวินิจฉัยแอนติบอดีในสิ่งส่งตรวจชนิดซีรัมด้วยวิธี IFA โดยเจือจางสิ่งส่งตรวจชนิดซีรัมให้มีความเข้มข้น 1:50 ถึง 1:3,200 ด้วยสารละลาย Phosphate Buffer Saline หยดซีรัมที่เจือจาง ปริมาตร 7 μ L ลงบนแต่ละหลุมของสไลด์ที่มีแอนติเจนของเชื้อ *L. interrogans* บ่มสไลด์ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างสไลด์ด้วยสารละลาย Phosphate Buffer Saline แล้วผึ่งสไลด์ให้แห้งด้วยลมเย็น เมื่อสไลด์แห้งจึงหยดสารละลาย Conjugate ของ Anti-human-IgG-FITC และ Anti-human-IgM-FITC ที่เจือจางให้มีความเข้มข้น 1:40 ลงบนแต่ละหลุมของสไลด์ สไลด์ละ 7 μ L โดยแยกกระหว่างสไลด์ IgG และ IgM นำสไลด์บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างสไลด์ด้วยสารละลาย Phosphate Buffer Saline และผึ่งสไลด์ให้แห้งด้วยลมเย็นอีกครั้ง จากนั้นนำสไลด์ไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ โดยใช้ซีรัมของผู้ป่วยที่ให้ผลบวกและผลลบต่อเชื้อ *L. interrogans* เป็น positive และ negative control ตามลำดับ แปลผลพบการติดเชื่อเมื่อพบการเรืองแสงมากกว่า +2 โดยมีค่าไคเตอร์ของแอนติบอดี IgM มากกว่าหรือเท่ากับ 1:100

การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป DNeasy Blood & Tissue Kits จากสิ่งส่งตรวจชนิด EDTA-blood ปริมาตร 200 μ L ทำการสกัดตามวิธีการในคู่มือของชุดน้ำยา โดยได้สารสกัดดีเอ็นเอ ปริมาตร 50 μ L เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C

การตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสด้วยวิธี Real-time PCR

การตรวจสอบพันธุกรรมของเชื้อ *Leptospira* ด้วยวิธี Real-time PCR ใช้ไพรเมอร์และโพรบที่มีความจำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *LipL32* ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยปฏิกิริยามีปริมาตรรวมทั้งหมด 20 μ L ประกอบด้วย 2X THUNDERBIRD™ Probe qPCR mix ปริมาตร 10 μ L ไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ด (Forward primer) และไพรเมอร์รีเวิร์ส (Reverse primer) ความเข้มข้น 0.4 μ M โพรบความเข้มข้น 0.2 μ M และสารสกัดดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดจากสิ่งส่งตรวจปริมาตร 2 μ L โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก *L. interrogans* Australis และ *L. santarosai* Shermani เป็น positive control และใช้ Nuclease-free water เป็น negative control ในทุกครั้งของการทำปฏิกิริยา ทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมรุ่น CFX96 C1000 Touch Thermal Cycler โดยมีอุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาได้แก่ อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 10 นาที ต่อด้วย 40 รอบ ของอุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 15 วินาที และอุณหภูมิ 58°C เป็นเวลา 30 วินาที ตั้งค่าให้เครื่องอ่านค่าความเข้มแสงจากโมเลกุลของ 6-carboxy-fluorescein (FAM) เมื่อครบแต่ละรอบหลังจากอุณหภูมิ 58°C แปลผลพบการติดเชื่อเมื่อค่า Ct Cycle น้อยกว่า 37 รอบ

การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในการจำแนกชนิดของเชื้อ *Leptospira*

ตัวอย่างที่พบการติดเชื่อถูกจำแนกชนิดของเชื้อ *Leptospira* ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rrs2* ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยปฏิกิริยามีปริมาตรรวมทั้งหมด 25 μ L ประกอบด้วย 2X KOD One™ PCR Master Mix-Blue-ปริมาตร 12.5 μ L ไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ด และไพรเมอร์รีเวิร์สความเข้มข้น 0.3 μ M และดีเอ็นเอต้นแบบจากตัวอย่างที่พบการติดเชื่อ ปริมาตร 2 μ L โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก *L. interrogans* Australis และ *L. santarosai* Shermani เป็น positive control และใช้ Nuclease-free water เป็น negative control

จากนั้นทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยมีอุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา ได้แก่ อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 5 นาที ต่อด้วย 40 รอบ ของ อุณหภูมิ 98°C เป็นเวลา 10 วินาที อุณหภูมิ 50°C เป็น เวลา 5 วินาที และอุณหภูมิ 68°C เป็นเวลา 1 วินาที จากนั้น นำ PCR amplicon ที่ได้ตรวจสอบขนาดด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ 2% agarose ในสารละลาย 1X Tris-Borate-EDTA (TBE) Buffer เป็นเวลา 30 นาที ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ และส่ง PCR amplicon ไปที่บริษัท Bio Basic Inc. (Ontario, Canada) เพื่อดำเนินการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเทคนิค sanger sequencing

การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติ

วิเคราะห์และประมวลผลข้อมูลโดยใช้ RStatistical Program version 4.3.3 (<https://www.r-project.org>) แบ่งรูปแบบการวิเคราะห์เป็นสถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ จำนวน ร้อยละ และวิเคราะห์ปัจจัยที่สัมพันธ์กับผลการตรวจวินิจฉัยโดยใช้สถิติ Pearson's Chi-squared test โดยใช้ Yates' continuity correction กำหนดนัยสำคัญทางสถิติด้วย p -value < 0.05

การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องมือชีวสารสนเทศ

นำข้อมูล 16S rRNA sequencing ของยีน *rrs2* อยู่ในรูปของไฟล์นามสกุล .ab1 วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Geneious Prime version 2024.0.5 (Biomatter, New Zealand) ควบคุมคุณภาพโดยตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีคุณภาพต่ำช่วงต้นและช่วงปลายจากแต่ละตัวอย่างออก จากนั้นสร้างเมทริกซ์ DNA substitution ด้วยกระบวนการ multiple sequence alignment เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุล ภายใต้โมเดลทางวิวัฒนาการ (Evolutionary Model) ด้วยวิธี Maximum Likelihood (ML) ด้วยโปรแกรม IQTree⁽¹¹⁾ กำหนดให้การคำนวณความน่าจะเป็นของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แสดงสถานะของลักษณะที่ปรากฏ ภายใต้การใช้โมเดลวิวัฒนาการแบบ Generalized Time-Reversible (GTR) แผนภาพ Phylogenetic Tree ที่ได้จากการวิเคราะห์ที่มีความน่าจะเป็นสูงที่สุดจัดเป็นแผนภาพที่ดีที่สุด จากนั้นใช้กระบวนการวิเคราะห์ทางสถิติแบบ Bootstrap Analysis จำนวน 1,000 ซ้ำ ในการทดสอบความเชื่อมั่นของ Clade โดย Clade ที่จับกลุ่มได้แข็งแรงควรมีค่าสถิติ Bootstrap มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 70 แผนภาพ Phylogenetic Tree สามารถแสดงภาพโดยใช้โปรแกรม TreeViewer version 2.2.0 (<https://treeviewer.org>)

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพเมอร์ (primer) และโพรบ (probe) ที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนการศึกษา

ยื่นเป้าหมาย	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' – 3')	ชนิด	อ้างอิง
การตรวจวินิจฉัย <i>LipL32</i>	AAG CAT TAC CGC TTG TGG TG	Forward primer	(12)
	GAA CTC CCA TTT CAG CGA TT	Reverse primer	
	FAM-AAA GCC AGG ACA AGC GCC G-BHQ1	Probe	
การระบุสายพันธุ์ <i>rrs2</i>	CAT GCA AGT CAA GCG GAG TA	Forward primer	(13)
	AGT TGA GCC CGC AGT TTT C	Reverse primer	

จริยธรรมการวิจัย

การศึกษานี้ผ่านการอนุมัติโดยคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เมื่อวันที่ 30 เมษายน

พ.ศ. 2567 รหัสโครงการวิจัย 2/2567 รหัสเอกสารรับรอง DMSc-EC014

ผล

การตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิส

การตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิสในผู้ป่วยโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุใช้สิ่งส่งตรวจ 2 ชนิด ได้แก่ สิ่งส่งตรวจชนิดซีรัมเพื่อตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี IFA และสิ่งส่งตรวจชนิด EDTA-Blood เพื่อวินิจฉัยด้วยวิธี Real-time PCR โดยตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้งโดยวิธีใดวิธีหนึ่งหรือทั้งสองวิธีจะถูกแปลผลพบการติดเชื้อ *Leptospira* sp. และจัดเป็นผู้ป่วยยืนยัน (confirmed case) ตามนิยามและแนวทางการรายงานโรคติดต่ออันตรายของสำนักกระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข⁽⁴⁾ จำนวนสิ่งส่งตรวจจากกลุ่มตัวอย่างโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุในระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2565 ถึงเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2567 จำนวน 2,110 ตัวอย่าง พบการติดเชื้อ *Leptospira* sp. จากการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี IFA และ/หรือ วิธี Real-time PCR จำนวน 33 ตัวอย่าง โดยมีตัวอย่าง จำนวน 18 ตัวอย่าง วินิจฉัยพบการติดเชื้อด้วยวิธี IFA จำนวน 17 ตัวอย่าง วินิจฉัยพบการติดเชื้อด้วยวิธี Real-time PCR และจำนวน 2 ตัวอย่าง วินิจฉัยพบการติดเชื้อด้วยทั้งสองวิธี จากการ

วิเคราะห์พบว่าผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิสในผู้ป่วยโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุส่วนใหญ่เป็นผู้ป่วยเพศชาย (ร้อยละ 2.1) ซึ่งมีความแตกต่างจากเพศหญิง (ร้อยละ 0.9) อย่างมีนัยสำคัญ (Chi-square test, p -value < 0.05) โดยผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิสในผู้ป่วยโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุพบอาการปวดกล้ามเนื้อมากที่สุด ร้อยละ 3.3 รองลงมาคือ ผู้ป่วยมีไข้สูงมากกว่า 38°C และปวดศีรษะรุนแรง ร้อยละ 2.9 เท่ากัน โดยการพบอาการดังกล่าวมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับอาการดังกล่าวในผู้ป่วยโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุที่ไม่พบการติดเชื้อ *Leptospira* sp. (Chi-square test, p -value < 0.05) นอกจากนี้พบผู้ป่วยจากพื้นที่ 4 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดน่าน (20 ราย) จังหวัดเชียงราย (10 ราย) จังหวัดกาญจนบุรี (2 ราย) และจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (1 ราย) โดยจำนวนผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิสในผู้ป่วยโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุจากจังหวัดน่านและจังหวัดเชียงรายมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิสในผู้ป่วยโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุจากจังหวัดกาญจนบุรีและประจวบคีรีขันธ์ (Chi-square test, p -value < 0.05) ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ลักษณะทางประชากร (Demographic Characteristics) ของกลุ่มตัวอย่างโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุที่ได้รับการยืนยันพบการติดเชื้อ *Leptospira* sp.

	N (%)	จำนวนตัวอย่างพบการติดเชื้อ <i>Leptospira</i> sp. (%)	Chi-square test	p -value
จำนวนตัวอย่างผู้ป่วยโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุ	2,110 (100)	33 (1.56)	-	-
เพศ				
ชาย	1,209 (57.3)	25 (2.1)	3.9	< 0.05
หญิง	901 (42.7)	8 (0.9)	-	-
ลักษณะทางคลินิก				
ไข้สูง > 38°C	546 (25.9)	16 (2.9)	7.78	< 0.05
ปวดกล้ามเนื้อ	419 (19.9)	14 (3.3)	9.34	< 0.05
ปวดศีรษะรุนแรง	380 (18.0)	11 (2.9)	4.33	< 0.05
ไอ	488 (23.1)	11 (2.3)	1.42	0.23
พื้นที่				
จ.น่าน	879 (41.7)	20 (2.3)	4.19	< 0.05
จ.เชียงราย	282 (13.4)	10 (3.5)	15.54	< 0.05
จ.กาญจนบุรี	50 (2.4)	2 (4.0)	0.69	0.41
จ.ประจวบคีรีขันธ์	15 (0.2)	1 (6.7)	0.31	0.58

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rrs2*

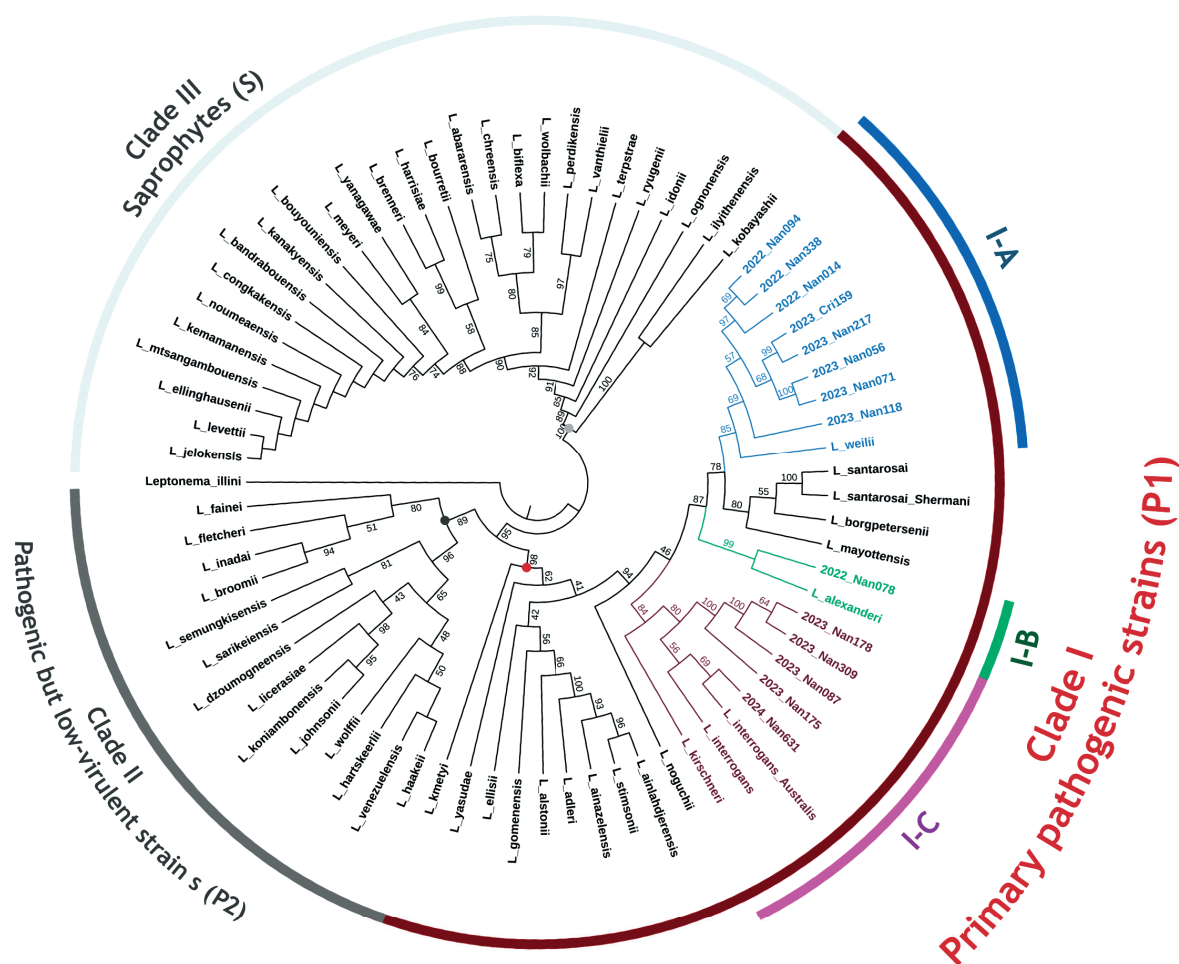
ตัวอย่างที่พบการติดเชื้อทั้งหมดนำไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *rrs2* ซึ่งเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S Ribosomal RNA เพื่อระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียจีโนส *Leptospira*⁽¹³⁾ โดยมี 14 ตัวอย่างที่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *rrs2* ได้ ผลการวิเคราะห์และศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุลด้วยวิธี Maximum Likelihood จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rrs2* ในแบคทีเรียจีโนส *Leptospira* จากสายพันธุ์อ้างอิงทั้งหมดที่ได้รับการตีพิมพ์บนฐานข้อมูล NCBI⁽⁶⁾ วิเคราะห์ร่วมกับตัวอย่างที่พบการติดเชื้อ 14 ตัวอย่าง พบการจัดกลุ่มแบคทีเรียจีโนส *Leptospira* เป็น 3 Clade หลัก ได้แก่ Clade I มีค่าสนับสนุนความเชื่อมั่น (Bootstrap Support, BS) เท่ากับ 98% ประกอบด้วย สมาชิกกลุ่มสายพันธุ์ก่อโรคหลัก (primary pathogenic strain, P1), Clade II (BS = 95%) ประกอบด้วย สมาชิกกลุ่มสายพันธุ์ก่อโรคไม่รุนแรง (pathogenic but low-virulent strain, P2) และ Clade III (BS = 100%) ประกอบด้วย สมาชิกกลุ่มสายพันธุ์ไม่ก่อโรค (saprophytes, S) ดังแสดงในภาพที่ 1 โดยพบว่าตัวอย่างทั้ง 14 ตัวอย่าง อยู่ใน Clade I ซึ่งเป็นกลุ่มสายพันธุ์ก่อโรคหลักทั้งหมด เมื่อพิจารณาเฉพาะใน Clade I พบว่าประกอบด้วย Clade ย่อย (sub-clade) ที่มีตัวอย่างจากการศึกษาครั้งนี้เป็นสมาชิกอยู่ใน 3 sub-clade ดังนี้

sub-clade I-A (BS = 85%) ประกอบด้วย สมาชิกตัวอย่างในปี พ.ศ. 2565 จำนวน 3 ตัวอย่าง ได้แก่ หมายเลข 2022_Nan014, 2022_Nan094 และ 2022_Nan338 และตัวอย่างในปี พ.ศ. 2566 จำนวน 5 ตัวอย่าง ได้แก่ หมายเลข 2023_Nan056, 2023_Nan071, 2023_Nan118, 2023_Cri159 และ 2023_Nan217

โดยพบว่าตัวอย่างในปี พ.ศ. 2565 ทั้ง 3 ตัวอย่าง อยู่ใน sub-clade ย่อยเดียวกัน ซึ่งมีค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นสูงถึง 97% แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของเวลาต่อความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรีย นอกจากนี้ ตัวอย่างที่พบใน sub-clade I-A มาจากพื้นที่จังหวัดน่าน ยกเว้นตัวอย่างหมายเลข 2023_Cri159 เท่านั้น ที่มาจากพื้นที่จังหวัดเชียงราย sub-clade I-A มีสปีชีส์ *L. weilii* แสดงความสัมพันธ์แบบ basal taxa แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างทั้งหมดใน sub-clade I-A นี้ มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้ชิดกับสปีชีส์ *L. weilii* มากที่สุด

sub-clade I-B (BS = 99%) ประกอบด้วย สมาชิกสปีชีส์ *L. alexanderi* เป็น basal taxa และตัวอย่างหมายเลข 2022_Nan078 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างนี้มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้ชิดกับสปีชีส์ *L. alexanderi* มากที่สุด

sub-clade I-C (BS = 84%) ประกอบด้วย สมาชิกตัวอย่างจากการศึกษาครั้งนี้ จำนวน 5 ตัวอย่าง จากพื้นที่จังหวัดน่าน โดยมีสปีชีส์ *L. kirschneri* แสดงความสัมพันธ์แบบ basal taxa เมื่อพิจารณาใน sub-clade I-C พบว่ามี sub-clade ย่อย จำนวน 2 sub-clade ซึ่งมีค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นสูงถึง 80% ได้แก่ sub-clade ย่อย จากตัวอย่างปี พ.ศ. 2566 ทั้งหมด (ตัวอย่างหมายเลข 2023_Nan087, 2023_Nan175, 2023_Nan178 และ 2023_Nan309) และ sub-clade ย่อย ที่มีสมาชิกตัวอย่างจากปี พ.ศ. 2567 (หมายเลข 2024_Nan631) โดยมี *L. interrogans* เป็น basal taxa ของ sub-clade ย่อย ซึ่งสปีชีส์ *L. interrogans* จัดเป็นสายพันธุ์ก่อโรคหลักที่พบการระบาดในประเทศไทย⁽¹⁴⁾ การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่พบนั้นมีความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการกับสายพันธุ์ก่อโรคหลักในประเทศไทยและมีปัจจัยด้านเวลาที่มีผลต่อความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรียด้วยเช่นกัน



วิจารณ์

ปวดกล้ามเนื้อรุนแรงโดยเฉพาะกล้ามเนื้อน่อง ร่วมกับการมีประวัติสัมผัสกับน้ำหรือสิ่งแวดล้อมที่มีพื้นที่แฉะ⁽⁴⁾ จากการศึกษาพบว่าอาการของผู้ป่วยมีความสอดคล้องกันกับการศึกษาก่อนหน้าในประเทศไทยที่พบผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิสในเพศชายมากกว่าเพศหญิง และมีอาการไข้สูงร่วมกับอาการปวดกล้ามเนื้อและอาการปวดศีรษะรุนแรง ซึ่งเป็นลักษณะทางคลินิกที่พบมากในผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิส⁽¹⁶⁻¹⁹⁾

ปัจจุบันวิธีมาตรฐานในการตรวจวินิจฉัยโรค
เลปโตสไปโรสิสใช้วิธีการทางซีโรโลยี ได้แก่ วิธี Micro-
scopic Agglutination Test (MAT) และวิธี Indirect
Immunofluorescence Assay (IFA) ในการศึกษาครั้งนี้

คณะผู้วิจัยได้เลือกใช้วิธี IFA เนื่องจากห้องปฏิบัติการมีทรัพยากรสำหรับการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี IFA และผู้ร่วมวิจัยมีความชำนาญในการอ่านสไลด์ด้วยวิธีนี้ การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี IFA มีข้อจำกัดเนื่องจากสไลด์ถูกเคลือบด้วยแอนติเจนของ *L. interrogans* เท่านั้น ทำให้ไม่สามารถครอบคลุมไปยังสายพันธุ์ก่อโรคอื่น ๆ ที่อาจตรวจพบในตัวอย่างและเป็นข้อจำกัดอย่างมากของการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีการทางซีโรโลยี⁽²⁰⁾ เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี IFA และวิธี Real-time PCR พบว่าผลที่ได้มีความสอดคล้องกัน จำนวน 2 ตัวอย่าง ซึ่งอาจมีสาเหตุจากปัจจัยหลายประการ อาทิ ระยะเวลาในการเจาะเลือดหลังจากติดเชื้อ โดยปริมาณเชื้อจะเพิ่มสูงสุดในช่วง 2-7 วันแรก หลังจากได้รับเชื้อในระยะ Leptospiremia และระบบภูมิคุ้มกันยังไม่สร้างแอนติบอดีเพื่อตอบสนองต่อการติดเชื้อ ในช่วงระยะเฉียบพลัน (acute phase) จึงสามารถตรวจสอบการติดเชื้อได้ด้วยวิธี Real-time PCR แต่ไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธี IFA⁽²¹⁾ แต่หากพ้นช่วงระยะเวลานี้ไปจะเกิดการสร้างแอนติบอดีเพื่อตอบสนองต่อการติดเชื้อในระยะฟื้นตัวจากโรค (convalescent phase) ทำให้สามารถตรวจสอบการติดเชื้อได้ด้วยวิธี IFA แต่ไม่สามารถตรวจสอบการติดเชื้อด้วยวิธี Real-time PCR ได้ รวมทั้งการได้รับยาต้านจุลชีพ ซึ่งจะทำให้กำจัดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือด ทำให้ไม่สามารถตรวจสอบการติดเชื้อได้ด้วยวิธี Real-time PCR เช่นเดียวกัน ดังนั้น การตรวจสอบการติดเชื้อด้วยวิธี IFA และ Real-time PCR จึงควรใช้ร่วมกันเพื่อยืนยันการติดเชื้อของผู้ป่วยได้^(22,23) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า ตัวอย่าง จำนวน 33 ตัวอย่าง ที่พบการติดเชื้อ *Leptospira* sp. ตามวิธีที่ใช้มีจำนวน 14 ตัวอย่าง ที่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *rrs2* เนื่องจากตัวอย่างเหล่านี้เป็นตัวอย่างที่วินิจฉัยพบการติดเชื้อด้วยวิธี Real-time PCR หรือวินิจฉัยพบการติดเชื้อทั้งจากวิธี IFA และวิธี Real-time PCR แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างเหล่านี้มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นตัวอย่างที่ถูกเก็บในช่วงระยะเฉียบพลัน ทำให้ยังคงมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่สามารถใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ เช่น ตัวอย่างหมายเลข 2023_Nan087, 2023_Nan175,

2023_Nan178, 2023_Nan309 และ 2024_Nan631 ที่ถูกระบุว่ามีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับ *L. interrogans* ซึ่งตัวอย่างเหล่านี้ไม่สามารถตรวจพบการติดเชื้อได้ด้วยวิธี IFA เนื่องจากวิธี IFA เป็นการตรวจสอบแอนติบอดีที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อในระยะฟื้นตัวจากโรค ซึ่งมีการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันเพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรียและสร้างแอนติบอดีแล้ว จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *rrs2* ในตัวอย่างที่วินิจฉัยพบการติดเชื้อเฉพาะจากวิธี IFA ได้

แบคทีเรีย *Leptospira* เป็นแบคทีเรียที่มีหลากหลายสายพันธุ์ โดยมีสายพันธุ์ก่อโรคหลัก (P1) และสายพันธุ์ก่อโรคที่ไม่รุนแรง (P2) ที่มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดโรคเลปโตสไปโรสิส แบคทีเรีย *Leptospira* ชนิดที่พบการระบาดในทุกภูมิภาคของโลก 3 อันดับแรก ได้แก่ *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* และ *L. kirschneri*⁽²⁴⁾ จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าตัวอย่างที่พบการติดเชื้อ *Leptospira* sp. มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้ชิดกับสปีชีส์ *L. weilii* จำนวน 8 ตัวอย่าง (sub-clade I-A, ภาพที่ 1) ถึงแม้ว่า *L. weilii* จะไม่ใช่ species หลักที่พบการระบาด แต่ *L. weilii* ถูกจัดเป็นอีก species หนึ่งที่อยู่ในกลุ่มสายพันธุ์ก่อโรครุนแรงเช่นกัน จากการศึกษาก่อนหน้านี้ในต่างประเทศพบการระบุชนิด *L. weilii* ได้จากตัวอย่างน้ำอุปโภคบริโภคในหมู่บ้านในประเทศชิลี⁽²⁵⁾ และจากผู้ป่วยในประเทศออสเตรเลีย⁽²⁶⁾ สำหรับประเทศไทย พบการรายงาน *L. weilii* จากตัวอย่างน้ำและตัวอย่างปัสสาวะจากสุนัขที่ไม่แสดงอาการของโรคจากการศึกษาในพื้นที่จังหวัดน่าน⁽⁹⁾ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ตัวอย่าง จำนวน 7 ตัวอย่าง จาก 8 ตัวอย่าง ที่มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้ชิดกับ *L. weilii* โดยมาจากพื้นที่จังหวัดน่านเช่นเดียวกัน และ 1 ตัวอย่าง มาจากพื้นที่จังหวัดเชียงราย แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่ *L. weilii* จะเป็นหนึ่งใน species ที่พบการระบาดในพื้นที่ดังกล่าว ซึ่งต้องอาศัยการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปเพื่อนำไปสู่ข้อสรุปนี้สำหรับการศึกษาก่อนหน้าในประเทศไทย พบว่า *L. interrogans* เป็น species ก่อโรคหลักที่พบการระบาดในประเทศไทย⁽¹⁴⁾ โดยพบการระบุชนิดของเชื้อ *L. interrogans* จากการศึกษาด้วยวิธี multilocus

sequence typing จากสิ่งส่งตรวจชนิดเลือดจากผู้ป่วยในจังหวัดอุดรธานี⁽¹⁴⁾ และพบจากการศึกษาโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rrs2* ด้วยวิธี PCR จากสิ่งส่งตรวจชนิดปัสสาวะของผู้ป่วยในพื้นที่จังหวัดน่าน⁽⁹⁾ จากการศึกษาครั้งนี้ พบตัวอย่าง จำนวน 5 ตัวอย่าง มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับ *L. interrogans* ดังแสดงใน sub-clade I-C (ภาพที่ 1) ซึ่งตัวอย่างทั้งหมดมาจากพื้นที่จังหวัดน่าน แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่ *L. interrogans* จะยังคงถูกพบอยู่ในพื้นที่ดังกล่าว นอกจากนี้ *L. alexanderi* จัดเป็นอีกหนึ่งชนิดที่มีความรุนแรงในการก่อโรค เนื่องจาก *L. alexanderi* สามารถผลิต Di-acetylated nonulosonic acid ซึ่งเป็นหนึ่งใน virulent factor ของ Genus *Leptospira*⁽³⁾ *L. alexanderi* มีรายงานการค้นพบครั้งแรกที่ประเทศจีนในปี ค.ศ. 1999⁽²⁷⁾ สำหรับประเทศไทยยังไม่พบการรายงานการพบสายพันธุ์นี้มาก่อน ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้ พบว่ามีตัวอย่าง จำนวน 1 ตัวอย่าง ที่มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับ *L. alexanderi* จึงควรเริ่มต้นศึกษาสายพันธุ์ *L. alexanderi* ในประเทศไทยต่อไปในอนาคต

สรุป

การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า อุบัติการณ์ของโรคเลปโตสไปโรสิสในผู้ป่วยโรคไขไม่ทราบสาเหตุมีค่าประมาณ 1.56% (33/2,110 ตัวอย่าง) โดยวินิจฉัยพบการติดเชื้อด้วยวิธี IFA จำนวน 18 ตัวอย่าง วินิจฉัยพบการติดเชื้อด้วยวิธี Real-time PCR จำนวน 17 ตัวอย่าง และวินิจฉัยพบการติดเชื้อด้วยวิธี IFA และ Real-time PCR จำนวน 2 ตัวอย่าง จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA จากตัวอย่างเพื่อระบุชนิดสายพันธุ์ของแบคทีเรีย *Leptospira* พบว่าตัวอย่างที่พบการติดเชื้อ *Leptospira* ถูกแบ่งเป็นกลุ่มย่อยที่มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับสายพันธุ์ก่อโรคหลัก (P1) จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *L. weillii*, *L. interrogans* และ *L. alexanderi* โดยในอนาคตการศึกษาในกลุ่มประชากรที่มีขนาดใหญ่ขึ้นร่วมกับการใช้การศึกษาคุณลักษณะทางจีโนม รวมทั้งการเก็บข้อมูลทางระบาดวิทยาที่ครบถ้วน จะช่วยส่งเสริมให้การศึกษา species *Leptospira* ที่พบในประเทศไทยมีความครอบคลุมและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัย DGHP-BAC-ZOONOSIS ซึ่งได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากศูนย์ควบคุมโรคติดต่อสหรัฐอเมริกา ผ่านศูนย์ความร่วมมือไทย-สหรัฐ ด้านสาธารณสุข ขอขอบคุณบุคลากรฝ่ายริกเกิดเซีย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และเจ้าหน้าที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ทั้ง 5 ศูนย์ (เชียงใหม่ อุดรธานี นครราชสีมา สมุทรสงคราม และสุราษฎร์ธานี) กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ทุกท่านที่ร่วมกันติดต่อประสานการรับส่งตัวอย่าง ช่วยเหลือในขั้นตอนการวิจัย และการทำปฏิบัติการ รวมทั้งการวิเคราะห์ข้อมูลจนทำให้ งานวิจัยสำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Karpagam KB, Ganesh B. Leptospirosis: a neglected tropical zoonotic infection of public health importance—an updated review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2020; 39(5): 835–46.
2. กรมควบคุมโรค. สรุปสถานการณ์ประจำปีโรคเลปโตสไปโรสิส 2567. [ออนไลน์]. 2567; [สืบค้น 23 ส.ค. 2567]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <http://doe.moph.go.th/surdata/disease.php?ds=43>
3. Fouts DE, Matthias MA, Adhikarla H, Adler B, Amorim-Santos L, Berg DE, et al. What makes a bacterial species pathogenic?: Comparative genomic analysis of the genus *Leptospira*. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10(2): e0004403. (57 pages).
4. กองระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. นิยามโรคและแนวทางการรายงานโรคติดต่ออันตราย และโรคติดต่อที่ต้องเฝ้าระวังในประเทศไทย. นนทบุรี: กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข; 2563.
5. Tangkanakul W, Smits HL, Jatanasen S, Ashford DA. Leptospirosis: an emerging health problem in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2005; 36(2): 281–8.

6. Vincent AT, Schiettekatte O, Goarant C, Neela VK, Bernet E, Thibeaux R, et al. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. PLoS Negl Trop Dis 2019; 13(5): e0007270. (25 pages).
7. Kurilung A, Perreten V, Prapasarakul N. Comparative genomic analysis and a novel set of missense mutation of the *Leptospira weilii* serogroup mini from the urine of asymptomatic dogs in Thailand. Front Microbiol 2021; 12: 731937. (17 pages).
8. Amran F, Noor Halim NA, Muhammad AH, Mohd Khalid MKN, Dasiman NM, Shamsusah NA, et al. Application of multilocus sequence typing for the characterization of *Leptospira* strains in Malaysia. Trop Med Infect Dis 2023; 8(2): 69. (11 pages).
9. Kurilung A, Chanchaithong P, Lugsomya K, Niyomtham W, Wuthiekanun V, Prapasarakul N. Molecular detection and isolation of pathogenic *Leptospira* from asymptomatic humans, domestic animals and water sources in Nan province, a rural area of Thailand. Res Vet Sci 2017; 115: 146–54.
10. Cochran WG, Cox GM. Experimental designs. Raleigh, NC: Department of Statistics, North Carolina State University; 1948.
11. Trifinopoulos J, Nguyen LT, von Haeseler A, Minh BQ. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. Nucleic Acids Res 2016; 44(W1): W232–5.
12. Stoddard RA, Gee JE, Wilkins PP, McCaustland K, Hoffmaster AR. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. Diagn Microbiol Infect Dis. 2009; 64(3): 247–55.
13. Ahmed A, Thaipadungpanit J, Boonsilp S, Wuthiekanun V, Nalam K, Spratt BG, et al. Comparison of two multilocus sequence based genotyping schemes for *Leptospira* species. PLoS Negl Trop Dis 2011; 5(11): e1374. (8 pages).
14. Thaipadungpanit J, Wuthiekanun V, Chierakul W, Smythe LD, Petkanchanapong W, Limpaboon R, et al. A dominant clone of *Leptospira interrogans* associated with an outbreak of human leptospirosis in Thailand. PLoS Negl Trop Dis 2007; 1(1): e56. (6 pages).
15. World Health Organization. Report of the second meeting of the leptospirosis burden epidemiology reference group. Geneva: World Health Organization; 2011.
16. มาลีตา วารีนิช. ลักษณะทางคลินิกและระบาดวิทยาของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิสในพื้นที่ประสบอุทกภัยภาคใต้ ตอนบน ปี 2560. ว วิชาการสาธารณสุข 2563; 29(4): 580–9.
17. วราลักษณ์ ตั้งคณะกุล. โรคเลปโตสไปโรสิสในนักระบาดวิทยาภาคสนาม. ว วิชาการสาธารณสุข 2557; 23(5): 954–62.
18. อลงกต สุพร. ปัจจัยที่สัมพันธ์กับผลการรักษาผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิสในโรงพยาบาลมุกดาหาร. ว โรงพยาบาลนครพนม 2567; 11(1): e268471. (17 หน้า).
19. อมรรัตน์ ชุตินันท์กุล, พัศุฒิ ชะกิจจานุกิจ, โรม บัวทอง. รายงานสอบสวนการระบาดโรคเลปโตสไปโรสิสหลังเกิดภาวะอุทกภัย มกราคม 2560 อำเภอทุ่งสง จังหวัดนครศรีธรรมราช. ว ควบคุมโรค 2562; 45(3): 317–29.
20. Levett PN. Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. Clin Infect Dis. 2003; 36(4): 447–52.
21. Sykes JE, Reagan KL, Nally JE, Galloway RL, Haake DA. Role of diagnostics in epidemiology, management, surveillance, and control of leptospirosis. Pathogens 2022; 11(4): 395. (24 pages).
22. Philip N, Affendy NB, Masri SN, Yuhana MY, Than LTL, Sekawi Z, et al. Combined PCR and MAT improves the early diagnosis of the biphasic illness leptospirosis. PLoS One. 2020; 15(9): e0239069. (9 pages).
23. Iwasaki H, Chagan-Yasutan H, Leano PS, Koizumi N, Nakajima C, Taurustiat D, et al.

- Combined antibody and DNA detection for early diagnosis of leptospirosis after a disaster. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2016; 84(4): 287–91.
24. Guglielmini J, Bourhy P, Schiettekatte O, Zinini F, Brisse S, Picardeau M. Genus-wide *Leptospira* core genome multilocus sequence typing for strain taxonomy and global surveillance. *PLoS Negl Trop Dis* 2019; 13(4): e0007374. (23 pages).
25. Mason MR, Encina C, Sreevatsan S, Muñoz-Zanzi C. Distribution and diversity of pathogenic *Leptospira* species in peri-domestic surface waters from South Central Chile. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10(8): e0004895. (16 pages).
26. Slack AT, Symonds ML, Dohnt MF, Corney BG, Smythe LD. Epidemiology of *Leptospira weilii* serovar Topaz infections in Australia. *Commun Dis Intell Q Rep* 2007; 31(2): 216–22.
27. Brenner DJ, Kaufmann AF, Sulzer KR, Steigerwalt AG, Rogers FC, Weyant RS. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira genomospecies*. *Int J Syst Bacteriol* 1999; 49 Pt 2: 839–58.
-

Diagnosis and Identification of *Leptospira* sp. from Direct Clinical Specimens in Pyrexia of Unknown Origin Patients

Napaporn Sriden, Nattapon Nukhunthod, Chonlada Meesub, Kanjana Sanongboon, Dararat Bangdee, Decha Pangjai, and Archawin Rojanawiwat

National Institute of Health of Thailand, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Leptospirosis is a zoonotic disease caused by the bacterium *Leptospira*. Currently, laboratory diagnoses of *Leptospira* infection are performed using serological techniques, particularly the Indirect Immunofluorescence Assay (IFA), and nucleic acid amplification techniques, such as Real-time PCR. This study aimed to diagnose *Leptospira* infections through both IFA and Real-time PCR and identify the *Leptospira* species using direct typing of the 16S rRNA (*rrs2*) gene from clinical specimens. A total of 2,110 samples from patients with pyrexia of unknown origin were included in this study. *Leptospira* infection was detected in 33 samples (1.56%). Among these, only 14 samples provided interpretable data from *rrs2* gene sequencing. Phylogenetic analysis revealed that 8 samples clustered with *L. weilii*, 5 with *L. interrogans*, and 1 with *L. alexanderi*. Notably, the identification of *L. weilii* and *L. alexanderi* from direct clinical specimens has not been previously reported in Thailand. This study suggests that *L. weilii* and *L. alexanderi* may be endemic *Leptospira* species in Thailand, in addition to *L. interrogans*.

Keywords: Leptospirosis diagnosis, *Leptospira* identification, Pyrexia of Unknown Origin, Phylogenetics

การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวมและปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระในวัคซีนป้องกันเชื้อฮีโมฟิลุส อินฟลูเอนเซ ชนิดบี โดย HPAEC-PAD

ชลดา เพ็ชรไทย กนกพร โล่หอมรินทร์ชัย กัสมา บุญมาก อภิชัย ศุภสารสาทร และ สุภาพร ภูมิอมร
สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ วัคซีนป้องกันเชื้อฮีโมฟิลุส อินฟลูเอนเซ ชนิดบี (วัคซีนฮิบ) เป็นวัคซีนป้องกันโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบและปอดอักเสบในเด็กเล็ก ผลิตจากส่วนโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ *Haemophilus influenzae* type b การตรวจหาปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวมและโพลีแซคคาไรด์อิสระเป็นพารามิเตอร์สำคัญในการควบคุมคุณภาพวัคซีน ซึ่งองค์การอนามัยโลกแนะนำวิธี HPAEC-PAD ในการตรวจวิเคราะห์ เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความถูกต้อง แม่นยำสูง เหมาะสำหรับการตรวจหาสารโพลีแซคคาไรด์ การศึกษานี้ใช้คอลัมน์ชนิดแลกเปลี่ยนไอออนลบ อุณหภูมิคอลัมน์ 30 องศาเซลเซียส สารละลายตัวพาเป็น 580 mM NaOH อัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาณที่ฉีด 50 ไมโครลิตร ตรวจวัดด้วยเครื่อง PAD ผลการศึกษาพบว่ากราฟสารมาตรฐานมีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.15 ถึง 10.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9999 ความเที่ยงเมื่อทดสอบในวันเดียวกันได้ค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวมและปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระเท่ากับ 3.38 และ 1.61 ตามลำดับ และต่างวันกันได้ค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวมและปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระเท่ากับ 4.47 และ 3.22 ตามลำดับ วิธีมีความแม่นยำสามารถตรวจวัดสารมาตรฐานที่ใส่ในวัคซีนรวม DTP-HB-Hib ได้ค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ระหว่าง 96.74 และ 103.37 ตามลำดับ วิธีมีความจำเพาะ สามารถวิเคราะห์ปริมาณโพลีแซคคาไรด์ในวัคซีนได้ตั้งแต่ 0.15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่าอุณหภูมิคอลัมน์และระยะเวลาการย่อยด้วยกรดมีผลต่อการวิเคราะห์ สรุปได้ว่าวิธีนี้สามารถใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการของสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้

คำสำคัญ: วัคซีนป้องกันเชื้อฮีโมฟิลุส อินฟลูเอนเซ ชนิดบี, ปริมาณโพลีแซคคาไรด์, HPAEC-PAD, การทดสอบความถูกต้องของวิธี

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

Received: 2 August 2024

Revised: 18 December 2024

Accepted: 17 January 2025

บทนำ

โรคติดเชื้อฮีโมฟิลุสอินฟลูเอนเซ ชนิดบี (*Haemophilus influenzae* type b) หรือเรียกสั้นๆว่า ฮิบ (Hib) เป็นโรคที่มีความสำคัญในเด็กเล็ก โดยเฉพาะที่อายุต่ำกว่า 2 ปี เชื้อฮิบก่อให้เกิดโรคที่สำคัญ เช่น โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ โรคติดเชื้อในกระแสเลือด โรคปอดอักเสบ โรคข้ออักเสบ และโรคหูชั้นกลางอักเสบ โดยเชื้อจะแพร่กระจายจากคนสู่คนผ่านทางละอองในอากาศ และการสัมผัสโดยตรงกับสารคัดหลั่งของทางเดินหายใจ⁽¹⁾ สำหรับประเทศไทยจากการศึกษาของกรมควบคุมโรคกระทรวงสาธารณสุข ในปี พ.ศ. 2543–2544 พบอุบัติการณ์ของโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบจากเชื้อฮิบ 6.1 รายต่อประชากรเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี แสคนต่อปี ซึ่งถือว่าค่อนข้างต่ำ⁽²⁾ ถึงแม้อุบัติการณ์โรคจะต่ำ แต่หากเกิดการติดเชื้อนี้จะมีอาการรุนแรงได้ ด้วยเหตุนี้การป้องกันโรคทำได้โดยการฉีดวัคซีนป้องกันเชื้อฮีโมฟิลุส อินฟลูเอนเซ ชนิดบี หรือวัคซีนฮิบ (*Haemophilus influenzae* type b vaccine; Hib vaccine) เพื่อสร้างภูมิคุ้มกัน และลดอุบัติการณ์ของการติดเชื้อฮิบลงได้

วัคซีนฮิบ ผลิตจากส่วนโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อฮิบ มีลักษณะโครงสร้างเป็น linear polymer ของ 3-b-D-ribofuranosyl (1→1) D-ribitol-5-phosphate (PRP) นำมา conjugate กับโปรตีนพาหะ ซึ่งอาจเป็น CRM197 toxoid ของเชื้อบาดทะยักหรือคอตีบ วัคซีนฮิบมี 2 ชนิด คือ วัคซีนชนิดเดี่ยวและวัคซีนรวม ซึ่งวัคซีนรวมจะรวมอยู่กับวัคซีนคอตีบ บาดทะยัก ไอกรน ตับบักเสบปี หรือโปลิโอชนิดฉีด ขึ้นอยู่กับบริษัทผู้ผลิต^(1,3,4) ปัจจุบันประเทศไทยได้บรรจุวัคซีนรวมคอตีบ บาดทะยัก ไอกรน ตับบักเสบปี และฮิบอยู่ในแผนงานการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันแห่งชาติตั้งแต่ปี พ.ศ. 2562⁽⁵⁾ ใช้ฉีดเข้ากล้ามเนื้อในเด็กอายุตั้งแต่ 2 เดือนขึ้นไป ทำให้มีการนำวัคซีนรวมที่มีฮิบเป็นส่วนประกอบมาขึ้นทะเบียนตำรับยาในประเทศไทยเพิ่มมากขึ้นเป็นอย่างมาก สำหรับการขึ้นทะเบียนตำรับในประเทศไทยจะต้องมีการตรวจวิเคราะห์คุณภาพ โดยสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เป็นห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพวัคซีนภาครัฐแห่งเดียวของประเทศ เพื่อยืนยันว่าวัคซีนที่นำมาขึ้นทะเบียนมีคุณภาพและมีความปลอดภัย

ตามมาตรฐาน ในการตรวจวิเคราะห์คุณภาพของวัคซีน สามารถตรวจสอบโดยใช้วิธีทางห้องปฏิบัติการ ทั้งทางด้านชีวภาพ กายภาพ และด้านเคมี รายการวิเคราะห์ปริมาณโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) หรือปริมาณแอนติเจนรวมและอิสระเป็นพารามิเตอร์หนึ่งที่มีความสำคัญในการตรวจวิเคราะห์คุณภาพวัคซีน⁽⁶⁾ เพื่อยืนยันว่าวัคซีนมีปริมาณโพลีแซคคาไรด์ตรงตามข้อกำหนดผลิตภัณฑ์ที่ระบุในทะเบียนตำรับยาชีววัตถุ ซึ่งข้อกำหนดผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ของปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวมอยู่ระหว่างร้อยละ 80 ถึง 120 ของปริมาณที่เติมลงไป (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระจะมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 20 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวม

วิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโพลีแซคคาไรด์ หรือปริมาณแอนติเจนในวัคซีนฮิบ องค์การอนามัยโลก (WHO) ได้แนะนำหลายวิธี เช่น Colorimetric Method, Immunological Method และ Chromatographic Method เป็นต้น⁽⁶⁾ ซึ่งบางวิธียังมีข้อจำกัดสำหรับห้องปฏิบัติการภาครัฐ เช่น การตรวจด้วยเทคนิค ELISA ถึงแม้จะเป็นวิธีที่มีความจำเพาะ และผู้ผลิตบางรายใช้วิธีนี้ในการตรวจคุณภาพของวัคซีน แต่ต้องใช้สารแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่จำเพาะต่อวัคซีนของแต่ละบริษัท จึงมีความจำเพาะที่จำกัดและอาจมีแนวโน้มที่จะให้ผลบวกหรือผลลบปลอม เนื่องจากข้อผิดพลาดทางเทคนิค การปนเปื้อนของตัวอย่าง การใช้สารเคมีคุณภาพต่ำ ความไม่เสถียรจากการไวต่ออุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลง และอื่นๆ แต่วิธี High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulse Amperometric Detection (HPAEC-PAD) เป็นวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหาสารจำพวกคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) โอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) และโพลีแซคคาไรด์ เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความถูกต้อง แม่นยำสูง⁽⁷⁾ และไม่มีความจำเป็นต้องใช้สารจากผู้ผลิต จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการได้ และในปัจจุบันบริษัทผู้ผลิตวัคซีนส่วนใหญ่จะใช้วิธี HPAEC-PAD ในการตรวจวิเคราะห์ โดยวิธีนี้จะอาศัยความแตกต่างของอัตรา

การเคลื่อนที่ของแต่ละองค์ประกอบของสารบนเฟสคงที่ (Stationary Phase) ภายใต้การพาของเฟสเคลื่อนที่ (Mobile Phase) โดยใช้ Anion-exchange Column ที่เป็นเฟสคงที่ มีสารตัวกลาง (Ion Exchanger) เป็นประจุบวก ซึ่งจะจับกับสารละลายที่มีประจุลบด้วยแรง Electrostatic force เมื่อสารถูกปล่อยออกมา จะผ่านเครื่องตรวจวัดสัญญาณชนิด PAD ซึ่งเป็น Electro-chemical detector จากนั้นคำนวณหาปริมาณของสาร โดยอ่านค่าจากกราฟมาตรฐานที่เตรียมจากสารมาตรฐาน ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

การศึกษานี้จึงดำเนินการพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวมและปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระในวัคซีนฮิบ โดยวิธี HPAEC-PAD เพื่อนำมาใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ในการตรวจทางห้องปฏิบัติการสำหรับการควบคุมคุณภาพของวัคซีนฮิบในประเทศไทย ซึ่งจะทำให้ผู้บริโภคได้รับวัคซีนที่มีคุณภาพเป็นไปตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์และมาตรฐานสากลในการป้องกันโรคได้

วัสดุและวิธีการ

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี: น้ำ HPLC grade; conductivity 18.2 MW CAS No. 7732-18-5 (Ligand Scientific, Thailand), methanol HPLC grade CAS No. 67-56-1 (J.T. Baker, USA), 1N NaOH CAS No. 1310-73-2 (Merck, Germany), NaH_2PO_4 , NaCl, HCl; analytical grade (Sigma-Aldrich, USA) และ $\text{H}_{25}\text{Na}_2\text{O}_{16}\text{P}$ analytical grade (BDH, England)

สารมาตรฐาน: WHO International Standard *Haemophilus influenzae* b polysaccharide poly-ribosyl-ribitol-phosphate (PRP) code 02/208 (National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), UK)⁽⁸⁾ ใช้สำหรับการทดสอบความเหมาะสมของระบบ และ Adonitol (Ribitol) CAS No. 488-81-3 (Sigma-Aldrich, USA)⁽⁹⁾ ใช้สำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน และใช้เป็นสารควบคุมผลบวก (Positive Control)

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่อง HPLC รุ่น LC-20ADXR (Nexera, Shimadzu, Japan), Software LabSolution (Shimadzu, Japan), Pulse Amperometric Detector รุ่น ED743 (GL Sciences, Japan) โดยใช้คอลัมน์แยกสารชนิด CarboPac MA1 analytical column ขนาด 4×250 มิลลิเมตร (Dionex, USA) และ CarboPac MA1 guard column (Dionex, USA)

เครื่องชั่งความละเอียดทศนิยม 2 และ 5 ตำแหน่ง (Sartorius, Germany), ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส (Sanyo, Japan), ตู้แช่แข็งควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Haier, China), ตู้ทำความร้อน (Memmert, Germany), ตู้ดูดควัน (Kottermann, Germany), เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมความเย็น (Kubota, Japan), เครื่องเขย่าผสม (Scientific Industries, USA), เครื่องดูดสุญญากาศ (Gast, USA), แผ่นกรอง Nylon ขนาด 0.22 ไมครอน (Corning, USA), หลอด cryotube ขนาด 2 มิลลิลิตร (Eppendorf, Germany), หลอดแก้วทนกรด (glass microtube with gasket Teflon plug) ขนาด 4 มิลลิลิตร (Agilent, USA), เครื่องแก้ว และไมโครปิเปต ขนาด 1-1,000 ไมโครลิตร (Finnpipette, Finland)

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

การเตรียมสารละลายมาตรฐานเข้มข้น: ชั่งสารมาตรฐาน ribitol น้ำหนัก 15 มิลลิกรัม ใส่ในขวดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำที่กำจัดแก๊สละลายให้เข้ากันและปรับปริมาตรด้วยน้ำดังกล่าวให้ครบ 100 มิลลิลิตร แบ่งสารละลายลงในหลอด cryotube ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปเก็บไว้ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับใช้งาน: เจือจางสารละลายมาตรฐานเข้มข้น ribitol ด้วยน้ำที่กำจัดแก๊สก่อนการใช้งานให้มีความเข้มข้นของ ribitol เท่ากับ 0.15, 0.75, 1.50, 4.50, 7.50 และ 10.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในหลอดทดลอง เพื่อใช้สร้างกราฟมาตรฐาน กรองด้วยแผ่นกรอง Nylon ขนาด 0.22 ไมครอน

การเตรียมสารควบคุมผลบวก: เตรียมโดยใช้สาร ribitol ต่างรุ่นการผลิตกับที่ใช้เตรียมกราฟมาตรฐาน นำมาซึ่งและละลายด้วยน้ำที่กำจัดแก๊สให้มีความเข้มข้นของสาร ribitol เท่ากับ 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กรองด้วยแผ่นกรอง Nylon ขนาด 0.22 ไมครอน

ตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่าง: วัคซีนรวม คอตีบ บาดทะยัก ไอกรน ตัวยกเสปปี และฮิบ (DTP-HepB-Hib) ที่ขึ้นทะเบียนในประเทศไทย จำนวน 1 รุ่นการผลิต

การเตรียมตัวอย่าง: นำวัคซีนรุ่นการผลิตเดียวกัน เทรวมกันให้มีปริมาตรอย่างน้อย 8 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการเขย่าประมาณ 30 วินาที

การเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวม: ดูดวัคซีนที่เตรียมไว้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดแก้วทนกรด เพื่อนำไปย่อยด้วยกรดต่อไป

การเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระ: เติมวัคซีนที่เตรียมไว้ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตร ขนาด 5 มิลลิลิตร เติม Phosphate Buffer, 5 mM pH 6.8 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน จากนั้นเขย่าอย่างน้อย 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,300 g เวลา 30 นาที อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ส่วนใสที่ได้ นำไปผ่าน SPE C4 Cartridge เพื่อแยกโพลีแซคคาไรด์อิสระจากโพลีแซคคาไรด์รวม แล้วนำไปย่อยด้วยกรดต่อไป

การย่อยตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานด้วยกรด (acid hydrolysis) เป็นขั้นตอนสลายโพลิเมอร์ (depolymerization) โดยดูดตัวอย่างสารละลายมาตรฐานสำหรับใช้งานที่ความเข้มข้นต่างๆ และสารควบคุมผลบวก ใส่ในหลอดแก้วทนกรด หลอดละ 1 มิลลิลิตร เติม 6 N HCl ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปอบในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 100 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 5 ± 3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ± 2 นาที เติมสารละลาย 1 M NaOH ปริมาตรหลอดละ 400 ไมโครลิตร นำไปกรองด้วยแผ่นกรอง Nylon ขนาด 0.22 ไมครอน ก่อนวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC สำหรับตัวอย่างวัคซีน

เพื่อวิเคราะห์ปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวมที่ย่อยแล้วให้เจือจางด้วยสารละลาย 70 mM NaOH เพื่อให้มีปริมาณโพลีแซคคาไรด์อยู่ในช่วงค่ากราฟมาตรฐาน ผสมให้สารละลายเข้ากัน แล้วนำไปกรองด้วยแผ่นกรอง Nylon ขนาด 0.22 ไมครอน ก่อนวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีตรวจวิเคราะห์

ทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี HPAEC-PAD ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวมและปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระในวัคซีนฮิบ เพื่อให้ได้ช่วงความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่จะนำมาใช้เป็นกราฟมาตรฐานที่มีความเป็นเส้นตรง และทดสอบกับตัวอย่างที่ระดับการเจือจางเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ซึ่งสภาวะที่ทำการศึกษา ประกอบด้วย ขั้นตอนการย่อยด้วยกรดเพื่อสลายสายโพลีแซคคาไรด์ให้ได้ส่วน ribitol อิสระก่อนนำมาผ่านคอลัมน์วิเคราะห์ โดยเลือกความเข้มข้นกรด ปริมาตรที่ใช้ อุณหภูมิ และเวลาที่สามารถย่อยโพลีแซคคาไรด์ในตัวอย่างได้ดีและใช้ระยะเวลาในการย่อยเหมาะสม รวมทั้งสามารถแยกพีค (peak) ได้ดี การเลือกช่วงความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ซึ่งช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสม ต้องครอบคลุมกับปริมาณโพลีแซคคาไรด์ในตัวอย่างและมีความเป็นเส้นตรง

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวมและปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระในวัคซีนฮิบ โดย HPAEC-PAD

นำสารละลายมาตรฐานสำหรับใช้งาน สารควบคุมผลบวก และสารละลายตัวอย่างที่ย่อยด้วยกรดแล้วข้างต้น มาตรวจวัดด้วยเครื่อง HPAEC-PAD ที่ใช้สภาวะการทำงาน ประกอบด้วย คอลัมน์แยกสารชนิด CarboPac MA1 analytical column ขนาด 4×250 มิลลิเมตร พร้อม CarboPac MA1 guard column ตั้งอุณหภูมิของ column chamber และอุณหภูมิของ auto sampler chamber ไว้ที่ 30 และ 4 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ใช้ working และ reference electrode ชนิด Gold และ AgCl ตามลำดับ ปริมาตรการฉีดตัวอย่างต่อครั้งเท่ากับ 50 ไมโครลิตร ใช้ 580 mM NaOH เป็นสารตัวพา ปรับอัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที

ตัวตรวจวัดสัญญาณชนิด Pulse amperometric ตั้งระยะเวลาการทำงานแต่ละรอบ 40 นาที คำนวณปริมาณ โพลีแซคคาไรด์ โดยอ่านค่าจากกราฟมาตรฐานของ ribitol ที่เครื่องคำนวณให้ นำมาแปลงค่าให้เป็นปริมาณ โพลีแซคคาไรด์ โดยคูณด้วย dilution factor และ conversion factor ที่มีค่าเท่ากับ 2.42 (conversion factor) คำนวณจากน้ำหนักโมเลกุลของ PRP repeating units ทารด้วยน้ำหนักโมเลกุลของสาร ribitol⁽¹⁰⁻¹²⁾

การทดสอบความพร้อมของระบบ (System Suitability)

ฉีดสารมาตรฐาน PRP ที่ระดับความเจือจาง 1:20 และ 1:40 โดยระดับความเจือจางละ 3 ซ้ำ คำนวณส่วน เบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เกณฑ์การยอมรับต้องมี ส่วน เบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของแต่ละระดับความเจือจาง ต้องไม่เกินร้อยละ 5 และผลวิเคราะห์ที่ได้ต้องมีปริมาณ โพลีแซคคาไรด์อยู่ในระหว่างร้อยละ 80 และ 120 ของ ปริมาณโพลีแซคคาไรด์ของสารมาตรฐาน PRP ที่ใช้

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์^(13,14)

ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน และช่วง ค่าของการวิเคราะห์ (Linearity and Range)

วิเคราะห์สารละลายมาตรฐานสำหรับการใช้งาน ที่มีความเข้มข้นของสาร ribitol เท่ากับ 0.15, 0.75, 1.50, 4.50, 7.50 และ 10.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยเครื่อง HPAEC-PAD ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ สร้าง กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสาร ribitol และ พื้นที่ใต้กราฟ คำนวณสมการถดถอยเชิงเส้น (Linear regression Equation) และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Coefficient of Correlation; r) เกณฑ์การยอมรับค่า r ต้องไม่น้อยกว่า 0.998

การทดสอบความเที่ยง (Precision)

ทำการศึกษาใน 2 หัวข้อคือ 1) การทำซ้ำในวัน เดียวกัน โดยใช้ตัวอย่างเดียวกัน วิเคราะห์จำนวน 9 ซ้ำ ในวันเดียวกัน โดยนักวิเคราะห์คนเดียวกัน และ 2) การวิเคราะห์ต่างวัน โดยใช้ตัวอย่างเดียวกัน นำมา เติร์ยมและวิเคราะห์ 6 การทดสอบต่างวันกัน วิเคราะห์ วันละ 3 ซ้ำ โดยนักวิเคราะห์คนเดียวกัน คำนวณค่าเฉลี่ย

ปริมาณโพลีแซคคาไรด์ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เกณฑ์การยอมรับต้อง มีส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของปริมาณโพลีแซค คาไรด์รวมไม่เกินร้อยละ 5 และปริมาณโพลีแซคคาไรด์ อิสระไม่เกินร้อยละ 10 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ ต่างวันด้วยสถิติ Independent T-test ซึ่งผลการ วิเคราะห์จะต้องไม่แตกต่างกัน

การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

เติมสารละลายมาตรฐาน จำนวน 3 ความเข้มข้น ที่อยู่ในช่วงกราฟมาตรฐานลงในขวดขึ้นตัวอย่าง วิเคราะห์ ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ คำนวณร้อยละการคืนกลับ เกณฑ์ การยอมรับของปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวมต้องมีร้อยละ การคืนกลับอยู่ระหว่างร้อยละ 90 และ 110 และปริมาณ โพลีแซคคาไรด์อิสระต้องมีร้อยละการคืนกลับอยู่ระหว่าง ร้อยละ 80 และ 120

การทดสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity)

เปรียบเทียบ Retention Time (RT) ของพีคจาก โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน สารควบคุมผลบวก สำหรับใช้งาน ตัวอย่างสำหรับทดสอบ กับตัวอย่างวัดขึ้น ชนิดอื่น ตัวอย่างสำหรับทดสอบจะต้องปรากฏพีคจาก โครมาโตแกรมที่ RT ใกล้เคียงกับพีคจากโครมาโตแกรม ของสารมาตรฐานและสารควบคุมผลบวกสำหรับใช้งาน

การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิง ปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ)

LOD คำนวณจากค่าความเข้มข้นสารที่ให้ค่า สัญญาณเป็น 3 เท่าของสัญญาณรบกวน และ LOQ คำนวณจาก ความเข้มข้นของสารที่ให้ค่าสัญญาณเป็น 10 เท่าของสัญญาณรบกวน

การทดสอบความทนของวิธี (Robustness)

ทำการศึกษาใน 3 ตัวแปร คือ 1) อายุของสารตัวพา 2) อุณหภูมิของคอลัมน์ และ 3) ระยะเวลาการย่อย ด้วยกรด ทำการวิเคราะห์โดยใช้ตัวอย่างเดียวกัน นำมาเติร์ยมและวิเคราะห์จำนวนตัวแปรละ 3 การทดสอบ ต่างวัน ทำการวิเคราะห์ครั้งละ 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบผล การวิเคราะห์ทางสถิติ

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Estimation of Measurement Uncertainty)

ประเมินค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์
เพื่อให้เป็นไปตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017
โดยคำนึงถึงแหล่งความไม่แน่นอนทุกแหล่ง เมื่อรวมค่า
ความไม่แน่นอนทั้งหมด คำนวณค่าความไม่แน่นอนขยาย
ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผล

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีตรวจวิเคราะห์

จากการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของ
วิธี HPAEC-PAD ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ
โพลีแซคคาไรด์รวมและปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระ
ในวัคซีนฮิบ ได้สภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์
ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับวิธี HPAEC-PAD ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวมและ
ปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระในวัคซีนฮิบ

Parameter	Setting
Column and Guard Column	CarboPac MA1
Column Temperature	30°C
Detection	Pulsed Amperometric detection
Gold Electrode	Not disposable
Reference Electrode	AgCl
Elution Conditions/Eluent	Isocratic – 580 mM NaOH
Wash-Regeneration Condition/Equilibration	Before starting an analysis, washing with NaOH 1M for 1h, equilibration with NaOH 580 mM for 1h
Autosampler Temperature	4°C
Injection Volume	50 µL
Flow Rate	0.4 mL/min
Run Time	40 min
Software for Data Acquisition and Processing	LabSolution

การทดสอบความพร้อมของระบบเมื่อฉีดสาร
มาตรฐาน PRP ที่ระดับความเจือจาง 1:20 และ 1:40
โดยฉีดระดับความเจือจางละ 3 ซ้ำ คำนวณส่วนเบี่ยงเบน
มาตรฐานสัมพัทธ์ พบว่าปริมาณโพลีแซคคาไรด์ของสาร
มาตรฐาน PRP ที่ระดับความเจือจาง 1:20 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ
16.83 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่าส่วนเบี่ยงเบน
มาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 0.59 ที่ระดับความเจือจาง 1:40
มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 17.98 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ
มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 0.78 ดังแสดง
ในตารางที่ 2

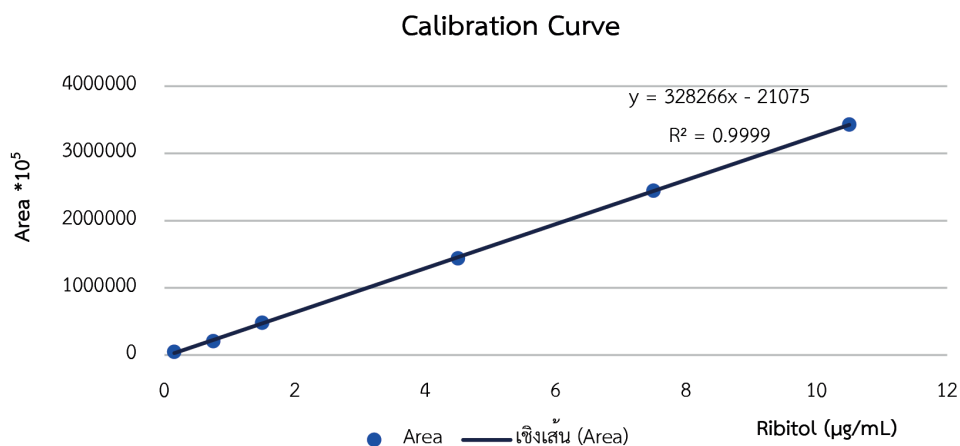
ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน และช่วงค่าของ การวิเคราะห์ (Linearity and Range)

ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน และ
ช่วงค่าของการวิเคราะห์ เมื่อนำค่าพื้นที่ใต้กราฟและ
ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน ribitol ที่มีความ
เข้มข้นระหว่าง 0.15 ถึง 10.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
มาสร้างกราฟ จะได้กราฟที่มีความเป็นเส้นตรง มีค่า
สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9999 โดยมีสมการ
ถดถอยเชิงเส้น $y = 328266x - 21075$ ดังแสดงในภาพที่ 1
การทดสอบความเป็นเส้นตรงด้วย F-test ได้ค่ามากกว่า
ค่า F-critical ที่ alpha 0.05 ผลจากกราฟ Residual Plot

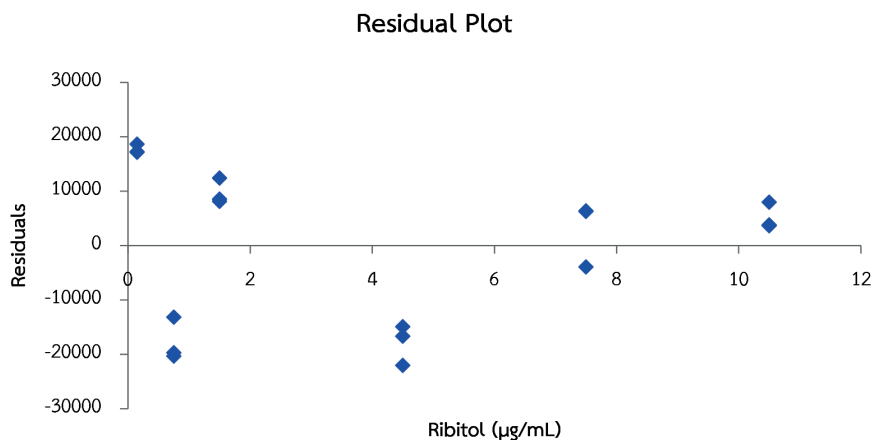
ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความพร้อมของระบบเมื่อวิเคราะห์สารมาตรฐาน PRP ที่ระดับความเจือจาง 1:20 และ 1:40

ครั้งที่	ปริมาณโพลีแซคคาไรด์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	1:20	1:40
1	16.74	17.99
2	16.82	18.12
3	16.93	17.84
ค่าเฉลี่ย	16.83	17.98
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.10	0.14
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์	0.59	0.78

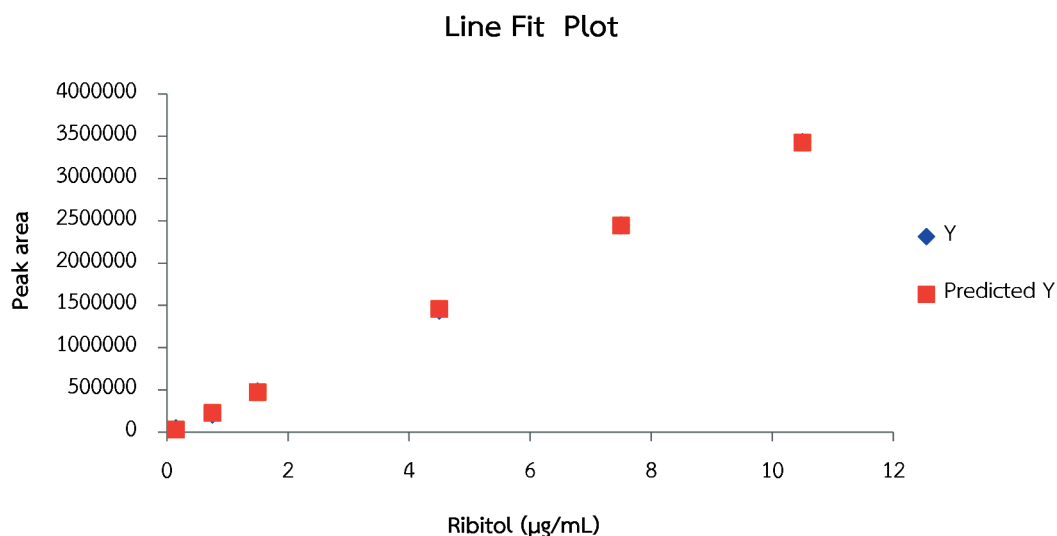
พบว่ามีการกระจายตัวของค่ารอบๆ ของแกน X ดังแสดงในภาพที่ 2 และกราฟ Line Fit Plot พบการเรียงตัวของจุดค่า y ที่ตรวจวัดได้เทียบกับ predicted y มีค่าใกล้เคียงกันเป็นการยืนยันให้เห็นว่ากราฟเป็นเส้นตรงดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าพื้นที่ใต้กราฟ (แกน Y) และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน ribitol ที่มีความเข้มข้นระหว่าง 0.15 ถึง 10.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (แกน X)



ภาพที่ 2 กราฟ Residual Plot ของการตรวจวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน ribitol ที่มีความเข้มข้นระหว่าง 0.15 ถึง 10.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 3 กราฟ line fit plot ของการตรวจวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน ribitol ที่มีความเข้มข้นระหว่าง 0.15 ถึง 10.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การทดสอบความเที่ยง (Precision)

การทดสอบความเที่ยง เมื่อทำซ้ำในวันเดียวกัน ใช้ตัวอย่างเดียวกัน วิเคราะห์จำนวน 9 ซ้ำในวันเดียวกัน พบว่าค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวมที่คำนวณได้เท่ากับ 3.38 และ ปริมาณ

โพลีแซคคาไรด์อิสระที่คำนวณได้เท่ากับ 1.61 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวมไม่เกินร้อยละ 5 และ ปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระไม่เกินร้อยละ 10 ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการศึกษาความเที่ยงเมื่อทำซ้ำในวันเดียวกัน ใช้ตัวอย่างเดียวกัน วิเคราะห์จำนวน 9 ซ้ำในวันเดียวกัน

ครั้งที่	ปริมาณโพลีแซคคาไรด์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	ปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวม	ปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระ
1	5.42	1.18
2	5.65	1.18
3	6.02	1.19
4	5.93	1.17
5	5.93	1.19
6	5.71	1.14
7	5.54	1.16
8	5.93	1.15
9	5.68	1.20
ค่าเฉลี่ย	5.76	1.17
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.19	0.02
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (ร้อยละ)	3.38	1.61

การทดสอบความเที่ยง เมื่อใช้ตัวอย่างวัคซีนเดียวกัน เตรียมตัวอย่างใหม่ในแต่ละวัน ทำการวิเคราะห์ต่างวัน จำนวน 6 วัน วิเคราะห์วันละ 3 ซ้ำ โดยนักวิเคราะห์คนเดียว พบว่าค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวมที่คำนวณได้เท่ากับ 4.47

และปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระที่คำนวณได้เท่ากับ 3.22 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับคือส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวมไม่เกินร้อยละ 5 และปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระไม่เกินร้อยละ 10 ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการศึกษาความเที่ยง เมื่อใช้ตัวอย่างวัคซีนเดียวกัน เตรียมตัวอย่างใหม่ในแต่ละวัน ทำการวิเคราะห์ต่างวัน จำนวน 6 วัน วิเคราะห์วันละ 3 ซ้ำ

วันที่	ปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวม (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)				ปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระ (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)			
	ฉีดครั้งที่ 1	ฉีดครั้งที่ 2	ฉีดครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	ฉีดครั้งที่ 1	ฉีดครั้งที่ 2	ฉีดครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
1	6.62	6.51	6.96	6.70	1.25	1.15	1.16	1.19
2	6.35	6.44	6.73	6.50	1.21	1.14	1.14	1.16
3	6.39	6.54	6.55	6.49	1.13	1.10	1.12	1.12
4	6.64	6.70	8.02	7.12	1.29	1.14	1.24	1.22
5	5.34	8.73	5.60	6.56	1.18	1.18	1.19	1.18
6	5.90	6.36	6.13	6.13	1.13	1.10	1.12	1.12
	ค่าเฉลี่ย			6.58	ค่าเฉลี่ย			1.16
	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน			0.29	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน			0.04
	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (ร้อยละ)			4.47	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (ร้อยละ)			3.22

การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

การทดสอบความแม่นยำ เมื่อเติมสารละลายมาตรฐาน ribitol จำนวน 3 ความเข้มข้นที่เติมลงในวัคซีนตัวอย่างที่อยู่ในช่วงกราฟมาตรฐานลงในตัวอย่าง วิเคราะห์ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ พบว่าค่าร้อยละการคืนกลับของปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวมอยู่ระหว่างร้อยละ 93.75 และ 106.67 และค่าร้อยละการคืนกลับของปริมาณ

โพลีแซคคาไรด์อิสระอยู่ระหว่างร้อยละ 92.11 และ 115.79 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ คือ ปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวมต้องมีร้อยละการคืนกลับอยู่ระหว่างร้อยละ 90 และ 110 และปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระต้องมีร้อยละการคืนกลับอยู่ระหว่างร้อยละ 80 และ 120 ดังแสดงในตารางที่ 5

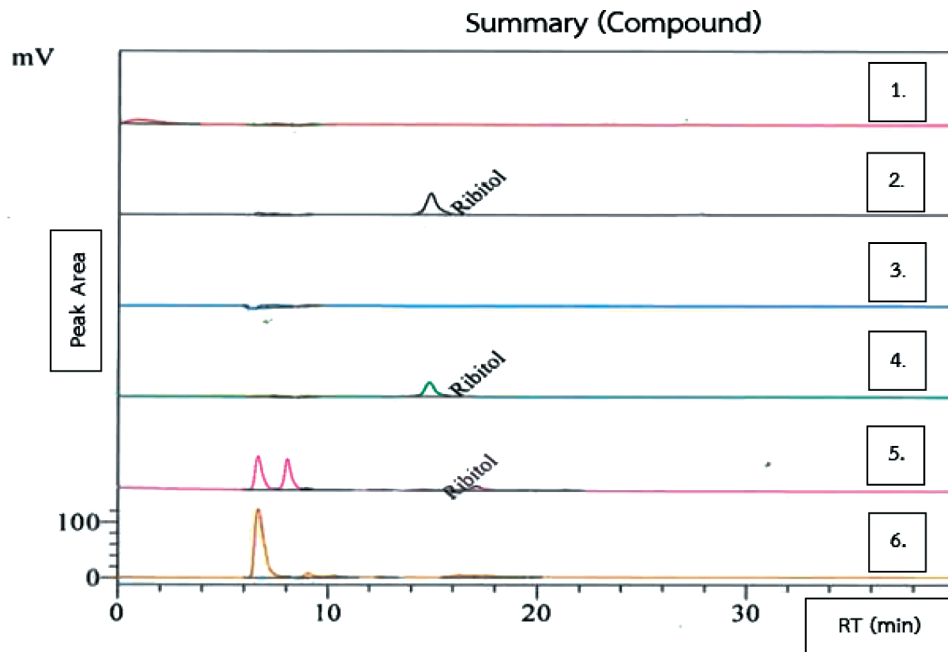
ตารางที่ 5 ร้อยละการคืนกลับของการเติมสารมาตรฐาน ribitol ในตัวอย่าง จำนวน 3 ความเข้มข้น เติมลงในวัคซีนตัวอย่าง

ครั้งที่	ร้อยละการคืนกลับของสารมาตรฐาน ribitol ความเข้มข้นของ ribitol ที่เติมลงในวัคซีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)					
	ปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวม			ปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระ		
	0.75	4.50	7.50	0.75	4.50	7.50
1	105.41	100.00	98.14	115.79	94.67	111.17
2	100.00	99.11	106.67	92.11	97.78	101.87
3	93.75	96.89	98.94	94.59	97.78	97.07

การทดสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity)

การทดสอบความจำเพาะของวิธี แสดงให้เห็น
จาก Retention Time (RT) ของพีคจากโครมาโต
แกรม โดยสารละลาย blank และตัวอย่างวัคซีนชนิดอื่น

ไม่ปรากฏพีครบกวนการวิเคราะห์ ส่วนตัวอย่างสำหรับ
ทดสอบ ปรากฏพีคที่ RT ใกล้เคียงกับพีคสารมาตรฐาน
ribitol และสารควบคุมผลบวกสำหรับใช้งาน ดังแสดง
ในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน สารควบคุมผลลบ สารควบคุมผลบวก ตัวอย่างสำหรับทดสอบกับ
ตัวอย่างวัคซีนชนิดอื่น (1) NaCl (2) สารมาตรฐาน ribitol (3) สารละลาย blank (negative control)
(4) positive control (CP) (5) โพลีแซคคาไรด์รวม (ตัวอย่างสำหรับทดสอบ) และ (6) ตัวอย่าง
วัคซีนชนิดอื่น

การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และ ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ)

ขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) อยู่ที่ระดับ
0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และขีดจำกัดของการวัดเชิง
ปริมาณ (LOQ) อยู่ที่ระดับ 0.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
ซึ่งคำนวณจากค่าความเข้มข้นสารที่ให้ค่าสัญญาณเป็น
3 และ 10 เท่าของสัญญาณรบกวนของกราฟมาตรฐาน
จำนวน 6 ครั้ง ดังแสดงในตารางที่ 6 แต่จากตารางจะ
เห็นว่าค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณที่คำนวณได้มี
ค่าเท่ากับ 0.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งต่ำกว่าปริมาณ
ความเข้มข้นต่ำสุดของสารมาตรฐานคือ 0.15 ไมโครกรัม

ต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงกำหนดค่าขีดจำกัดของการวัดเชิง
ปริมาณที่ 0.15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นค่าความ
เข้มข้นต่ำสุดของสารมาตรฐาน

การทดสอบความทนของวิธี (Robustness)

การทดสอบความทนของวิธี เมื่อเปลี่ยนอายุ
ของสารตัวพาที่เตรียมไว้ อายุ 0, 7 และ 14 วัน ทำการ
วิเคราะห์ตัวอย่าง จำนวน 3 ซ้ำ พบว่าปริมาณโพลีแซค-
คาไรด์รวมมีค่าเฉลี่ย 6.45, 6.64 และ 6.72 ไมโครกรัม
ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และปริมาณโพลีแซคคาไรด์
อิสระมีค่าเฉลี่ย 1.29, 1.29 และ 1.26 ไมโครกรัม
ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 7

เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยสถิติ One-way ANOVA พบว่าปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวมมีค่า Sig เท่ากับ 0.862 และปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระมีค่า Sig เท่ากับ 0.838 ซึ่งมากกว่า 0.05 แสดงว่าผลการทดสอบที่ตรวจโดยใช้สารตัวพาที่เตรียมไว้อายุ 0, 7 และ 14 วัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

การทดสอบความทนของวิธี เมื่อเปลี่ยนอุณหภูมิของคอลัมน์จากเดิม 30 องศาเซลเซียส เป็น 25 องศาเซลเซียส ทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง จำนวน 3 ซ้ำ พบว่าปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวมมีค่าเฉลี่ย 6.45 และ 6.19 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระมีค่าเฉลี่ย 1.29 และ 1.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 6 แสดงค่า LOD และ LOQ ที่คำนวณจากค่าความเข้มข้นสารที่ให้ค่าสัญญาณ (S/N) เป็น 3 และ 10 เท่าของสัญญาณรบกวนของกราฟมาตรฐาน

ครั้งที่	LOD (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	LOQ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	0.01	0.04
2	0.01	0.04
3	0.01	0.05
4	0.02	0.05
5	0.02	0.05
6	0.02	0.05
ค่าเฉลี่ย	0.02	0.05

ตารางที่ 7 ผลการศึกษาความทนของวิธีวิเคราะห์ เมื่อเปลี่ยนอายุของสารตัวพาที่เตรียมไว้ อายุ 0, 7 และ 14 วัน

ครั้งที่	ปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวม			ปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระ		
	Day 0	Day 7	Day 14	Day 0	Day 7	Day 14
1	6.37	6.38	6.57	1.29	1.27	1.19
2	6.52	6.49	7.77	1.31	1.23	1.24
3	6.46	7.04	5.81	1.28	1.36	1.36
ค่าเฉลี่ย	6.45	6.64	6.72	1.29	1.29	1.26

ตารางที่ 8 ผลการศึกษาความทนของวิธีวิเคราะห์ เมื่อเปลี่ยนอุณหภูมิของคอลัมน์จากเดิม 30 องศาเซลเซียส เป็น 25 องศาเซลเซียส

ครั้งที่	ปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวม		ปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระ	
	30 องศาเซลเซียส	25 องศาเซลเซียส	30 องศาเซลเซียส	25 องศาเซลเซียส
1	6.37	5.97	1.29	1.39
2	6.52	6.16	1.31	1.36
3	6.46	6.45	1.28	1.42
ค่าเฉลี่ย	6.45	6.19	1.29	1.39

เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยสถิติ Independent Sample T-test พบว่าปริมาณโพสแซคคาไรด์รวมมีค่า Sig เท่ากับ 0.154 ซึ่งมากกว่า 0.05 แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 แต่ปริมาณโพสแซคคาไรด์อิสระมีค่า Sig เท่ากับ 0.008 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

การทดสอบความทนของวิธี เมื่อเปลี่ยนระยะเวลาการย่อยด้วยกรดจากเดิม 2 ชั่วโมง เป็น 1.30 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง จำนวน 3 ซ้ำ พบว่าปริมาณโพสแซคคาไรด์รวมมีค่าเฉลี่ย 6.45 และ 3.54 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และปริมาณโพสแซคคาไรด์อิสระมีค่าเฉลี่ย 1.29 และ 1.27 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ผลการศึกษาความทนของวิธีวิเคราะห์ เมื่อเปลี่ยนระยะเวลาการย่อยด้วยกรดจากเดิม 2 ชั่วโมง เป็น 1.30 ชั่วโมง

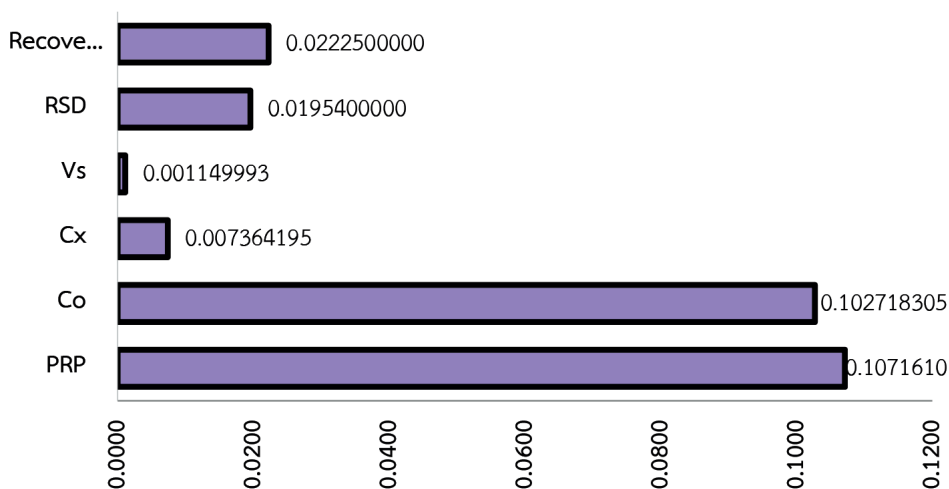
ครั้งที่	ปริมาณโพสแซคคาไรด์รวม		ปริมาณโพสแซคคาไรด์อิสระ	
	2 ชั่วโมง	1.30 ชั่วโมง	2 ชั่วโมง	1.30 ชั่วโมง
1	6.37	3.71	1.29	1.26
2	6.52	3.51	1.31	1.30
3	6.46	3.40	1.28	1.24
ค่าเฉลี่ย	6.45	3.54	1.29	1.27

เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยสถิติ Independent Sample T-test พบว่าปริมาณโพสแซคคาไรด์รวมมีค่า Sig เท่ากับ 0.000 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 แต่ปริมาณโพสแซคคาไรด์อิสระมีค่า Sig เท่ากับ 0.248 ซึ่งมากกว่า 0.05 แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

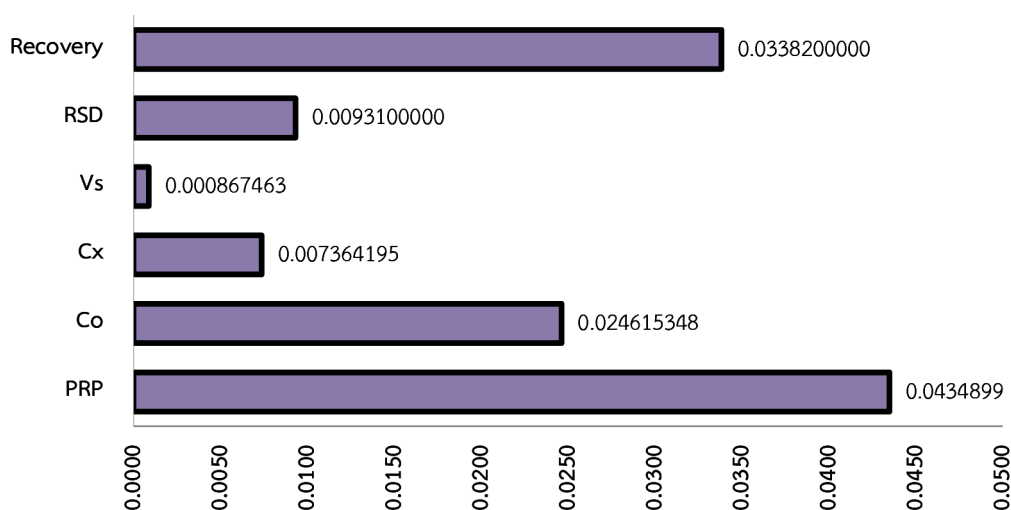
การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Estimation of Measurement Uncertainty)

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์แสดงให้เห็นถึงสายโซ่การสอบกลับได้ของการวัด โดยพิจารณาแหล่งความไม่แน่นอนที่จะมีผลกระทบ

ต่อการตรวจวิเคราะห์ ได้แก่ ความไม่แน่นอนจากความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน การสอบเทียบเครื่องมือ ความเข้มข้นของตัวอย่างที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน ความเที่ยงของวิธีเมื่อทำซ้ำ และค่าร้อยละการคืนกลับของการทดสอบความถูกต้องของวิธี นำมาคำนวณค่าความไม่แน่นอนรวม (Combined Uncertainty; uc) และค่าความไม่แน่นอนขยาย (Expanded Uncertainty; U) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ค่า Coverage Factor (k) เท่ากับ 2 ได้ค่า U ของปริมาณโพสแซคคาไรด์รวมเท่ากับ 2.99 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ U ของปริมาณโพสแซคคาไรด์อิสระเท่ากับ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในภาพที่ 5 และ 6



ภาพที่ 5 องค์ประกอบแหล่งความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวมที่ตรวจโดยวิธี HPAEC-PAD



ภาพที่ 6 องค์ประกอบแหล่งความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระที่ตรวจโดยวิธี HPAEC-PAD

หมายเหตุ: Recovery = ค่าร้อยละการคืนกลับของการทดสอบความถูกต้องของวิธี
RSD = ความเที่ยงของวิธีเมื่อทำซ้ำ
Vs = ปริมาตรของตัวอย่าง
Cx = ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน
Co = ความเข้มข้นของตัวอย่างที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน
PRP = ความเข้มข้นของตัวอย่างที่รายงาน

วิจารณ์

การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธี HPAEC-PAD ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโพลีแซคคาไรด์รวมและปริมาณโพลีแซคคาไรด์อิสระในวัคซีนฮิบเพื่อนำมาใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพ สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สำหรับตรวจสอบคุณภาพวัคซีนที่มีวัคซีนฮิบเป็นส่วนประกอบ ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธี พบว่าเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด แสดงว่าวิธีมีความเหมาะสมถูกต้อง แม่นยำ และเชื่อถือได้ นอกจากนี้ได้ทำการทดสอบความคงทนของวิธี จำนวน 3 ตัวแปร ประกอบด้วย อายุของสารตัวพา อุณหภูมิของคอลัมน์ และระยะเวลาการย่อยด้วยกรด เพื่อบ่งชี้ว่าเมื่อทั้ง 3 ตัวแปร มีการเปลี่ยนแปลงไปจะส่งผลต่อการตรวจวิเคราะห์หรือไม่ จากผลการทดสอบพบว่าระยะเวลาการย่อยด้วยกรด และอุณหภูมิคอลัมน์มีผลต่อการวิเคราะห์ แสดงว่าทั้ง 2 ตัวแปรเป็นจุดวิกฤติของวิธี ผู้ทำการวิเคราะห์ต้องใส่ใจระมัดระวังและควบคุมการตรวจวิเคราะห์อย่างใกล้ชิด เนื่องจากระยะเวลาการย่อยด้วยกรดมีผลต่อการสลายสายโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ *Haemophilus influenzae* type b ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนของวัคซีนให้แยกส่วน ribitol ที่อยู่ในสายโพลีแซคคาไรด์ให้เป็นอิสระก่อนที่จะนำมาผ่านคอลัมน์เพื่อตรวจวัด หากใช้ระยะเวลาไม่เหมาะสมจะทำให้พีคของโครมาโตแกรมที่แสดงออกมาไม่ปรากฏเป็นพีคเดี่ยว ทำให้ไม่สามารถคำนวณพีคของตัวอย่างเทียบกับพีคของสารมาตรฐานได้ นอกจากนี้เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิคอลัมน์ จะทำให้ผลการวิเคราะห์เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม เนื่องจากอุณหภูมิคอลัมน์มีผลต่อประสิทธิภาพในการแยกสาร ซึ่งจะทำให้การแยกสารไม่มีความเสถียรและสม่ำเสมอ เมื่อเปรียบเทียบวิธี HPAEC-PAD ที่ทำการพัฒนานี้กับวิธีตรวจปริมาณโพลีแซคคาไรด์ในวัคซีนฮิบวิธีอื่น เช่น การตรวจหาปริมาณ ribose ด้วย Bial's reaction หรือ orcinol test⁽¹⁵⁾ หรือตรวจปริมาณฟอสฟอรัสด้วย Chen method⁽¹⁶⁾ แล้วคำนวณเป็นปริมาณโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งเป็นวิธีตรวจทางเคมีที่เคยใช้ทดสอบกับวัคซีนฮิบในอดีต พบว่าวิธีดังกล่าวมักได้ค่าที่เบี่ยงเบนสูงแม้ทำการวิเคราะห์ในตัวอย่างเดียวกันและไม่สามารถตรวจ

กับวัคซีนที่อยู่ในรูปวัคซีนรวมได้ในขณะที่วิธี HPAEC-PAD ให้ผลวิเคราะห์ที่มีความแม่นยำ ถูกต้องสูงกว่าสามารถใช้กับวัคซีนที่เป็นวัคซีนรวมได้^(11,12,17) สำหรับเทคนิคการตรวจแบบ ELISA มีข้อดี คือ ความจำเพาะของการจับระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีสามารถลดการรบกวนจากสารผสมอื่น แต่วิธี ELISA ยังมีข้อจำกัด เนื่องจากต้องใช้สารแอนติเจนและแอนติบอดีหลากหลายที่จำเพาะกับวัคซีนแต่ละบริษัท⁽¹⁷⁾ ดังนั้นวิธี HPAEC-PAD ที่พัฒนาขึ้น และได้ทดสอบความถูกต้องของวิธีแล้ว จึงตอบโจทย์การนำไปใช้ได้ดี นอกจากใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโพลีแซคคาไรด์ของวัคซีนฮิบแล้ว ยังสามารถนำไปเป็นแนวทางปรับใช้การพัฒนาวิธีตรวจหาปริมาณโพลีแซคคาไรด์ในวัคซีนโพลีแซคคาไรด์ชนิดอื่นเพื่อการควบคุมคุณภาพ เช่น วัคซีนไขไทฟอยด์⁽¹⁸⁾ วัคซีนป้องกันโรคไข้กาฬหลังแอ่นได้⁽¹⁹⁻²¹⁾ จึงเป็นการเพิ่มศักยภาพของห้องปฏิบัติการสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในการคุ้มครองผู้บริโภคด้านวัคซีนให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น อย่างไรก็ตาม ยังมีข้อจำกัดเกี่ยวกับตัวอย่าง คือ หลังจากพัฒนาวิธีแล้วเสร็จ ยังไม่มีตัวอย่างวัคซีนจริง ส่งตรวจวิเคราะห์ ดังนั้นจึงจะรวบรวมตัวอย่าง เพื่อนำมาตรวจวิเคราะห์ต่อไป หากได้ผลตามเกณฑ์จะได้กำหนดเป็นวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการต่อไป

สรุป

สถานะที่ระบุในงานวิจัยครั้งนี้มีความเหมาะสม และผลการทดสอบความถูกต้องของวิธี HPAEC-PAD ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโพลีแซคคาไรด์ในวัคซีนฮิบพบว่าอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานในทุกหัวข้อ แสดงว่าวิธี HPAEC-PAD มีความเหมาะสม ถูกต้อง แม่นยำ เชื่อถือได้ ทั้งนี้วิธีที่พัฒนาในครั้งนี้ได้เปิดให้บริการตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2566⁽²²⁾ เพื่อจะทำให้ผู้บริโภคได้รับวัคซีนที่มีฮิบเป็นส่วนประกอบที่มีคุณภาพ เป็นไปตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์และมาตรฐานสากลในการป้องกันโรคได้ และวิธีนี้สามารถพัฒนาต่อยอดในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโพลีแซคคาไรด์ของวัคซีนโพลีแซคคาไรด์ชนิดอื่นต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณบริษัท ซาโนฟี ปาสเตอร์ จำกัด บริษัท
ไบโอวาเลียส จำกัด และบริษัท มาสุ จำกัด ที่ให้ความ
อนุเคราะห์ตัวอย่างวัคซีน สำหรับนำมาใช้ในการพัฒนา
และทดสอบความถูกต้องของวิธี และขอบคุณองค์การ
อนามัยโลกที่สนับสนุนองค์ความรู้ที่ใช้ในการวิเคราะห์
ปริมาณโพลีแซคคาไรด์ในวัคซีนฮิบ โดย HPAEC-PAD
ครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. อัจฉรา ตั้งสถาพรพงษ์. วัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อฮิบ.
[ออนไลน์]. [สืบค้น 4 ก.ค. 2567]; [10 หน้า]. เข้าถึง
ได้จาก: URL: http://pidst.or.th/userfiles/33_วัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อฮิบ.pdf
2. Muangchana C, Chunsuttiwat S, Rerks-Ngarm S, Kunasol P. Bacterial meningitis incidence in Thai children estimated by a rapid assessment tool (RAT). *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2009; 40(3): 553-62.
3. World Health Organization. *Haemophilus influenzae* type b (Hib). [online]. [cited 2024 Jul 2]. Available from: URL: <https://www.who.int/teams/health-product-policy-and-standards/standards-and-specifications/norms-and-standards/vaccine-standardization/hib>
4. Zarei AE, Almeshdar HA, Redwan EM. Hib vaccines: past, present, and future perspectives. *J Immunol Res*. [online]. 2016; [cited 2024 Jul 10]; [18 screens]. Available from: URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2016/7203587>
5. กองโรคป้องกันด้วยวัคซีน กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. ตำราวัคซีนและสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรค ปี 2562. [ออนไลน์]. [สืบค้น 4 ก.ค. 2567]. เข้าถึงได้จาก URL: <https://ddc.moph.go.th/uploads/publish/938420191209023015.pdf>
6. World Health Organization. Recommendations for the production and control of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. WHO Technical Report Series No. 897. [online]. 2000; [cited 2024 Jul 9]; [34 screens]. Available from: URL: <https://www.who.int/publications/m/item/hib-conjugate-vaccines-annex-1-trs-no-897>
7. Rohrer JS. Vaccine quality ensured by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *SLAS Technol* 2020; 25(4): 320-8.
8. NIBSC. *Haemophilus Influenzae* polysaccharide polyribosyl ribitol phosphate (PRP) (2nd International Standard). [online]. 2024; [cited 2024 Jul 8]. Available from: URL: https://nibsc.org/products/brm_product_catalogue/detail_page.aspx?catid=12/306
9. Sigma-aldrich. Adonitol. [online]. 2024; [cited 2024 Jul 8]. Available from: URL: <https://www.sigmaaldrich.com/TH/en/product/sigma/a5502>
10. Roskopf U, Daas A, Terao E, von Hunolstein C. Collaborative study on saccharide quantification of the *Haemophilus influenzae* type b component in liquid vaccine presentations. *Pharmeur Bio Sci Notes* 2017; 2017: 44-68.
11. Jing T, Dan Z, Hong L, Ya-nan L, Mao-guang L, Cui-ping C, et al. Determination of polysaccharide and free polysaccharide contents of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine by high performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Chin J Pharm Anal* 2016; 36(10): 1804-9.
12. Bardotti A, Ravenscroft N, Ricci S, D'Ascenzi S, Guarnieri V, Averani G, et.al. Quantitative determination of saccharide in *Haemophilus influenzae* type b glycoconjugate vaccines, alone and in combination with DPT, by use of high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Vaccine* 2000; 18(19): 1982-93.
13. ICH. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). Paper presented at International Conference on Harmonization

- of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Current Step 4 version. [online]. 2005; [cited 2024 Jun 27]; [17 screens]. Available from: URL: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>
14. ทิพวรรณ นิ่งน้อย. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว: คุณลักษณะเฉพาะของวิธีวิเคราะห์ การหาและการประเมิน การยอมรับ. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549. หน้า 39-86.
 15. Dische Z, Schwarz K. Microchemical method for the determination of different pentoses in the presence of other pentoses and hexoses. *Mikrochem Acta* 1937; 2: 13-8.
 16. Chen PS, Toribara TY, Warner H. Microdetermination of phosphorus. *Anal Chem* 1956; 28 (11): 1756-8.
 17. วิริยามาตย์ เจริญคุณธรรม, ชลดา เพ็ชรไทย, กนกพร ฤทธิธรรม, สุภาพร ภูมิอมร. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี High performance anion exchange chromatography with pulse amperometric detection ในการวิเคราะห์ปริมาณแอนติเจนของวัคซีนป้องกันโรคจากเชื้อ *Haemophilus influenzae* type b. ว วิชาการสาธารณสุข 2562; 28(3): 561-72.
 18. Giannelli C, Cappelletti E, Di Benedetto R, Pippi F, Arcuri M, Di Cioccio V, et al. Determination of free polysaccharide in Vi glycoconjugate vaccine against typhoid fever. *J Pharm Biomed Anal* 2017; 139: 143-7.
 19. Gao F, Beresford N, Lockyer K, Burkin K, Rigsby P, Bolgiano B. Saccharide dosage content of meningococcal polysaccharide conjugate vaccines determined using WHO international standards for serogroup A, C, W, Y and X polysaccharides. *Biologicals* 2021; 70: 53-8.
 20. Cook MC, Gibeault S, Filippenko V, Ye Q, Wang J, Kunkel JP. Serogroup quantitation of multivalent polysaccharide and polysaccharide-conjugate meningococcal vaccines from China. *Biologicals* 2013; 41(4): 261-8.
 21. Gudlavalleti SK, Crawford EN, Harder JD, Reddy JR. Quantification of each serogroup polysaccharide of *Neisseria meningitidis* in A/C/Y/W-135-DT conjugate vaccine by high-performance anion-exchange chromatography-pulsed amperometric detection analysis. *Analytical Chem* 2014; 86(11): 5383-90.
 22. ความแรงวัคซีนป้องกันโรคเชื้อหุ้มสมองอักเสบจากเชื้อฮิบ (*Haemophilus influenzae* type B; Hib). ใน: ระเบียบกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ว่าด้วยอัตราค่าบำรุงการตรวจวิเคราะห์และให้บริการ ฉบับใช้พลางก่อน (2 พ.ย. 2566). [ออนไลน์]. 2566; [สืบค้น 26 ก.ย. 2567]. เข้าถึงได้จาก: URL: <https://service.dmsc.moph.go.th/dmscservice>

Method Development and Validation for Determination of Total and Free Polysaccharide Content in *Haemophilus influenzae* Type B Vaccine by HPAEC-PAD

Chonlada Petthai, Kanokphon Loamarintchai, Katsama Boonmak,
Apichai Supasansatorn, and Supaporn Phumiamorn

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

ABSTRACT The *Haemophilus influenzae* type b (Hib) vaccine is used to prevent meningitis and pneumonia in young children. It is produced from the polysaccharide component of *Haemophilus influenzae* type b. In the quality control of the Hib vaccine, determining the total and free polysaccharide contents is a crucial parameter, and the World Health Organization (WHO) recommends using the HPAEC-PAD method for analysis due to its accuracy and precision, which is well-suited for detecting polysaccharides. This study, the method involved using an anion exchange column with a column temperature of 30°C, a mobile phase of 580 mM NaOH, a flow rate of 0.4 mL/min, and an injection volume of 50 µL. Detection was performed using a PAD detector. The results showed that the standard curve was linear in the concentration range from 0.15 to 10.50 µg/mL, with a correlation coefficient of 0.9999. The precision on the same day showed the relative standard deviations for total and free polysaccharide contents of 3.38% and 1.61%, respectively, while intermediate precision showed the relative standard deviations of 4.47% and 3.22%, respectively. The method was accurate, with the recovery of standard substances added to the DTP-HB-Hib combined vaccine ranging between 96.74% and 103.37%. The method demonstrated specificity and capability of analyzing polysaccharide content in the vaccine from 0.15 µg/mL. Additionally, column temperature and acid hydrolysis duration were found to affect the analysis. In conclusion, this method can be used as an analytical method in the laboratory of the Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Thailand for the Hib vaccine quality control purposes.

Keywords: The *Haemophilus influenzae* type b vaccine, Polysaccharide content, HPAEC-PAD, Method validation

Efficiency of an Ultrasonic Device in Eliminating *Aedes aegypti* Larvae and Pupae under Laboratory Conditions

Anupong Sukjai¹, Wannapha Thongmo¹, Kornthong Weangkaew¹, Wasin Tepnow¹, Chatsuda Latsungnoen¹, Chanchai Thongsopa², and Taweechai Wisanuyothin¹

¹Office of Disease Prevention and Control 9 Nakhon Ratchasima, Department of Disease Control, Muang District, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

²School of Electronic Engineering, Institute of Engineering, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

ABSTRACT *Aedes aegypti* mosquitoes, which are responsible for mosquito-borne diseases, cause a major public health challenge in Thailand. The Office of Disease Prevention and Control Region 9, Nakhon Ratchasima, in collaboration with Suranaree University of Technology, Thailand developed an ultrasonic wave generator named “SONiC BOOM” for mosquito management. This study aimed to evaluate the effectiveness of this device in controlling mosquito larvae and pupae under laboratory-controlled conditions. Mosquito larvae (n = 50) and pupae (n = 50) were tested in 20-liter containers in an entomological laboratory. The study included control and test groups exposed to 40 KHz ultrasonic waves for 3 seconds at five different points in the water. Percent mortality was recorded at 5 min and 24 hr post-exposure, and statistical analysis evaluated for significant differences. The results indicated that larval mortality was not different between 5 min and 24 hr post-exposure. The pupal stage showed a substantial difference in mortality between these time points. There was a significant difference in mortality ($p < 0.05$) between the group exposed to ultrasonic waves and the control group. Initial mortalities after 5 min exposure were 96.0% for larvae and 64.0% for pupae. After 24 hr, mortalities increased to 97.6% for larvae and 100% for pupae. Ultrasonic waves caused rupture of mosquito larvae and pupae’s tissues or internal organs, leading to their death. Thus, “SONiC BOOM” is an efficient alternative tool for controlling mosquito larvae and pupae without chemicals, having minimal environmental impact. The device can be further developed and used in areas affected by future disease outbreaks.

Keywords: *Aedes* mosquito, Larva and pupa elimination, Ultrasonic

Corresponding author E-mail: sanupongia@gmail.com

Received: 9 August 2024

Revised: 9 January 2025

Accepted: 13 January 2025

Introduction

Mosquito-borne diseases, especially those transmitted by *Aedes aegypti* mosquitoes such as dengue hemorrhagic fever (DHF), Zika, and chikungunya, pose a severe threat to global health. These diseases infect hundreds of millions of populations annually, placing immense pressure on healthcare systems, particularly in tropical and subtropical regions. Factors like rapid urbanization and climate change are expanding the habitat of *Ae. aegypti*, facilitating the spread of these viruses. The absence of effective vaccines for these diseases intensifies their impacts, emphasizing the urgent need for improved vector control measures and strengthened public health strategies.⁽¹⁾ In Thailand, *Ae. aegypti* mosquitoes are the primary vectors responsible for dengue, Zika, and chikungunya diseases. The high prevalence of these diseases poses a significant public health challenge, particularly during the rainy season when mosquito populations surge. Controlling mosquito breeding sites is crucial, but insecticide resistance complicates eradication efforts.⁽²⁾ Although chemical pesticides are frequently employed to control mosquito populations, they pose risks to human health, non-target organisms, and the environment. Widespread use of chemicals can also lead to contamination of water sources and soil, affecting local ecosystems or the environment and potentially harming beneficial species.⁽³⁾ Additionally, these uses have accelerated the development of pesticide resistance, reducing the long-term effectiveness of these chemicals. This resistance makes outbreaks harder to manage. As a result, there is a growing need to explore alternative methods, such as biological control and

community-based strategies, to achieve sustainable mosquito management.⁽⁴⁾ To address these challenges, incorporating other safer technologies into the management of mosquito larvae and adults presents alternatives that reduce environmental and health risks. Moreover, the technologies not only minimize ecological impact but also engage communities in proactive mosquito control efforts, fostering a collaborative approach to public health.⁽⁵⁾ Until now, few studies have investigated the larvicidal effectiveness of ultrasonic devices versus larvae of mosquitoes. Nowadays, the Larvasonic™ Field Arm Mobile Wetlands Unit and SD-Mini are efficient against mosquitoes in the genus *Culex*, according to research conducted in the USA.⁽⁶⁾ Additionally, the Larvasonic SD-Mini Acoustic Larvicide device proved successful in controlling immature *Ae. aegypti* in various volumes typical of peri-domestic water containers.⁽⁷⁾ Mosquito-borne diseases remain significant public health concerns in Thailand, augmenting a large number of deaths annually. DHF is particularly severe, impacting approximately 100,000 individuals in Thailand every 2 to 3 years.⁽⁸⁾ The seasonal and geographical patterns of mosquito-borne illnesses underscore the need for sustained vector control efforts and enhanced public health infrastructure. Furthermore, climate change influences mosquito behavior and disease transmission dynamics, necessitating adaptive strategies to mitigate future risks effectively. The utilization of the Perseus ultrasonic device in Thailand demonstrates a promising approach to controlling mosquito larvae and pupae, specifically targeting *Ae. aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (a vector for filariasis).⁽⁸⁾ With the rapid spread of

mosquito-borne diseases and rising resistance to traditional chemical pesticides, there is an urgent need for innovative alternatives.^(9,10) Effective vector control can drastically reduce transmission rates, lowering disease burden in affected regions. Hence, the objective of this research is to evaluate the effectiveness of the ultrasonic wave generator “SONiC BOOM” in controlling mosquito larvae and pupae under laboratory-controlled conditions.

Materials and Methods

Mosquito rearing

Ae. aegypti immature stages were produced by hatching mosquito eggs at the Entomological Laboratory (ISO/IEC 17025:2017), the Center for Vector-Borne Disease Control 9.2 in Buri Ram, Office of Disease Prevention and Control Region 9 Nakhon Ratchasima, Department of Disease Control, Thailand. Eggs of *Ae. aegypti*, sourced from Department of Medical Sciences, Thailand, were placed in 1 liter of chlorine-free water in a plastic tray (18 cm length × 13 cm width × 4 cm depth) and incubated for approximately 24 hr. The larvae of mosquitoes were reared at a temperature of $27 \pm 2^\circ\text{C}$ with over 40% relative humidity and a 12:12 light-dark cycle. After hatching, the larvae were fed daily with finely powdered pig feed until they developed into fully grown larvae (larval stages 3–4), typically within 7–9 days, at which point they entered the pupal stage. Both larvae and pupae used in this study were of a susceptible strain to chemical insecticides that were reared in the laboratory for over five generations.

Guppy fish

Adult guppy fish (*Poecilia reticulata*) which is one of the non-target aquatic organisms were collected and selected from ponds near the Entomological Laboratory. The adult guppies were also evaluated for any adverse effects resulting from exposure to ultrasonic waves.

Ultrasonic wave generator

The SONiC BOOM device was developed by Center of Excellence in Electromagnetic Wave, Suranaree University of Technology, Thailand, in collaboration with Office of Disease Prevention and Control Region 9 Nakhon Ratchasima, Department of Disease Control, as an ultrasonic tool to eliminate immature mosquito stages in water under laboratory-controlled conditions. An ultrasonic transducer device called SONiC BOOM operates at a frequency of 40 KHz and outputs 100 W using piezoceramic transducer elements. The specifications of this device include input DC12.6V, 3A, power 100W, frequency 40KHz, battery Li-ion 12V, 15Ah, and power switch, with a size of 15.4 cm length × 10.3 cm width × 20.3 cm height and weighing approximately 3 kg. A 7-cm-diameter, 6.3-cm-long ultrasonic transducer probe is connected via a 2-meter cable to the control unit, which includes a control button (Figure 1). Press the button to activate the transmission of a 40 KHz frequency signal to the transducer probe, which generates fine bubbles in the water.

Effectiveness of ultrasonic treatment under controlled laboratory conditions

Experiments were conducted in earthen jars at the Entomological Laboratory. Each jar



Figure 1 The ultrasonic wave generator named “SONiC BOOM”

of 30 cm diameter, containing 20 liters of water at a height of 22.5 cm, was added 50 larvae and 50 pupae of *Ae. aegypti*. The SONiC BOOM transducer probe was submerged under water and operated within a 10–15 cm range around the larvae and pupae. The probe was activated for 3 seconds per area and repeated 5 times to ensure water surface coverage. The mortality of larvae and pupae was observed at the 5 min and 24 hr time points post-exposure. Control groups, consisting of larvae ($n = 50$) and pupae ($n = 50$) not exposed to ultrasonic waves, were included for comparison in each experiment. Each experiment was independently replicated three times using new batches of larvae and pupae, and each repeat was conducted at the same time of the day. Dead larvae and pupae were examined under a stereo microscope (C-LEDS, Nikon, China) to confirm rupture of the exoskeleton. The experiment was conducted for approximately two months. Additionally, 50 guppy fish (*P. reticulata*), were tested under similar conditions of exposure and timing as *Ae. aegypti* groups.

Statistical analysis

Mortality data were analyzed using descriptive statistics, including mean and standard deviation, with GraphPad Prism software version 8. Mortality percentages were examined through one-way analysis of variance (ANOVA). To compare the mean mortalities among various mosquito groups, a post-hoc analysis using Duncan’s multiple range test was conducted. Additionally, t-tests were utilized to compare mean mortalities across different treatment periods. A p -value of less than 0.05 was considered statistically significant for all comparisons.

Results

Results of the SONiC BOOM treatment are shown in Table 1, presenting the percent mortality of dead *Ae. aegypti* mosquitoes with the ultrasonic wave set to 40 KHz and positioned 10–15 cm from the probe. Within five minutes of exposure, the ultrasonic wave achieved 96.0% mortality in larvae and 64.0% in pupae.

Table 1 Percent mortality of *Ae. aegypti* larvae and pupae and guppy fish after exposure to SONiC BOOM for 5 min and 24 hr.

No. of Replica- tion	Percent mortality of <i>Ae. aegypti</i> and guppy fish after exposure to SONiC BOOM																	
	5 minutes									24 hours								
	larvae			pupae			Guppy fish			larvae			pupae			Guppy fish		
1	92	94	100	100	86	90	0	0	0	84	100	100	100	100	100	0	0	0
2	100	96	96	30	68	56	0	0	0	98	98	98	100	100	100	2	0	4
3	96	90	100	54	36	56	0	0	0	100	100	100	100	100	100	6	4	4

By 24 hr post-exposure, mortality increased to 97.6% in larvae and reached 100% in pupae. No significant difference in larval mortality was observed between the 5 min and 24 hr time points, whereas pupal mortality showed a significant increase ($p < 0.01$). Percent mortality was also assessed in guppy fish (*P. reticulata*), with no significant difference between the 5 min and 24 hr post-exposure periods (Figure 2).

At 5 min post-exposure, there was a significant difference in larval percent mortality between the control group (non-exposure) and the treated group ($p < 0.0001$). Additionally, the percent mortality of pupae showed a significant difference between the control group and the treated group ($p < 0.01$) (Figure 3).

At 24 hr post-exposure, there was a significant difference in larval percent mortality between the control group and the treated group ($p < 0.001$). Additionally, the percent mortality of pupae showed a significant difference between the control group and the treated group ($p < 0.0001$) (Figure 4).

No mortality was observed in the control group of mosquito larvae, as they were not treated. The immature *Ae. aegypti* mosquitoes killed with SONiC BOOM treatment were shown in Figure 5. The mortality of fourth

instar larvae caused by the SONiC BOOM device was likely attributed to high-frequency sound energy transmitted through the water. This ultrasonic wave caused ruptures in the tissues or internal organs of the mosquito larvae, resulting in significant damage and death, as observed under a stereo microscope (C-LEDS, Nikon, China). However, tissue ruptures were not observed in the pupae. The pupae were unable to move and develop into adult mosquitoes.

Discussion

In this study, we evaluated the effectiveness of the device of SONiC BOOM in eliminating mosquito larvae and pupae under entomological laboratory-controlled conditions. The mosquitoes used in this study were a susceptible strain of *Ae. aegypti*, specifically reared in the laboratory for over five generations to ensure consistent susceptibility to chemical insecticides as the baseline mosquitoes. Rearing conditions included regulated temperature, humidity, and a consistent light-dark cycle, which supported standardized development stages and minimized external variability across experimental repeats. In our study, the SONiC BOOM effectively killed immature stages of *Ae. aegypti* mosquitoes of larvae and

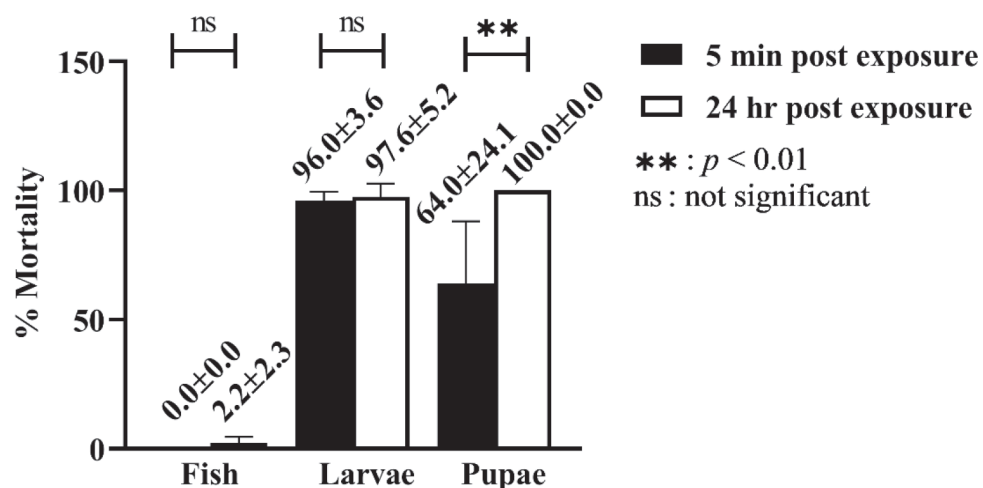


Figure 2 Average percent mortality ($\pm$ SD) of *Ae. aegypti* larvae and pupae and guppy fish between 5 min and 24 hr post-exposure to SONiC BOOM

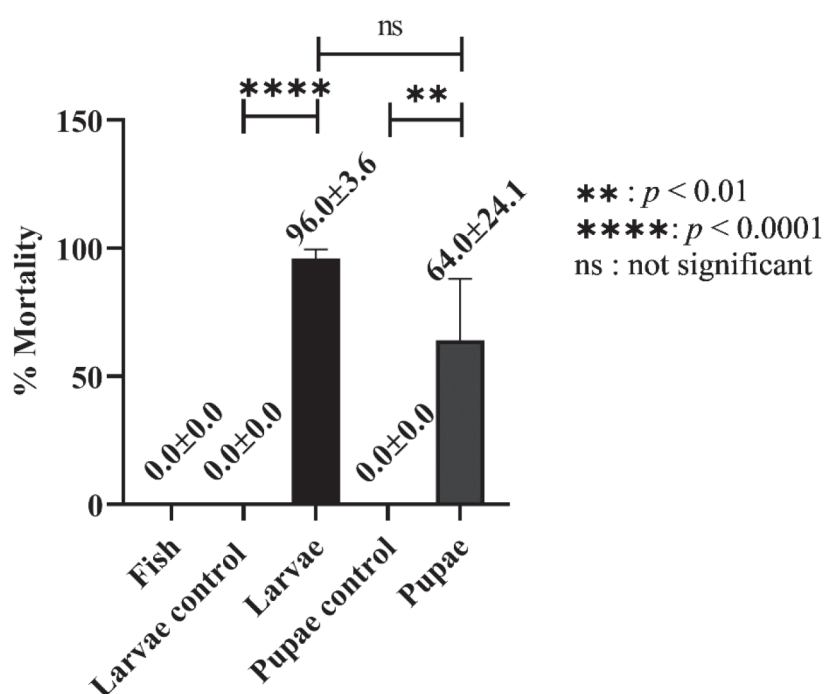


Figure 3 Average percent mortality ($\pm$ SD) of *Ae. aegypti* larvae and pupae and guppy fish at 5 min post-exposure compared to their respective controls (non-exposure).

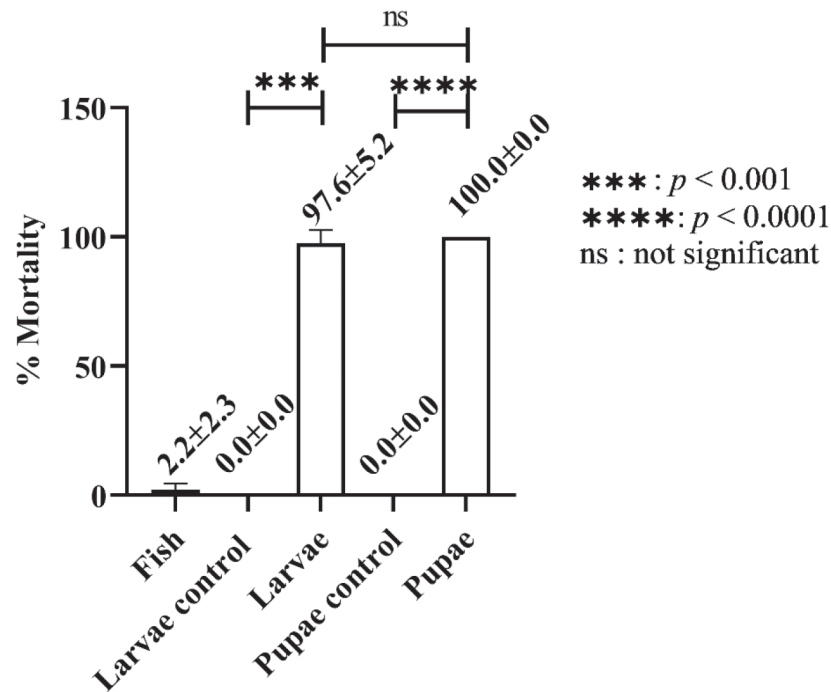


Figure 4 Average percent mortality (±SD) of *Ae. aegypti* larvae and pupae and guppy fish at 24 hr post-exposure compared to their respective controls (non-exposure).

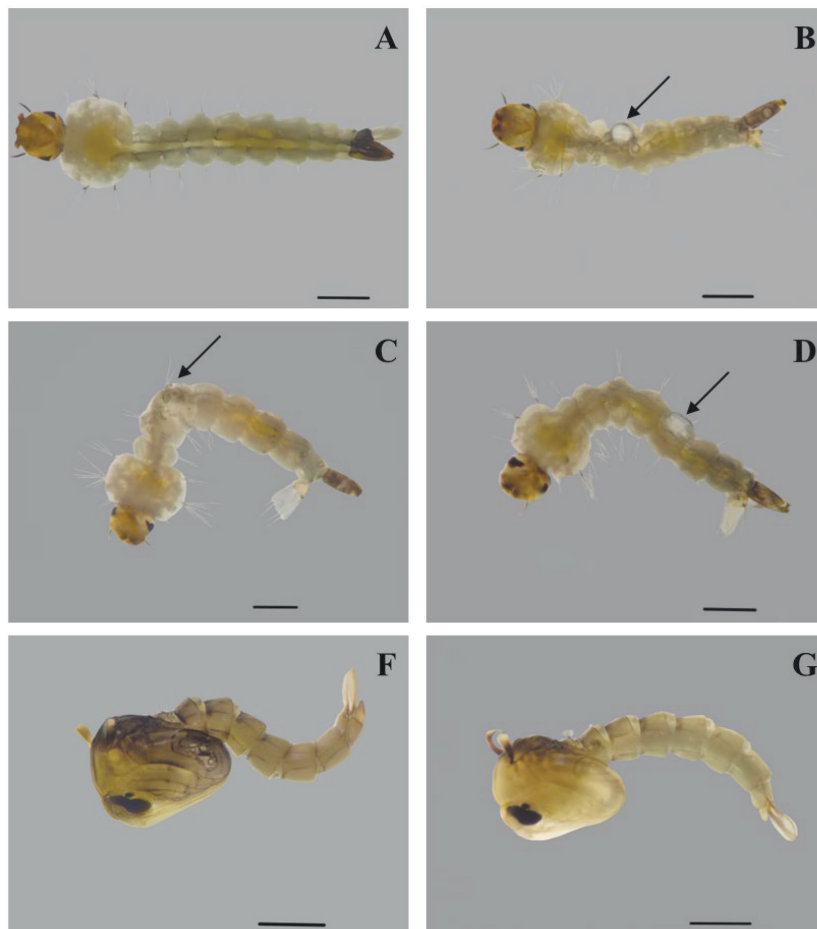


Figure 5 Immature *Ae. aegypti* mosquitoes without (A and F) and with (B, C, D, and G) SONiC BOOM treatment. (A–D: IV instar larvae; F–G: pupae; scale bars = 1 mm).

pupae. The observed mortality in *Ae. aegypti* larvae exposed to the device is likely due to the transmission of high-frequency sound energy into the water⁽¹¹⁾, with morphological analyses, it caused ruptures in the dorsal tracheal trunk of the larvae and damaged the internal organs of mosquito pupae leading to severe tissue damage and eventual death. The results strongly supported our hypothesis that the acoustic energy generated by the transducer underwater effectively caused fractures in the tracheal trunks of this mosquito species. This phenomenon results in the rupturing of the dorsal tracheal trunk in young mosquito instars, causing significant tissue damage and eventual death.⁽¹¹⁾ In principle, the internal organs of mosquito larvae and pupae including a small air bladder can emit sound resonance, especially when underwater bubbles are present. Therefore, studying to further understand the resonance characteristics could aid in developing novel pest control strategies that leverage acoustic waves. Exposure to specific ultrasonic frequencies induces embolism, resulting in the destruction of surrounding tissues and effectively eliminating mosquito larvae and pupae.⁽⁸⁾

In this study, the device was demonstrated to kill both larvae and pupae within a brief 5 min timeframe when utilized at a proximity of 10–15 cm. Tawatsin and colleagues⁽⁸⁾ reported that the optimal distance and exposure time for the ultrasonic transducer probe (operating between 18–36 KHz) were 5–10 cm and 60 seconds. It also showed 100% mortality of mosquito larvae and pupae, with no adverse effects observed in guppy fish (*P. reticulata*), which is an organism utilized in biological control targeting *Ae. aegypti* and other mosquito species.

Effective operation of the ultrasonic transducer requires precise positioning towards targeted larvae and pupae within water containers, therefore, it needs to focus on adjusting for optimal performance. However, the device exhibits certain limitations, such as the unidirectional release of waves from the transducer probe, following a straight line without radial dispersion. Another constraint is the limited exposure duration of the control button, lasting only 3–5 seconds. This led to a significant limitation as prolonged exposure times indicated increased cumulative effects, influencing control efficiency.⁽¹¹⁾ Remarkably, this device offers a pesticide-free finding ideal for use in household water containers or portable water storage. Moreover, since it is a chemical-free method, it may exhibit efficacy against mosquito larvae and pupae resistant to traditional insecticides. This is particularly important because populations of both *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* in many parts of Thailand have developed widespread resistance to several insecticides, especially those in the pyrethroid category.^(12,13) This kind of device may be superior to larvicides or thermal fogging with adulticides which decreases both water and air pollution. The results indicate that ultrasonic wave devices could be a practical alternative technology for mosquito management.

Conclusively, the findings highlight the potential of ultrasonic treatment as a non-chemical method for mosquito control, offering environmentally friendly. Further studies are needed to optimize parameters such as frequency and intensity to enhance efficacy across diverse mosquito populations and environmental conditions.

Conclusion

This research presented the primary findings obtained from utilizing an ultrasonic sound-based device against *Ae. aegypti* larvae and pupae. The SONiC BOOM ultrasonic device demonstrated high effectiveness in eliminating *Ae. aegypti* larvae and pupae under laboratory-controlled conditions. The findings showed that ultrasonic waves caused significant damage to the tissues or internal organs of mosquito larvae and pupae, leading to their death. Within five minutes of treatment with the SONiC BOOM device, the percent mortality of larvae and pupae reached 96.0% and 64.0%, respectively, increasing to 97.6% and 100% at 24 hr post-treatment. Based on these experiments, the SONiC BOOM device could be a potential practical tool for managing mosquito populations. Moreover, the device could be developed for use in public health interventions and epidemiological areas.

Acknowledgments

The authors would like to express their gratitude to the staff of the Center for Vector-Borne Disease Control 9.2, Buri Ram, and the Office of Disease Prevention and Control Region 9 Nakhon Ratchasima, Department of Disease Control for providing laboratory equipment. Additionally, the authors appreciate the valuable contributions and sincere suggestions from the staff in the Innovation, Research, and Development Sector, Office of Disease Prevention and Control Region 9, Nakhon Ratchasima, and Suranaree University of Technology.

References

1. Mayer SV, Tesh RB, Vasilakis N. The emergence of arthropod-borne viral diseases: a global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. *Acta Trop* 2017; 166: 155–63.
2. Ahebwa A, Hii J, Neoh KB, Chareonviriyaphap T. *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) ecology, biology, behaviour, and implications on arbovirus transmission in Thailand: Review. *One Health* 2023;16:100555. (9 pages).
3. Benelli G. Plant-borne ovicides in the fight against mosquito vectors of medical and veterinary importance: a systematic review. *Parasitol Res* 2015; 114(9): 3201–12.
4. Naqqash MN, Gökçe A, Bakhsh A, Salim M. Insecticide resistance and its molecular basis in urban insect pests. *Parasitol Res* 2016; 115(4): 1363–73.
5. Benelli G. Plant-mediated biosynthesis of nanoparticles as an emerging tool against mosquitoes of medical and veterinary importance: a review. *Parasitol Res* 2016; 115(1): 23–34.
6. Fredregill CL, Motl GC, Dennett JA, Bueno RJ, Debboun M. Efficacy of two larvasonic™ units against *Culex* larvae and effects on common aquatic nontarget organisms in Harris County, Texas. *J Am Mosq Control Assoc* 2015; 31(4): 366–70.
7. Britch SC, Nyberg H, Aldridge RL, Swan T, Linthicum KJ. Acoustic control of mosquito larvae in artificial drinking water containers. *J Am Mosq Control Assoc* 2016; 32(4): 341–4.
8. Tawatsin A, Thavara U, Siriyasatien P, Permpoonburana S. Development of a novel ultrasonic sound-generated device: the physical tool for controlling immature

- stages of mosquitoes transmitting dengue haemorrhagic fever (*Aedes aegypti*) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*). Biomed J Sci & Tech Res 2019; 19(3): 14308-14.
9. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. Nature 2013; 496(7446): 504-7.
 10. Schwab SR, Stone CM, Fonseca DM, Fefferman NH. The importance of being urgent: the impact of surveillance target and scale on mosquito-borne disease control. Epidemics 2018; 23: 55-63.
 11. Kalimuthu K, Tseng LC, Murugan K, Panneerselvam C, Aziz AT, Benelli G, et al. Ultrasonic technology applied against mosquito larvae. Appl Sci 2020; 10: 3546. (15 pages).
 12. Jirakanjanakit N, Rongnoparut P, Saengtharatip S, Chareonviriyaphap T, Duchon S, Bellec C, et al. Insecticide susceptible/resistance status in *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* and *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand during 2003-2005. J Econ Entomol 2007; 100(2): 545-50.
 13. Komalamisra N, Srisawat R, Phanbhuwong T, Oatwaree S. Insecticide susceptibility of the dengue vector, *Aedes aegypti* (L.) in Metropolitan Bangkok. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2011; 42(4): 814-23.

ประสิทธิภาพของเครื่องอัลตราโซนิกในการกำจัด ลูกน้ำและตัวโม่งยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ในห้องปฏิบัติการ

อนุพงศ์ สุขใจ¹ วรรณภา ทองโม้¹ กรณ์ทอง เวียงแก้ว¹ วศิน เทพเนาว์¹ จัตรสุดา ลัดสูงเนิน¹
ชาญชัย ทองโสภณ² และ ทวีชัย วิษณุโยธิน¹

¹สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 9 นครราชสีมา กรมควบคุมโรค อำเภอเมือง นครราชสีมา 30000

²สาขาวิชาวิศวกรรมอิเล็กทรอนิกส์ สำนักวิชาวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา 30000

บทคัดย่อ ยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) เป็นพาหะนำโรคที่เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 9 จังหวัดนครราชสีมา ร่วมกับมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ได้พัฒนาเครื่องกำเนิดอัลตราโซนิก ชื่อ “SONiC BOOM” เพื่อจัดการลูกน้ำและตัวโม่งของยุง การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพของอุปกรณ์ในการควบคุมลูกน้ำและตัวโม่งของยุงภายในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ลูกน้ำยุง จำนวน 50 ตัว และตัวโม่ง จำนวน 50 ตัว ทดสอบในโถงดินขนาด 20 ลิตร ในห้องปฏิบัติการทางกีฏวิทยา แบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ได้รับอัลตราโซนิกที่ความถี่ 40 กิโลเฮิร์ตซ์ ปลอ่ยคลื่อนในบริเวณน้ำ จำนวน 5 จุดๆ ละ 3 วินาที บันทึกเปอร์เซ็นต์การตายหลังจากปลอ่ยคลื่อนไปแล้ว 5 นาที และ 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ ผลการศึกษาพบว่าเปอร์เซ็นต์การตายของลูกน้ำในระยะเวลา 5 นาที และ 24 ชั่วโมง หลังการสัมผัสคลื่อนไม่แตกต่างกัน โดยในตัวโม่งพบเปอร์เซ็นต์การตายมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้เปอร์เซ็นต์การตายระหว่างกลุ่มที่ได้รับอัลตราโซนิกและกลุ่มควบคุมมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยเปอร์เซ็นต์การตายเริ่มต้นของลูกน้ำ เท่ากับ 96.0% และตัวโม่ง เท่ากับ 64.0% และหลังจากได้รับอัลตราโซนิกแล้ว 24 ชั่วโมง พบเปอร์เซ็นต์การตายของลูกน้ำเพิ่มขึ้นเป็น 97.6% และตัวโม่งเป็น 100% โดยอัลตราโซนิกมีผลทำลายเนื้อเยื่อและอวัยวะภายในของลูกน้ำยุง เครื่อง SONiC BOOM จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมลูกน้ำและตัวโม่งของยุงโดยไม่ใช้สารเคมี ทำให้ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อย สามารถนำไปพัฒนาและนำไปใช้ควบคุมโรคในพื้นที่ที่มีการระบาดได้

คำสำคัญ: ยุงลาย, การกำจัดลูกน้ำและตัวโม่ง, อัลตราโซนิก

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะของ ภาพถ่ายเอกซเรย์เต้านม ภาพถ่ายอัลตราซาวด์ และระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคของ มะเร็งท่อน้ำนมในระยะลุกลาม

กนกกร ธิปัตย์¹ นารีรัตน์ อยู่ดี² นนวัชร เบญจกุล^{3,6} สุรรา อิศรไกรศีล⁴ และ ปฐมภรณ์ โมลี^{5,6}

¹ โรงพยาบาลทักษิณ อำเภอเมือง สุราษฎร์ธานี 84000

² โรงพยาบาลเฉพาะทางมะเร็ง วิทยารามอมตะนคร อำเภอเมือง ชลบุรี 20000

³ ภาควิชาพยาธิวิทยาจุลกายวิภาค คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช กรุงเทพมหานคร 10300

⁴ โรงพยาบาลมะเร็งกรุงเทพ วัฒโนสถ เขตห้วยขวาง กรุงเทพมหานคร 10310

⁵ ภาควิชารังสีเทคนิค คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช กรุงเทพมหานคร 10300

⁶ Vajira Pathology-Clinical-Correlation Target Research Interest Group คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช กรุงเทพมหานคร 10300

บทคัดย่อ มะเร็งเต้านมประเภทที่พบบ่อยที่สุด คือ มะเร็งท่อน้ำนมในระยะลุกลาม โดยภาพถ่ายเอกซเรย์เต้านม ภาพถ่ายอัลตราซาวด์ และการตรวจทางจุลกายวิภาค สามารถวินิจฉัยมะเร็งเต้านมได้ตั้งแต่ระยะแรกเริ่ม แต่การรอผลตรวจทางจุลกายวิภาคต้องใช้เวลานาน การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะของภาพถ่ายเอกซเรย์เต้านม ภาพถ่ายอัลตราซาวด์ และระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคของมะเร็งท่อน้ำนมในระยะลุกลามเพื่อใช้ในการพยากรณ์โรค โดยบันทึกข้อมูลผู้ป่วยหญิง 100 ราย ที่เข้ารับการเอกซเรย์เต้านมและอัลตราซาวด์ ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2563 ถึง กรกฎาคม พ.ศ. 2565 โดยมีผลยืนยันว่าเป็นมะเร็งท่อน้ำนมในระยะลุกลาม ผลการศึกษาพบว่ามีความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 1 ร้อยละ 8, ระดับ 2 ร้อยละ 55 และระดับ 3 ร้อยละ 37 เมื่อวิเคราะห์ด้วย Chi-square test พบว่าผู้ที่มีระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาค ระดับ 1 มีขอบเขตก้อนแบบ Spiculated และ Microlobulated, ความหนาแน่นก้อนแบบ Equal density และลักษณะไตก้อนแบบ Shadowing มีความแตกต่างกับระดับอื่น ๆ ($p < 0.05$) เมื่อวิเคราะห์โดย Multivariate analysis พบว่าเนื้อเต้านมแบบ High density และการเกิดหินปูน มีความสัมพันธ์กับระดับ 3 มากกว่าระดับอื่น ๆ ($p < 0.05$) สรุปได้ว่าลักษณะภาพเอกซเรย์เต้านมและภาพถ่ายอัลตราซาวด์มีความสัมพันธ์กับระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาค สามารถนำไปพยากรณ์ระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคของโรคมะเร็งท่อน้ำนมในระยะลุกลามได้เป็นอย่างดี และอนาคตสามารถใช้เป็นฐานข้อมูลสำหรับพัฒนาปัญญาประดิษฐ์ เพื่อช่วยระบุระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคของมะเร็งท่อน้ำนมระยะลุกลามได้

คำสำคัญ: มะเร็งท่อน้ำนมในระยะลุกลาม, ภาพถ่ายเอกซเรย์เต้านม, ภาพถ่ายอัลตราซาวด์, ระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาค

Corresponding author E-mail: patamaporn.m@nmu.ac.th

Received: 15 May 2024

Revised: 28 November 2024

Accepted: 17 January 2025

บทนำ

มะเร็งเต้านมเป็นมะเร็งในผู้หญิงที่พบมากเป็นอันดับหนึ่งทั่วโลก รวมทั้งในประเทศไทยและอัตราการเกิดโรคมะเร็งมีแนวโน้มที่จะเพิ่มสูงขึ้นทุก ๆ ปี⁽¹⁾ จากข้อมูลของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่ได้มีการรายงานทะเบียนมะเร็งระดับโรงพยาบาลเมื่อปี พ.ศ. 2563 ฉบับที่ 36 พบว่าประเภทของมะเร็งเต้านมที่พบบ่อยที่สุด คือ Infiltrating duct carcinoma หรือ Invasive ductal carcinoma (มะเร็งท่อน้ำนมในระยะลุกลาม) ซึ่งพบในเพศหญิง จำนวน 480 ราย และเพศชาย จำนวน 2 ราย (จากจำนวนทั้งหมด 669 ราย)⁽²⁾ จากรายงานทะเบียนมะเร็งทำให้ทราบข้อมูลสถิติอุบัติการณ์ของโรค การวินิจฉัย การรักษา และการแพร่กระจาย รวมไปถึงแนวโน้มอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งเต้านมในอนาคต

ในปัจจุบันได้มีเทคโนโลยีที่สามารถตรวจพบมะเร็งเต้านม ตั้งแต่ระยะแรกเริ่มและช่วยในการวินิจฉัยที่ถูกต้องและแม่นยำ ได้แก่ ภาพถ่ายเอกซเรย์เต้านม การตรวจอัลตราซาวด์ และการตรวจทางจุลกายวิภาค ทำให้การรักษาได้ผลดี ช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยได้สูงขึ้น⁽³⁾ โดยภาพถ่ายเอกซเรย์เต้านม (Mammography) เป็นเครื่องมือที่เป็นมาตรฐานสากลระดับโลก ในการใช้สำหรับการวินิจฉัยและตรวจคัดกรองผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่ได้ประสิทธิภาพดี แต่ยังมีข้อจำกัดในเรื่องของความหนาแน่นของเต้านมผู้ป่วย คือ หากผู้ป่วยมีความหนาแน่น เต้านมมาก เครื่องเอกซเรย์เต้านมจะไม่สามารถตรวจจบบรอยโรคได้ทั้งหมด จึงต้องมีการตรวจควบคู่ไปกับการตรวจรูปแบบอื่น และการตรวจที่นิยมใช้ควบคู่ไปกับการตรวจด้วยเครื่องเอกซเรย์เต้านม คือ การตรวจด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasound, อัลตราซาวด์)⁽⁴⁾ และข้อมูลจากศูนย์ถันยรักษ์ (มูลนิธิถันยรักษ์ในพระราชูปถัมภ์ สมเด็จพระศรีนครินทราบรมราชชนนี) เกี่ยวกับการตรวจเอกซเรย์เต้านมได้ระบุลักษณะของเนื้อเยื่อเต้านมของผู้หญิงไทยว่า เป็นลักษณะเนื้อเยื่อเต้านมที่มีความทึบรังสีมากกว่าผู้หญิงตะวันตก⁽⁵⁾ ทำให้การตรวจเต้านมในประเทศไทยจำเป็นต้องใช้การตรวจอัลตราซาวด์ควบคู่กับการตรวจเอกซเรย์เต้านม เพื่อให้เห็นรอยโรคในเต้านมที่มีความหนาแน่น

สูงได้ชัดเจนมากที่สุด⁽⁶⁾ โดยจะนำวิธีการตรวจด้วยอัลตราซาวด์มาใช้ในการแยกรอยโรค ซึ่งสามารถบอกรองค์ประกอบภายใน เช่น น้ำหรือก้อนเนื้องอก เนื่องจากภาพถ่ายที่ได้จากการตรวจสามารถเห็นขอบเขตของรอยโรคได้อย่างชัดเจน ดังนั้นข้อมูลที่ได้จึงแม่นยำเพียงพอที่จะสามารถนำไปประกอบการวินิจฉัยได้อย่างมีประสิทธิภาพ

นอกจากการวินิจฉัยด้วยลักษณะภาพถ่ายเอกซเรย์เต้านมและอัลตราซาวด์แล้ว การตรวจชิ้นเนื้อทางจุลกายวิภาค โดยระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคของมะเร็งท่อน้ำนมระยะลุกลามอ้างอิงตาม Nottingham Histologic Scoring System เป็นอีกวิธีที่สามารถใช้แบ่งมะเร็งท่อน้ำนมระยะลุกลามออกเป็น 3 ระดับ ซึ่งระดับ 2 และ 3 มีความสำคัญมาก เนื่องจากเป็นระดับที่มีการเจริญเติบโตและมีแนวโน้มแพร่กระจายไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกาย โดยการพิจารณาระดับ 1 ถึง 3 ดูจากลักษณะของ Tubules, Nuclear pleomorphic และ Mitotic rate⁽⁷⁾ แต่การวินิจฉัยด้วยวิธีนี้ต้องใช้ระยะเวลาในการเตรียมชิ้นเนื้อและรอผลนาน

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นทำให้ผู้วิจัยเล็งเห็นถึงความสำคัญของการตรวจมะเร็งเต้านม และข้อมูลต่างๆ ที่ได้จากการตรวจมะเร็งเต้านม ทั้งภาพถ่ายเอกซเรย์เต้านม ภาพถ่ายจากการตรวจอัลตราซาวด์ และระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาค ซึ่งส่งผลต่อการพยากรณ์โรค การศึกษาจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะของภาพถ่ายเอกซเรย์เต้านม ภาพถ่ายอัลตราซาวด์ และระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคของมะเร็งท่อน้ำนมในระยะลุกลาม เพื่อใช้ในการพยากรณ์โรค

วัสดุและวิธีการ

กลุ่มตัวอย่าง

ผู้ป่วยหญิงที่เข้ารับบริการด้วยการตรวจเอกซเรย์เต้านมและอัลตราซาวด์ ที่โรงพยาบาลวชิรพยาบาล คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช กรุงเทพมหานคร โดยได้รับการวินิจฉัยว่าอยู่ในกลุ่ม Breast Imaging-Reporting and Data System (BI-RADS) Categories 5 และได้รับการ

วินิจฉัยระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคว่าเป็นมะเร็ง
ท่อน้ำนมระยะลุกลาม ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2563
ถึงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2565 จำนวน 100 ราย

เกณฑ์การคัดเข้า

ผู้ป่วยหญิงที่มาเข้ารับบริการด้วยการตรวจ
เอกซเรย์เต้านมและอัลตราซาวด์ โดยได้รับการวินิจฉัย
ว่าอยู่ในกลุ่ม BI-RADS 5 และได้รับการวินิจฉัยทาง
จุลกายวิภาคว่าเป็นมะเร็งท่อน้ำนมในระยะลุกลามที่
โรงพยาบาลศิริพยาบาล ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ.
2563 ถึงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2565 โดยเลือกเฉพาะ
BI-RADS 5 เนื่องจากมีโอกาสเป็นมะเร็ง $\geq$ ร้อยละ 95
และแนะนำให้มีการตัดชิ้นเนื้อเพื่อส่งตรวจทางพยาธิวิทยา
ซึ่งมีผลการวินิจฉัยของทั้ง 3 วิธี อยู่ในฐานะข้อมูลของ
โรงพยาบาล เนื่องจากเป็นการศึกษาข้อมูลย้อนหลัง
และเป็นไปตามขั้นตอนของการวินิจฉัย คือ เริ่มจาก
การวินิจฉัยทางรังสีวิทยาก่อนแล้ว จึงวินิจฉัยต่อทางพยาธิ
วิทยาตามผลของ BI-RADS เหตุผลสำคัญอีกประการ
คือ ผู้ป่วย Invasive ductal carcinoma อาจอยู่ใน
BI-RADS 6 ได้ ซึ่งภาพถ่ายทางรังสีวิทยาอาจไม่สามารถ
บอกรายละเอียดชัดเจนไม่สามารถนำมาศึกษาหา
ความสัมพันธ์ได้^(8,9)

เกณฑ์การคัดออก

ผู้ป่วยหญิงที่เข้ามาใช้บริการด้วยการตรวจ
เอกซเรย์เต้านม อัลตราซาวด์ ที่อยู่ในกลุ่ม BI-RADS 1-4
และ 6 แต่ไม่มีผลการวินิจฉัยทางจุลกายวิภาค หรือมี
ผลการตรวจทางจุลกายวิภาคที่เป็นมะเร็งชนิดอื่นที่ไม่ใช่
มะเร็งท่อน้ำนมในระยะลุกลาม

วัสดุ

ใช้คอมพิวเตอร์ค้นหาข้อมูลและบันทึกข้อมูล
ผลการตรวจลงในแบบบันทึกข้อมูลจากโปรแกรม
การดูภาพถ่ายทางรังสีวิทยา และผลการวินิจฉัยจาก
รังสีแพทย์ (EV Insite®) ของโรงพยาบาลศิริพยาบาล
โดยกลุ่มตัวอย่างต้องมีการวินิจฉัยลักษณะของ
ภาพถ่ายเอกซเรย์เต้านมและอัลตราซาวด์ ที่ใช้เกณฑ์ของ
American College of Radiology (ACR) Breast
Imaging Reporting and Data System (BI-RADS)

Atlas Fifth Edition⁽¹⁰⁾ และผลการวินิจฉัยระดับความ
แตกต่างทางจุลกายวิภาคของมะเร็งท่อน้ำนมในระยะ
ลุกลามที่ใช้ Nottingham histologic scoring system
ในการบอกระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคของ
มะเร็งท่อน้ำนมในระยะลุกลาม⁽¹¹⁾

วิธีการ

เก็บรวบรวมข้อมูลผู้ป่วยหญิงที่มาเข้ารับบริการ
ตรวจเอกซเรย์เต้านมและอัลตราซาวด์ ตั้งแต่เดือน
กรกฎาคม พ.ศ. 2563 ถึง เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2565
และนำข้อมูลที่ได้นี้มาคัดกรองเฉพาะผู้ป่วยที่ตรงกับเกณฑ์
การคัดเข้า นำ Hospital number (HN) ของผู้ป่วยไป
สืบค้นผลภาพถ่ายทางรังสีวิทยาและผลการวินิจฉัยจาก
รังสีแพทย์ในโปรแกรม EV Insite® บันทึกข้อมูลลักษณะ
รอยโรคจากใบรายงานผลการตรวจวินิจฉัยและภาพถ่าย
การตรวจลงในแบบบันทึกข้อมูล บันทึกข้อมูลขนาดก้อน
มะเร็งจากผลการตรวจอัลตราซาวด์ เนื่องจากมีความ
แม่นยำสูง⁽¹²⁾ โดยใช้ด้าน Longest axis ของก้อนเป็น
ขนาดของก้อนมะเร็ง⁽¹³⁾ และนำ HN ผู้ป่วยไปตรวจสอบ
กับผลการวินิจฉัยทางจุลกายวิภาค โดยใช้ผลการรายงาน
ชิ้นเนื้อที่พยาธิแพทย์รายงานอยู่แล้วในระบบตัดสินระดับ
ความแตกต่างทางจุลกายวิภาค และบันทึกข้อมูลลง
ในแบบบันทึกข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม STATA
Statistics/Data Analysis for Windows version 16
โดยข้อมูลต่างๆ ประกอบด้วย ข้อมูลเชิงคุณภาพ เช่น
ลักษณะรอยโรคที่ได้จากการวินิจฉัยของรังสีแพทย์
จากการตรวจเอกซเรย์เต้านม อัลตราซาวด์ จำนวน
ผู้ป่วยในแต่ละลักษณะในภาพเอกซเรย์เต้านมและ
อัลตราซาวด์ ที่เกิดขึ้นในแต่ละระดับความแตกต่าง
ทางจุลกายวิภาค นำเสนอเป็นจำนวนและใช้ค่าร้อยละ
ข้อมูลเชิงปริมาณ เช่น อายุ ขนาดของมะเร็ง นำเสนอ
เป็นค่าเฉลี่ย

จากนั้นทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะของ
ภาพถ่ายเอกซเรย์เต้านม ภาพถ่ายอัลตราซาวด์ และระดับ
ความแตกต่างทางจุลกายวิภาค โดยใช้สถิติเชิงพรรณนา
(Descriptive statistics) นำเสนอข้อมูลเป็นความถี่
โดยแสดงจำนวนความถี่ที่นับได้ในรูปแบบร้อยละ และ
ใช้สถิติ Pearson's Chi-square test หรือ Fisher

exact test โดยมีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\text{-value} < 0.05$ และพยากรณ์การเกิดมะเร็งโดยใช้การวิเคราะห์ถดถอยเชิงเส้นพหุคูณ (Multiple logistic regression analysis) การวิเคราะห์ถดถอยเอกนาม (Univariate analysis) โดยถือว่านัยสำคัญทางสถิติเมื่อ $p\text{-value} < 0.05$ เพื่อทำนายการเกิดระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 3 จากลักษณะของภาพถ่ายเอกซเรย์เต้านม ภาพถ่ายอัลตราซาวด์ นำเสนอได้ในรูปแบบ Odd ratios (ORs) และ 95% Confidence intervals (CIs)

จริยธรรมการวิจัย

รูปแบบการศึกษานี้เป็นแบบติดตามย้อนกลับ (Retrospective study) ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมวิจัยคณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราชิตราชนา (COA 197/2565) เมื่อวันที่ 8 พฤศจิกายน พ.ศ. 2565

ผล

จากผลการศึกษาพบว่าผู้ป่วยที่ตรงตามเกณฑ์การคัดเลือกทั้งหมด 100 ราย มีอายุตั้งแต่ 35 - 87 ปี อายุเฉลี่ย 64 ปี แบ่งเป็น ผู้ป่วยที่มาตรวจคัดกรองประจำปีจำนวน 18 ราย และมีผู้ป่วยที่มาทำการวินิจฉัยรอยโรคจำนวน 82 ราย โดยเป็นผู้ป่วยที่มีระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาค ระดับ 1 จำนวน 8 ราย ระดับ 2 จำนวน 55 ราย และระดับ 3 จำนวน 37 ราย ตามลำดับ และผู้ป่วยกลุ่มตัวอย่างมีขนาดก้อนมะเร็งเฉลี่ย 3.10 เซนติเมตร ดังแสดงในตารางที่ 1

ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะของภาพถ่ายเอกซเรย์เต้านม ภาพถ่ายอัลตราซาวด์ และระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาค

ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะของภาพถ่ายเอกซเรย์เต้านม ภาพถ่ายอัลตราซาวด์ และระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคของโรคมะเร็งท่อน้ำนมในระยะลุกลามของกลุ่มตัวอย่าง จำนวน 100 ราย โดยแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มตัวอย่างที่มีอายุน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50 ปี และกลุ่มตัวอย่างที่มีอายุมากกว่า 50 ปีขึ้นไป พบว่ากลุ่มตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่ม เป็นโรคมะเร็งท่อน้ำนมในระยะลุกลามที่ระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 2 มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 55.56 และร้อยละ 54.88 ตามลำดับ โดยกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดสามารถแบ่งตามข้อบ่งชี้ในการตรวจได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ตรวจคัดกรองประจำปี (Screening) และกลุ่มที่วินิจฉัยรอยโรค (Diagnostic) พบว่ากลุ่มตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่ม เป็นโรคมะเร็งท่อน้ำนมในระยะลุกลามที่ระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 2 มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 50 และร้อยละ 56.10 ตามลำดับ และสามารถแบ่งตามขนาดของก้อนมะเร็ง แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มตัวอย่างที่มีขนาดก้อนมะเร็งน้อยกว่าหรือเท่ากับ 2 เซนติเมตร และกลุ่มตัวอย่างที่มีขนาดก้อนมะเร็งมากกว่า 2 เซนติเมตร โดยพบว่ากลุ่มตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่ม เป็นโรคมะเร็งท่อน้ำนมในระยะลุกลามที่ระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 2 มากที่สุดเช่นเดียวกัน คิดเป็นร้อยละ 70.97 และร้อยละ 47.83 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงค่าสถิติเชิงพรรณนาและจำนวนผู้ป่วยจำแนกระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาค

Feature	Histologic grade			p-value
	Grade 1	Grade 2	Grade 3	
จำนวนผู้ป่วย (n = 100)	8	55	37	
Age				0.352
≤ 50 years (n = 18)	-	10 (55.56)	8 (44.44)	
> 50 years (n = 82)	8 (9.76)	45 (54.88)	29 (35.36)	
Indication for investigation				0.744
Screening (n = 18)	1 (5.56)	9 (50.00)	8 (44.44)	
Diagnostic (n = 82)	7 (8.54)	46 (56.10)	29 (35.36)	

ตารางที่ 1 แสดงค่าสถิติเชิงพรรณนาและจำนวนผู้ป่วยจำแนกตามระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาค (ต่อ)

Feature	Histologic grade			p-value
	Grade 1	Grade 2	Grade 3	
Tumor size				0.093
≤ 2 cm (n = 31)	2 (6.45)	22 (70.97)	7 (22.58)	
> 2 cm (n = 69)	6 (8.70)	33 (47.82)	30 (43.48)	

หมายเหตุ: แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p -value น้อยกว่า 0.05

ลักษณะของภาพถ่ายเอกซเรย์เต้านม (Mammographic features)

ลักษณะต่างๆ ของเนื้อเยื่อเต้านมที่ได้จากภาพถ่ายเอกซเรย์เต้านมของกลุ่มตัวอย่าง จำนวน 100 ราย ที่นำมาศึกษาหาความสัมพันธ์กับระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาค ประกอบด้วย Tissue composition, Shape, Margin, Density, Calcification, Symmetry และ Association features ดังแสดงในตารางที่ 2

จากการศึกษาพบว่ากลุ่มตัวอย่างส่วนใหญ่มีเนื้อเต้านม (Tissue composition) เป็นแบบ Heterogeneous dense อยู่ในระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 2 มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 52.73 มีรูปร่าง (Shape) ของก้อนเนื้อออกเป็นแบบ Irregular พบอยู่ในระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาค ระดับ 2 มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 55.93 มีขอบเขตของก้อน (Margin) เป็นแบบ Indistinct พบในระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 3 มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 50.98 โดยลักษณะขอบเขตของก้อนแบบต่างๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.006$) มีความหนาแน่นของก้อน (Density) เป็นแบบ High density พบในระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 2 และ 3 จำนวนเท่ากัน คิดเป็นร้อยละ 47.54 โดยลักษณะความหนาแน่นของก้อนแบบต่างๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.029$) ด้านการเกิดหินปูน (Calcification) พบว่าส่วนใหญ่ไม่เกิดหินปูนและพบในระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาค ระดับ 2 มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 61.40 และด้านความสมมาตร (Symmetry) ของเต้านมทั้ง 2 ข้าง พบว่าส่วนใหญ่มีเต้านมที่สมมาตร พบในระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 2 มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 58.33

นอกจากนี้กลุ่มตัวอย่างส่วนใหญ่ยังมีคุณสมบัติอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งเต้านม (Association features) เช่น Skin retraction, Nipple retraction, Skin thickening, Axillary adenopathy และ Architectural distortion ที่ได้จากภาพถ่ายเอกซเรย์พบในระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 2 มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 57.41

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะของภาพถ่ายเอกซเรย์เต้านมกับระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาค ด้วย Chi-square test พบว่าลักษณะขอบเขตของก้อน (Margin) มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาค ($p = 0.006$) โดยระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 1 มีความสัมพันธ์กับลักษณะขอบเขตของก้อนแบบ Spiculated คิดเป็นร้อยละ 19.05 ความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 2 มีความสัมพันธ์กับลักษณะ Indistinct คิดเป็นร้อยละ 47.06 และในระดับ 3 มีความสัมพันธ์กับลักษณะ Indistinct เช่นเดียวกับระดับ 2 คิดเป็นร้อยละ 50.98 และพบว่าลักษณะความหนาแน่นของก้อน มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาค ($p = 0.029$) โดยระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 1 มีความสัมพันธ์กับ Equal density มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 13.16 ส่วนระดับ 2 และ 3 มีความสัมพันธ์กับลักษณะแบบ High density คิดเป็นร้อยละ 47.54

ลักษณะของภาพถ่ายอัลตราซาวด์ (Ultrasound feature)

ลักษณะต่างๆ ที่ได้จากการตรวจอัลตราซาวด์ของกลุ่มตัวอย่าง จำนวน 100 ราย ที่นำมาศึกษาหาความ

สัมพันธ์กับระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาค ประกอบด้วย Shape, Orientation, Margin, echo pattern, Posterior feature, Calcification และ Association features ดังแสดงในตารางที่ 3

จากการศึกษาพบว่ากลุ่มตัวอย่างส่วนใหญ่มีลักษณะรูปร่างของก้อนที่ได้จากการตรวจอัลตราซาวด์เป็นแบบ Irregular พบในระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 2 มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 57.58 มีลักษณะการวางตัวของก้อน (Orientation) เป็นแบบ not parallel พบในระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 2 มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 60 ส่วนใหญ่มีลักษณะขอบเขตของก้อนเป็นแบบ Indistinct พบในระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 3 มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 53.85 โดยลักษณะขอบเขตของก้อนแบบต่างๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.002$) พบว่ากลุ่มตัวอย่างส่วนใหญ่มีลักษณะความเข้มของก้อน (Echo pattern) เป็นแบบ Hypoechoic พบในระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 2 มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 57.14 ส่วนใหญ่ไม่มีลักษณะไตก้อน (No posterior feature) และพบในระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 2 มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 54.90 และพบว่าลักษณะไตก้อน (Posterior feature) แบบต่างๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.042$) ด้านการเกิดหินปูน (Calcification) พบว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่ไม่เกิดหินปูน พบในระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 2 มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ

61.11 ขณะที่คุณสมบัติอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งเต้านม (Association features) เช่น Architectural distortion, Duct change, Skin change, Vascularity และ Elasticity assessment ที่ได้จากการตรวจอัลตราซาวด์ พบว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่มีคุณสมบัติอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องอยู่ในระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 2 มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 52.63

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะของภาพถ่ายอัลตราซาวด์กับระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาค พบว่าลักษณะขอบเขตของก้อน มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาค ($p = 0.002$) โดยระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 1 มีความสัมพันธ์กับลักษณะแบบ Microlobulated คิดเป็นร้อยละ 11.11 ระดับ 2 มีความสัมพันธ์กับลักษณะ Indistinct คิดเป็นร้อยละ 46.15 และในระดับ 3 มีความสัมพันธ์กับลักษณะ Indistinct เช่นเดียวกับระดับ 2 คิดเป็นร้อยละ 53.85 และพบว่าลักษณะไตก้อน (Posterior feature) มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาค ($p = 0.029$) โดยระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 1 มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่มี Shadowing คิดเป็นร้อยละ 18.52 ระดับ 2 มีความสัมพันธ์กับลักษณะ No posterior feature คิดเป็นร้อยละ 54.90 และระดับที่ 3 มีความสัมพันธ์กับลักษณะ No posterior features เช่นเดียวกับระดับ 2 คิดเป็นร้อยละ 43.14

ตารางที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะของภาพถ่ายเอกซเรย์เต้านมและระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาค

Feature	Histologic grade			
	Grade 1	Grade 2	Grade 3	<i>p</i> -value
Mammographic features (n = 100)				
Tissue composition				0.803
Heterogeneous dense (n = 55)	7 (12.73)	29 (52.73)	19 (34.54)	
Extremely fat (n = 9)	–	6 (66.67)	3 (33.33)	
Scattered fibroglandular (n = 28)	1 (3.57)	16 (57.14)	11 (39.29)	
Extremely dense (n = 8)	–	4 (50.00)	4 (50.00)	
Shape				0.134
Oval (n = 36)	1 (2.78)	18 (50.00)	17 (47.22)	
Round (n = 5)	1 (20.00)	4 (80.00)	–	
Irregular (n = 59)	6 (10.17)	33 (55.93)	20 (33.90)	

ตารางที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะของภาพถ่ายเอกซเรย์เต้านมและระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาค (ต่อ)

Feature	Histologic grade			p-value
	Grade 1	Grade 2	Grade 3	
Margin				0.006*
Circumscribed (n = 6)	1 (16.67)	2 (33.33)	3 (50.00)	
Obscured (n = 8)	-	5 (62.50)	3 (37.50)	
Microlobulated (n = 14)	2 (14.28)	9 (64.29)	3 (21.43)	
Indistinct (n = 51)	1 (1.96)	24 (47.06)	26 (50.98)	
Spiculated (n = 21)	4 (19.05)	15 (71.43)	2 (9.52)	
Density				0.029*
High density (n = 61)	3 (4.92)	29 (47.54)	29 (47.54)	
Equal density (n = 38)	5 (13.16)	25 (65.79)	8 (21.05)	
Low density (n = 1)	-	1 (100.00)	-	
Fat-containing	-	-	-	
Calcification				0.083
No (n = 57)	6 (10.53)	35 (61.40)	16 (28.07)	
Yes (n = 43)	2 (4.65)	20 (46.51)	21 (48.84)	
Symmetry				0.606
No (n = 40)	3 (7.50)	20 (50.00)	17 (42.50)	
Yes (n = 60)	5 (8.33)	35 (58.34)	20 (33.33)	
Associated features				0.264
No (n = 46)	6 (13.04)	24 (52.18)	16 (34.78)	
Yes (n = 54)	2 (3.70)	31 (57.41)	21 (38.89)	

หมายเหตุ: *แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\text{-value} < 0.05$

ตารางที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะของภาพถ่ายอัลตราซาวด์และระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาค

Feature	Histologic grade			p-value
	Grade 1	Grade 2	Grade 3	
Ultrasound features (n = 100)				
Shape				0.771
Oval (n = 34)	3 (8.82)	17 (50.00)	14 (41.18)	
Round	-	-	-	
Irregular (n = 66)	5 (7.58)	38 (57.57)	23 (34.85)	
Orientation				0.344
Parallel (n = 35)	4 (11.43)	16 (45.71)	15 (42.86)	
Not parallel (n = 65)	4 (6.15)	39 (60.00)	22 (33.85)	
Margin		-	-	0.002*
Circumscribed (n = 1)	1 (100.00)	13 (48.15)	11 (40.74)	
Microlobulated (n = 27)	3 (11.11)	10 (71.42)	2 (14.29)	
Angulated (n = 14)	2 (14.29)	18 (46.15)	21 (53.85)	
Indistinct (n = 39)	-	14 (73.68)	3 (15.79)	
Spiculated (n = 19)	2 (10.53)			

ตารางที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะของภาพถ่ายอัลตราซาวด์และระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาค (ต่อ)

Feature	Histologic grade			p-value
	Grade 1	Grade 2	Grade 3	
Echo pattern	-	1 (100.00)	-	0.235
Anechoic (n = 1)	-	-	1 (100.00)	
Hyperechoic (n = 1)	1 (100.00)	-	-	
Complex cystic and solid (n = 1)	6 (7.14)	48 (57.15)	30 (35.71)	
Hypoechoic (n = 84)	-	-	-	
Isoechoic	1 (7.70)	6 (46.15)	6 (46.15)	
Heterogeneous (n = 13)				
Posterior feature				0.042*
No posterior feature (n = 51)	1 (1.96)	28 (54.90)	22 (43.14)	
Enhancement (n = 16)	2 (12.50)	6 (37.50)	8 (50.00)	
Shadowing (n = 27)	5 (18.52)	17 (62.96)	5 (18.52)	
Combine pattern (n = 6)	-	4 (66.67)	2 (33.33)	
Calcification				0.097
No (n = 72)	6 (8.33)	44 (61.11)	22 (30.56)	
Yes (n = 28)	2 (7.14)	11 (39.29)	15 (53.57)	
Associated features				0.309
No (n = 24)	3 (12.50)	15 (62.50)	6 (25.00)	
Yes (n = 76)	5 (6.58)	40 (52.63)	31 (40.79)	

หมายเหตุ: *แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\text{-value} < 0.05$

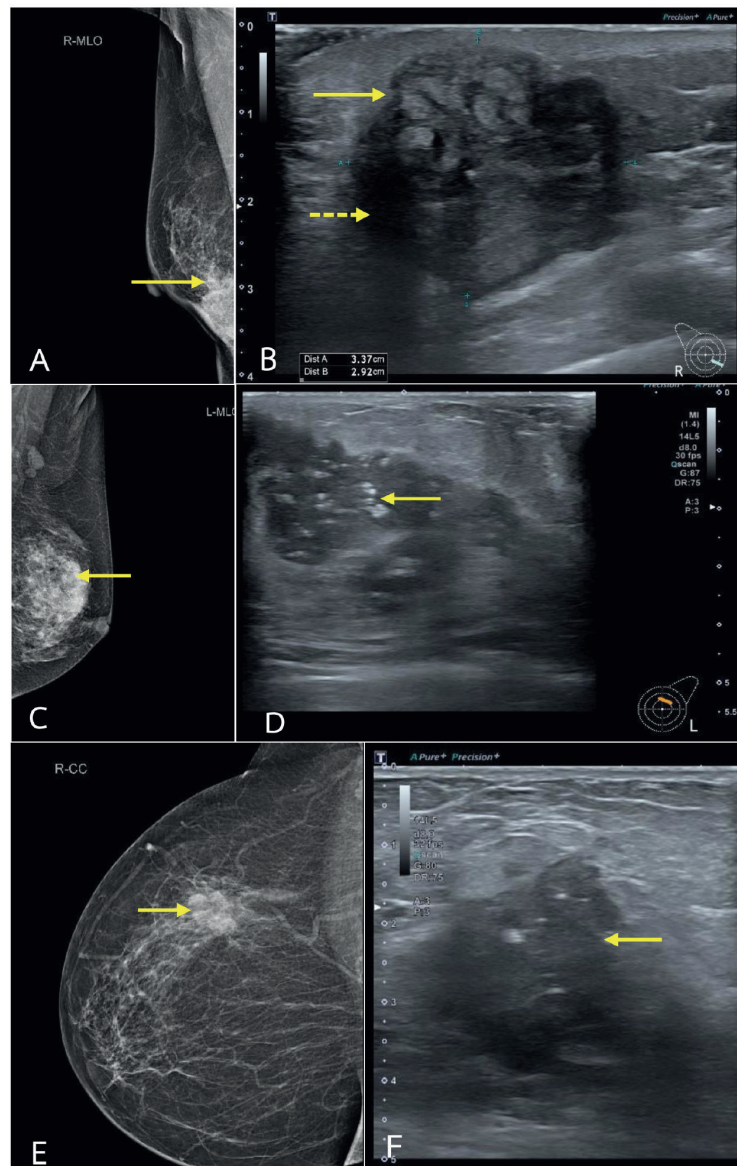
จากตารางที่ 2 และ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะของภาพถ่ายเอกซเรย์เต้านม ภาพถ่ายอัลตราซาวด์ และระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคของโรคมะเร็งท่อน้ำนมในระยะลุกลาม พบว่าลักษณะขอบเขตของก้อนมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งในลักษณะของภาพถ่ายเอกซเรย์เต้านม และภาพถ่ายอัลตราซาวด์ ดังแสดงในภาพที่ 1 ผู้ป่วยรายที่ 1 จากภาพ พบว่าผู้ป่วยได้รับการยืนยันว่าเป็นมะเร็งท่อน้ำนมในระยะลุกลาม โดยมีระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 1 ซึ่งลักษณะที่ได้จากภาพถ่ายเอกซเรย์เต้านมเป็นแบบ Spiculated (1A) และลักษณะที่ได้จากภาพถ่ายอัลตราซาวด์เป็นแบบ Microlobulated (1B) ผู้ป่วยรายที่ 2 จากภาพ พบว่าผู้ป่วยได้รับการยืนยันว่าเป็นมะเร็งท่อน้ำนมในระยะลุกลาม โดยมีระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 2 เป็นลักษณะแบบ Indistinct ทั้งในภาพถ่ายเอกซเรย์เต้านม (1C) และภาพถ่ายอัลตราซาวด์ (1D) ผู้ป่วยรายที่ 3 จากภาพ พบว่าผู้ป่วย

ได้รับการยืนยันว่าเป็นมะเร็งท่อน้ำนมในระยะลุกลาม โดยมีระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 3 เป็นลักษณะแบบ Indistinct ทั้งในภาพถ่ายเอกซเรย์เต้านม (1E) และภาพถ่ายอัลตราซาวด์ (1F) เช่นเดียวกับระดับ 2

การพยากรณ์การเกิดมะเร็งจากลักษณะของภาพถ่ายเอกซเรย์เต้านมและลักษณะของภาพถ่ายอัลตราซาวด์ โดยการวิเคราะห์การถดถอยเอกนาม (Univariate analysis) และการวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณ (Multivariate analysis)

ลักษณะของภาพถ่ายเอกซเรย์เต้านม

ลักษณะต่างๆ ที่ได้จากภาพถ่ายเอกซเรย์เต้านม ที่นำมาศึกษาหาความสัมพันธ์กับระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 3 โดยการวิเคราะห์การถดถอยเอกนาม พบว่าขอบเขตของก้อนแบบ Spiculated



ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างภาพเอกซเรย์เต้านม และภาพอัลตราซาวด์

- (A) ภาพเอกซเรย์เต้านม แสดงลักษณะ Spiculated (ลูกศรทึบ),
- (B) ภาพอัลตราซาวด์ แสดงลักษณะ Microlobulated (ลูกศรทึบ) และลักษณะไตก้อนแบบ Shadowing (ลูกศรประ),
- (C) ภาพเอกซเรย์เต้านม แสดงลักษณะ Indistinct (ลูกศรทึบ),
- (D) ภาพอัลตราซาวด์ แสดงลักษณะ Indistinct (ลูกศรทึบ) และไม่มีลักษณะไตก้อน,
- (E) ภาพเอกซเรย์เต้านมแสดงลักษณะ Indistinct (ลูกศรทึบ),
- (F) ภาพอัลตราซาวด์ แสดงลักษณะ Indistinct (ลูกศรทึบ) และไม่มีลักษณะไตก้อน

($p = 0.041$) มีโอกาสเกิดมะเร็งที่ระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 3 น้อยกว่า 0.11 เท่า (OR, 0.11, 95% CI, 0.01 – 0.92) เมื่อเปรียบเทียบกับขอบเขตของก้อนอ้างอิง คือ ขอบเขตของก้อนแบบ Circumscribed และความหนาแน่นของก้อน (Density)

พบว่าที่มีลักษณะแบบ Equal density ($p = 0.010$) มีโอกาสเกิดมะเร็งที่ระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 3 น้อยกว่า 0.29 เท่า (OR, 0.29, 95% CI, 0.12–0.74) เมื่อเปรียบเทียบกับความหนาแน่นของก้อนอ้างอิง คือ High density และพบว่า

การเกิดหินปูน ($p = 0.035$) มีโอกาสเกิดมะเร็งที่ระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 3 มากกว่า 2.45 เท่า (OR, 2.45, 95% CI, 1.07–5.62) เมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะการเกิดหินปูนอ้างอิง คือ ไม่เกิดหินปูนจากการวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณ พบว่าความหนาแน่นของก้อนที่มีลักษณะแบบ Equal Density ($p = 0.043$) มีโอกาสเกิดมะเร็งที่ระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 3 น้อยกว่า 0.30 เท่า (OR, 0.30, 95% CI, 0.09–0.96) เมื่อเปรียบเทียบกับความหนาแน่นของก้อนอ้างอิงคือ High density และพบว่าการเกิดหินปูนเป็นลักษณะที่ควรเฝ้าระวัง เนื่องจากมีโอกาสเกิดมะเร็งที่ระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 3 มากกว่า 1.32 เท่า (OR, 1.32, 95% CI, 0.37 – 4.72) เมื่อเปรียบเทียบกับกรณีไม่เกิดหินปูน ดังแสดงในตารางที่ 4

ลักษณะของภาพถ่ายอัลตราซาวด์

ลักษณะต่าง ๆ ที่ได้จากภาพถ่ายอัลตราซาวด์ ที่นำมาศึกษาหาความสัมพันธ์กับระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 3 โดยการวิเคราะห์การถดถอยเอกนาม พบว่าลักษณะขอบเขตของก้อนที่มีลักษณะแบบ Indistinct ($p = 0.010$) มีโอกาสเกิดมะเร็งที่ระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 3 มากกว่า 6.22 เท่า (OR, 6.22, 95% CI, 1.56–24.84) เมื่อเปรียบเทียบกับขอบเขตอ้างอิง คือ ขอบเขตก้อนแบบ Spiculated

และลักษณะไตก้อน (Posterior feature) แบบ Shadowing ($p = 0.035$) มีโอกาสเกิดมะเร็งที่ระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาค ระดับ 3 น้อยกว่า 0.30 เท่า (OR, 0.30, 95% CI, 0.10–0.92) เมื่อเทียบกับลักษณะไตก้อนอ้างอิง คือ แบบ No posterior feature และพบว่าการเกิดหินปูน ($p = 0.035$) มีโอกาสเกิดมะเร็งที่ระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 3 มากกว่า 2.62 เท่า (OR, 2.62, 95% CI, 1.07–6.43) เมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะการเกิดหินปูนอ้างอิง คือ ไม่เกิดหินปูน จากการวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณ (Multivariate analysis) ไม่พบลักษณะที่ได้จากการตรวจอัลตราซาวด์ที่มีความสัมพันธ์ทางสถิติกับระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาค แต่พบว่ามีลักษณะขอบเขตของก้อนแบบ Microlobulated และ Indistinct ที่ควรเฝ้าระวังด้วยเช่นกัน เพราะมีโอกาในการเกิดมะเร็งที่ระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 3 มากกว่า 1.87 เท่า (OR, 1.87, 95% CI, 0.31–11.14) และมากกว่า 1.95 เท่า (OR, 1.95, 95% CI, 0.37–10.25) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับขอบเขตของก้อนอ้างอิง คือ ขอบเขตแบบ Spiculated และการเกิดหินปูนเป็นลักษณะที่ควรเฝ้าระวัง เนื่องจากมีโอกาสเกิดมะเร็งที่ระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 3 มากกว่า 1.76 เท่า (OR, 1.76, 95% CI, 0.46–6.79) เมื่อเปรียบเทียบกับกรณีไม่เกิดหินปูน ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงผลการวิเคราะห์การถดถอยเอกนาม (Univariate analysis) และการวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณ (Multivariate analysis) เพื่อพยากรณ์การเกิดมะเร็งจากลักษณะของภาพเอกซเรย์เต้านม และลักษณะของภาพอัลตราซาวด์

Feature	Histologic grade: Number (%)		Univariate analysis*		Multivariate analysis*	
	Grades 1 and 2	Grade 3	p-value	OR (95%CI)	p-value	OR (95%CI)
Mammographic features (n = 100)						
1) Tissue composition						
Heterogeneous dense (n = 55)	36 (65.45)	19 (34.55)	Reference	1***		
Extremely fat (n = 9)	6 (66.67)	3 (33.33)	0.943	0.95 (0.21–4.22)		

ตารางที่ 4 แสดงผลการวิเคราะห์การถดถอยเอกนาม (Univariate analysis) และการวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณ (Multivariate analysis) เพื่อพยากรณ์การเกิดมะเร็งจากลักษณะของภาพเอกซเรย์เต้านม และลักษณะของภาพอัลตราซาวด์ (ต่อ)

Feature	Histologic grade: Number (%)		Univariate analysis*		Multivariate analysis*	
	Grades 1 and 2	Grade 3	p-value	OR (95%CI)	p-value	OR (95%CI)
Scattered fibroglandular (n = 28)	17 (60.71)	11 (39.29)	0.671	1.23 (0.48-3.14)		
Extremely dense (n = 8)	4 (50.00)	4 (50.00)	0.402	1.89 (0.43-8.43)		
2) Shape						
Oval (n = 36)	19 (52.78)	17 (47.22)	Reference	1		
Round (n = 5)	5 (100.00)		-	-		
Irregular (n = 59)	39 (66.10)	20 (35.90)	0.198	0.57 (0.25-1.34)		
3) Margin						
Circumscribed (n = 6)	3 (50.00)	3 (50.00)	Reference	1	Reference	1
Obscured (n = 8)	5 (62.50)	3 (37.50)	0.641	0.60 (0.07-5.14)	0.525	0.41 (0.03-6.31)
Microlobulated (n = 14)	11 (78.57)	3 (21.43)	0.214	0.27 (0.04-2.11)	0.082	0.11 (0.01-1.33)
Indistinct (n = 51)	25 (49.02)	26 (50.98)	0.964	1.04 (0.19-5.65)	0.501	0.46 (0.05-4.36)
Spiculated (n = 21)	19 (90.48)	2 (9.52)	0.041**	0.11 (0.01-0.92)	0.091	0.09 (0.01-1.47)
4) Density						
High density (n = 61)	32 (52.46)	29 (47.54)	Reference	1	Reference	1
Equal density (n = 38)	30 (78.95)	8 (21.05)	0.010**	0.29 (0.12-0.74)	0.043**	0.30 (0.09-0.96)
Low density (n = 1)	1 (100.00)	-	-	-		
Fat-containing	-	-	-	-		
5) Calcification						
No (n = 57)	41 (71.93)	16 (28.07)	Reference	1	Reference	1
Yes (n = 43)	22 (51.16)	21 (48.84)	0.035**	2.45 (1.07-5.62)	0.670	1.32 (0.37-4.72)

ตารางที่ 4 แสดงผลการวิเคราะห์การถดถอยเอกนาม (Univariate analysis) และการวิเคราะห์การถดถอย
เชิงพหุคูณ (Multivariate analysis) เพื่อพยากรณ์การเกิดมะเร็งจากลักษณะของภาพเอกซเรย์
เต้านม และลักษณะของภาพอัลตราซาวด์ (ต่อ)

Feature	Histologic grade: Number (%)		Univariate analysis*		Multivariate analysis*	
	Grades 1 and 2	Grade 3	p-value	OR (95%CI)	p-value	OR (95%CI)
6) Symmetry						
No (n = 40)	23 (57.50)	17 (42.50)	Reference	1		
Yes (n = 60)	40 (66.67)	20 (33.33)	0.353	0.68 (0.30-1.54)		
7) Associated features						
No (n = 46)	30 (65.22)	16 (34.78)	Reference	1		
Yes (n = 54)	33 (61.11)	21 (38.89)	0.672	1.19 (0.53-2.70)		
Ultrasound features (n=100)						
1) Shape						
Oval (n = 34)	20 (58.82)	14 (41.18)	Reference	1		
Round	-	-	-	-		
Irregular (n = 66)	43 (65.15)	23 (34.85)	0.535	0.76 (0.33-1.79)		
2) Orientation						
Parallel (n = 35)	20 (57.14)	15 (42.86)	Reference	1		
Not parallel (n = 65)	43 (66.15)	22 (33.85)	0.374	0.68 (0.29-1.59)		
3) Margin						
Circumscribed (n = 1)	1 (100.00)	-	-	-		
Microlobulated (n = 27)	16 (59.26)	11 (40.74)	0.080	3.67 (0.86-15.67)	0.492	1.87 (0.31-11.14)
Angulated (n = 14)	12 (85.71)	2 (14.29)	0.905	0.89 (0.13-6.18)	0.503	0.46 (0.05-4.45)
Indistinct (n = 39)	18 (46.15)	21 (53.85)	0.010**	6.22 (1.56-24.84)	0.429	1.95 (0.37-10.25)
Spiculated (n = 19)	16 (84.21)	3 (15.79)	Reference	1	Reference	

ตารางที่ 4 แสดงผลการวิเคราะห์การถดถอยเอกนาม (Univariate analysis) และการวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณ (Multivariate analysis) เพื่อพยากรณ์การเกิดมะเร็งจากลักษณะของภาพเอกซเรย์เต้านม และลักษณะของภาพอัลตราซาวด์ (ต่อ)

Feature	Histologic grade: Number (%)		Univariate analysis*		Multivariate analysis*	
	Grades 1 and 2	Grade 3	p-value	OR (95%CI)	p-value	OR (95%CI)
4) Echo pattern						
Anechoic (n = 1)	1 (100.00)	-	-	-		
Hyperechoic (n = 1)	-	1 (100.00)	-	-		
Complex cystic and solid (n = 1)	1 (100.00)	-	-	-		
Hypoechoic (n = 84)	54 (64.29)	30 (35.71)	0.471	0.65 (0.20-2.11)		
Isoechoic	-	-	-	-		
Heterogeneous (n = 13)	7 (53.85)	6 (46.15)	Reference	1		
5) Posterior feature						
No posterior feature (n = 51)	29 (56.86)	22 (43.14)	Reference	1		
Enhancement (n = 16)	8 (50.00)	8 (50.00)	0.631	1.32 (0.43-4.06)		
Shadowing (n = 27)	22 (81.48)	5 (18.52)	0.035**	0.30 (0.10-0.92)		
Combine pattern (n = 6)	4 (66.67)	2 (33.33)	0.647	0.66 (0.11-3.93)		
6) Calcification						
No (n = 72)	50 (69.44)	22 (30.56)	Reference	1	Reference	1
Yes (n = 28)	13 (46.43)	15 (53.57)	0.035**	2.62 (1.07-6.43)	0.410	1.76 (0.46-6.79)
7) Associated features						
No (n = 24)	18 (75.00)	6 (25.00)	Reference	1		
Yes (n = 76)	45 (59.21)	31 (40.79)	0.168	2.07 (0.74-5.80)		

หมายเหตุ : * การวิเคราะห์การถดถอยเอกนาม นำมาใช้ในการวิเคราะห์ที่มีตัวแปรต้นตัวเดียวและมีตัวแปรตามตัวเดียว

* การวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณ นำมาใช้ในการวิเคราะห์เพื่อดูความสัมพันธ์ เมื่อมีตัวแปรต้นหลายตัวและมีตัวแปรตามเพียงตัวเดียว

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\text{-value} < 0.05$

*** ประเมินค่าของความเสี่ยง OR = 1 : ไม่มีความสัมพันธ์หรือไม่แสดงผล, OR < 1 : ความสัมพันธ์เป็นปัจจัยเสี่ยงลดลง, OR > 1 : ความสัมพันธ์เป็นปัจจัยเสี่ยง

วิจารณ์

จากการศึกษาลักษณะต่างๆ ของเนื้อเต้านมได้
จากภาพถ่ายเอกซเรย์เต้านม พบว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่มีเนื้อ
เต้านม (Tissue composition) แบบ Heterogeneous
dense รองลงมา คือ Scattered fibroglandular
สอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้าของ Sajjad B และ
คณะ ที่ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะเนื้อ
เต้านมและมะเร็งเต้านม พบว่าลักษณะเนื้อเต้านมแบบ
Heterogeneous dense และ Scattered fibroglan-
dular เป็นลักษณะที่พบในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมส่วนใหญ่
ซึ่งมักมีความหนาแน่นเต้านมสูง⁽¹⁴⁾ ขณะที่รูปร่างของก้อน
(Shape) ในเต้านมทั้งในภาพถ่ายเอกซเรย์เต้านมและ
ภาพถ่ายอัลตราซาวด์ส่วนใหญ่เป็นแบบ Irregular และ
พบในระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาค ระดับ 2 มาก
ที่สุด สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าของ Suvannarerg
V และคณะ⁽¹⁵⁾

จากการศึกษาลักษณะขอบเขตของก้อน (Margin)
ผู้วิจัยพบว่าลักษณะส่วนใหญ่ในภาพถ่ายเอกซเรย์
เต้านมและภาพถ่ายอัลตราซาวด์เป็นแบบ Indistinct
และพบอยู่ในระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาค ระดับ 3
มากที่สุด ซึ่งตรงกันกับผลการศึกษาก่อนหน้าของ Shin
HJ และคณะ, Suvannarerg V และคณะ และ Gupta
K และคณะ ซึ่งพบขอบเขตของก้อนเป็นแบบ Indistinct
อยู่ในระดับ High grade คือ ระดับ 2 และ 3 มากที่สุด⁽¹⁵⁻¹⁷⁾
และเมื่อใช้สถิติ Chi-square test วิเคราะห์หาความ
สัมพันธ์ พบว่าลักษณะขอบเขตของก้อนแบบ Spiculated
ในภาพถ่ายเอกซเรย์เต้านมและลักษณะขอบเขตของ
ก้อนแบบ Microlobulated ในภาพถ่ายอัลตราซาวด์
สัมพันธ์อยู่กับระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาค
ระดับ 1 และลักษณะขอบเขตของก้อนแบบ Indistinct
ทั้งในภาพถ่ายเอกซเรย์เต้านมและภาพถ่ายอัลตราซาวด์
สัมพันธ์ระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 2
และ 3 ผลการวิเคราะห์ตรงกับการวิเคราะห์การถดถอย
เออนาม ที่พบว่าลักษณะขอบเขตของก้อนแบบ
Spiculated ในภาพถ่ายเอกซเรย์เต้านมมีความสัมพันธ์
กับระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 1
และลักษณะ Indistinct ในภาพถ่ายอัลตราซาวด์

มีความสัมพันธ์กับระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาค
ระดับ 3 และสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าของ
Suvannarerg V และคณะ ที่พบว่าขอบเขตของก้อน
แบบ Spiculated ในภาพถ่ายเอกซเรย์เต้านมสามารถ
พยากรณ์การเกิดมะเร็งท่อน้ำนมระยะลุกลามที่ระดับ
ความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 1 ได้ และพบว่า
ลักษณะขอบเขตของก้อนแบบ Indistinct ในภาพ
อัลตราซาวด์ สามารถทำนายการเกิดมะเร็งที่ระดับ
ความแตกต่างทางจุลกายวิภาค ระดับ 3 ได้⁽¹⁵⁾

จากการศึกษาลักษณะความหนาแน่นของก้อน
(Density) ผู้วิจัยพบว่าความหนาแน่นส่วนใหญ่ที่พบใน
ภาพถ่ายเอกซเรย์เต้านมเป็นแบบ High density โดย
พบอยู่ในระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 2
และ 3 มากที่สุด สอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้าของ
Shin HJ และคณะ และ Suvannarerg V และคณะ
ที่พบว่าที่ระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาค ระดับ
High grade (ระดับ 2 และ 3) จะพบลักษณะ
ความหนาแน่นของก้อนในภาพถ่ายเอกซเรย์เต้านม
เป็นแบบ High density^(15, 17) และจากผลการวิเคราะห์
ความสัมพันธ์โดยใช้สถิติ Chi-square test พบว่าความ
หนาแน่นเต้านมแบบ Equal Density ในภาพเอกซเรย์
เต้านมสัมพันธ์กับระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาค
ระดับ 1 และความหนาแน่นแบบ High density มีความสัมพันธ์
กับระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 2
และ 3 ตรงกับผลการวิเคราะห์การถดถอยเออนาม และ
การวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณ ที่พบว่าลักษณะ
Equal Density ในภาพเอกซเรย์เต้านม มีความ
สัมพันธ์กับระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 1
และความหนาแน่นแบบ High Density มีความสัมพันธ์
กับระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 3 ซึ่ง
สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าของ Shin HJ และ
คณะ และ Suvannarerg V และคณะ ที่พบว่าลักษณะ
ความหนาแน่นของก้อน แบบ High density สามารถ
พยากรณ์การเกิดมะเร็งที่ระดับความแตกต่างทางจุล
กายวิภาคระดับ 3 ได้^(15,17)

จากการศึกษาลักษณะความเข้มของก้อน (Echo
pattern) ผู้วิจัยพบว่าความเข้มของก้อนส่วนใหญ่ที่พบ

ในภาพถ่ายอัลตราซาวด์เป็นแบบ Hypoechoic โดยพบในระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาค ระดับ 2 มากที่สุด สอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้าของ Suvannarerg V และคณะ ที่พบความเข้มของก้อน เป็นแบบ Hypoechoic ในระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 2⁽¹⁵⁾ แต่แตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้าของ Gupta K และคณะ ที่พบ Hypoechoic ในระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 1⁽¹⁶⁾

จากการศึกษาลักษณะได้ก้อน (Posterior feature) พบว่าลักษณะส่วนใหญ่ที่พบในภาพถ่ายอัลตราซาวด์เป็นแบบไม่มีลักษณะได้ก้อน (No posterior feature) พบในระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 2 มากที่สุด สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าของ Gupta K และคณะ⁽¹⁶⁾ และจากการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์โดยใช้สถิติ Chi-square test พบว่าลักษณะได้ก้อนแบบ Shadowing มีความสัมพันธ์กับระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 1 ตรงกับผลการวิเคราะห์การถดถอยเออนาม ที่พบว่าลักษณะได้ก้อนแบบ Shadowing มีความสัมพันธ์กับระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 1 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าของ Lamb PM และคณะ และ Suvannarerg V และคณะ ที่พบว่าลักษณะได้ก้อน (Posterior feature) แบบ Shadowing สามารถพยากรณ์การเกิดมะเร็งที่ระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 1 ได้^(15,18)

จากการศึกษาการเกิดหินปูน (Calcification) พบว่าส่วนใหญ่ไม่เกิดหินปูน และพบในระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 2 มากที่สุด ทั้งในภาพถ่ายเอกซเรย์และอัลตราซาวด์ เช่นเดียวกับผลการศึกษาของ Suvannarerg V และคณะ และ Gupta K และคณะ⁽¹⁶⁾ โดยผลการวิเคราะห์การถดถอยเออนาม พบว่าการเกิดหินปูนในภาพถ่ายเอกซเรย์เต้านมและภาพถ่ายอัลตราซาวด์ มีความสัมพันธ์กับระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคระดับ 3 สอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้าของ Shin HJ และคณะ⁽¹⁷⁾

สรุป

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะของภาพถ่ายเอกซเรย์เต้านม ภาพถ่ายอัลตราซาวด์และระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคของมะเร็งท่อน้ำนมในระยะลุกลามของผู้ป่วยโรงพยาบาลวชิรพยาบาล สรุปได้ว่าลักษณะภาพถ่ายเอกซเรย์เต้านมที่มีความสัมพันธ์กับระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคของโรคมะเร็งท่อน้ำนมในระยะลุกลามทั้ง 3 ระดับ คือ ขอบเขตของก้อนและความหนาแน่นของก้อน ส่วนลักษณะภาพถ่ายอัลตราซาวด์ที่มีความสัมพันธ์กับระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคของโรคมะเร็งท่อน้ำนมในระยะลุกลามทั้ง 3 ระดับ คือ ขอบเขตของก้อน และลักษณะได้ก้อนสามารถนำไปพยากรณ์ระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคของโรคมะเร็งท่อน้ำนมในระยะลุกลามได้เป็นอย่างดี และในอนาคตสามารถใช้เป็นฐานข้อมูลสำหรับพัฒนาปัญญาประดิษฐ์ เพื่อช่วยในการระบุระดับความแตกต่างทางจุลกายวิภาคของมะเร็งท่อน้ำนมระยะลุกลามได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชารังสีเทคนิค และ Vajira Pathology-Clinical-Correlation Target Research Interest Group คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัยและเก็บข้อมูลผู้ป่วย

เอกสารอ้างอิง

1. สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. ทะเบียนมะเร็งระดับโรงพยาบาล พ.ศ. 2563. กรุงเทพฯ: หน่วยงานเวชระเบียนและฐานข้อมูลโรคมะเร็ง กลุ่มงานนิติทางการแพทย์. [ออนไลน์]. 2564; [สืบค้น 11 พ.ย. 2566]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://www.nci.go.th/e_book/hosbased_2563/index.html.
2. National Cancer Institute, Department of Medical Services, Ministry of Public Health. Cancer in Thailand Vol.X, 2016-2018. Bangkok, Thailand: Medical Record and

- Databased Cancer Unit. [online]. 2021; [cited 2023 Nov 11]. Available from: URL: https://www.nci.go.th/e_book/cit_x/index.html.
3. American Cancer Society. Understanding a breast cancer diagnosis. [online]. 2022; [cited 2023 Nov 11]; [39 screens]. Available from: URL: <https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/8580.00.pdf>.
4. โรงพยาบาลศิริราชปิยมหาราชการุณย์ คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล. แมมโมแกรม ตรวจเร็ว แม่นยำ ปลอดภัย. [ออนไลน์]. 2564; [สืบค้น 3 พ.ย. 2565]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://www.siphhospital.com/th/news/article/share/mammogram>.
5. Kim H, Lim J, Kim HG, Lim Y, Seo BK, Bae MS. Deep learning analysis of mammography for breast cancer risk prediction in Asian women. *Diagnostics*. 2023;13(13):2247. (9 pages).
6. มูลนิธิธิดาธิราชปิยมหาราชการุณย์ สมเด็จพระศรีนครินทราบรมราชชนนี. อัลตราซาวด์. [ออนไลน์]. 2566; [สืบค้น 11 พ.ย. 2566]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://www.thanyarak.or.th/service-ultrasound-ultrasound.php>.
7. Fox K, Nead K. Nottingham score for breast cancer. [online]. [cited 2023 Nov 11]; [1 screen]. Available from: URL: <https://www.oncolink.org/frequently-asked-questions/cancers/nottingham-score-for-breast-cancer>.
8. Angulo PA, Castellano CR, Sanchez-Camacho MD, Hernandez LC, Martínez VJ. To detect or not to detect, that is the question: an approach to breast cancers not visible on digital breast tomosynthesis. *European Congress of Radiology-ECR* 2019.
9. D'Orsi CJ, Sickles EA, Mendelson EB, Morris EA, et al. ACR BI-RADS® atlas, breast imaging reporting and data system. Reston, VA: American College of Radiology; 2013
10. ACR BI-RADS atlas: breast imaging reporting and data system. 5th ed: Reston, VA: American College of Radiology; 2013.
11. Rakha EA, El-Sayed ME, Lee AHS, Elston CW, Grainge MJ, Hodi Z, et al. Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. *J Clin Oncol* 2008; 26(19): 3153-8.
12. Shoma A, Moutamed A, Ameen M, Abdelwahab A. Ultrasound for accurate measurement of invasive breast cancer tumor size. *Breast J* 2006; 12(3): 252-6.
13. Ko KH, Jung HK, Park AY, Koh JE, Jang H, Kim Y. Accuracy of tumor size measurement on shear wave elastography (SWE): Correlation with histopathologic factors of invasive breast cancer. *Medicine* 2020; 99(44): e23023. (6 pages).
14. Sajjad B, Farooqi N, Rehman B, Khalid IB, Urooj N, Sajjad S, et al. Correlation of breast density grade on mammogram with diagnosed breast cancer: a retrospective cross-sectional study. *Cureus* 2022; 14(7): e27028. (7 pages).
15. Suvannarerg V, Tangcharoensathien W, Thiravit S, Tanasoontrarat W, Muangsomboon K, Korparaphong P. The association between mammographic and ultrasound features and histologic grade in invasive ductal carcinoma of the breast. *Siriraj Med J* 2018; 70(2): 152-8.
16. Gupta K, Kumaresan M, Venkatesan B, Chandra T, Patil A, Menon M. Sonographic features of invasive ductal breast carcinomas predictive of malignancy grade. *Indian J Radiol Imaging* 2018; 28(1): 123-31.
17. Shin HJ, Kim HH, Huh MO, Kim MJ, Yi A, Kim H, et al. Correlation between mammographic and sonographic findings and prognostic factors in patients with node-negative invasive breast cancer. *Br J Radiol* 2011; 84(997): 19-30.
18. Lamb PM, Perry NM, Vinnicombe SJ, Wells CA. Correlation between ultrasound characteristics, mammographic findings and histological grade in patients with invasive ductal carcinoma of the breast. *Clin Radiol* 2000; 55(1): 40-4.

A Study of Correlation between Mammographic and Ultrasonographic Features and Histologic Grade in Invasive Ductal Carcinoma of the Breast

Kanokkorn Thipat¹, Nareerat Yoodee², Nontawat Benjakul^{3,6}, Suwara Issaragrisil⁴, and Patamaporn Molec^{5,6}

¹ Thaksin Hospital, Muang District, Surat Thani 84000, Thailand

² Vibharam Amatanakorn Specialized Cancer Hospital, Chonburi 20000, Thailand

³ Department of Anatomical Pathology, Faculty of Medicine Vajira Hospital, Navamindradhiraj University, Bangkok 10300, Thailand

⁴ Wattanosoth Cancer Hospital, Bangkok Hospital, Huaykwang, Bangkok 10310, Thailand

⁵ Department of Radiological Technology, Faculty of Medicine Vajira Hospital, Navamindradhiraj University, Bangkok 10300, Thailand

⁶ Vajira Pathology-Clinical-Correlation Target Research Interest Group, Faculty of Medicine Vajira Hospital, Navamindradhiraj University, Bangkok 10300, Thailand

ABSTRACT The most common type of breast cancer is invasive ductal carcinoma, which is detected primarily through mammographic, ultrasonographic features, and histologic grade. These diagnostic methods enable the early detection of breast cancer, but histopathological examination requires a significant amount of time for results. This study aimed to study the correlation between mammographic and ultrasonographic features and histologic grade of invasive ductal carcinoma detection for prognostication. Mammographic and ultrasonographic features of invasive ductal carcinomas diagnosed in 100 representative women patients between July 2020 and July 2022 were retrospectively reviewed. One hundred female patients with invasive ductal carcinomas were classified into histological grades: grade 1, 8%; grade 2, 55%; and grade 3, 37%. The chi-square test identified statistically significant differences ($p < 0.05$) in the mammographic and ultrasonographic margins (spiculated and microlobulated), equal density, and posterior shadowing of grade 1 tumors compared to others ($p < 0.05$). Multivariate analyses revealed a statistically significant correlation between high breast density and calcification with grade 3 tumors. The mammographic and ultrasonographic features correlate with histologic grade and effectively predict histologic grade in invasive ductal carcinoma. Consequently, these serve as a valuable dataset for training the artificial intelligence models to identify and categorize histologic grade in Invasive ductal carcinoma in the future.

Keywords: Invasive ductal carcinoma, Mammographic features, Ultrasonographic features, Histologic grade

การประเมินวัสดุควบคุมคุณภาพ การวัดอัตราการตกตะกอนเม็ดเลือดแดง สำหรับวิธี Modified Westergren

นันทกร กิจธิสุข¹ สมศักดิ์ ฟองสุภา² สุดาวดี คงคำ³ และ ปราโมทย์ ศรีวานิชรักษ์^{1,3}

¹เทคนิคการแพทย์มหาบัณฑิต คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปทุมธานี 12120

²สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยปทุมธานี ปทุมธานี 12000

³ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปทุมธานี 12120

บทคัดย่อ การวัดอัตราการตกตะกอนเม็ดเลือดแดง (ESR) เป็นการวัดที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการทดสอบ เพื่อประเมินภาวะการอักเสบหรือการตอบสนองในระยะเฉียบพลัน ปัจจุบันการทดสอบความชำนาญการวัดอัตราการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงด้วยวิธี modified Westergren จากหน่วยงานภายนอกซึ่งมีเพียงแห่งเดียวให้บริการไม่เพียงพอ ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเตรียมและประเมินวัสดุควบคุมคุณภาพการวัดอัตราการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงด้วยวิธี modified Westergren โดยวัสดุควบคุมคุณภาพประกอบด้วยเม็ดเลือดแดงรักษาสภาพด้วยกลูตารัลดีไฮด์กับพลาสมา และทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัว ตามมาตรฐาน ISO 13528:2022 หลังจากนั้นจึงส่งไปให้ห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์เพื่อทดสอบวัสดุควบคุมคุณภาพทางห้องปฏิบัติการในการทดสอบอัตราการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดงด้วยวิธี modified Westergren จำนวน 15 แห่ง 2 รอบๆ ละ 3 ตัวอย่าง มีระดับปกติ 2 ตัวอย่าง และระดับผิดปกติ 1 ตัวอย่าง การประเมินจะใช้ค่า Z-score ผลการศึกษาพบว่าวัสดุควบคุมคุณภาพทั้ง 2 ระดับ ในการเตรียมทั้ง 2 รอบ มีความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัว ผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการทั้ง 2 รอบ ให้ผลเหมือนกัน คือ วัสดุควบคุมคุณภาพระดับปกติทั้ง 2 ตัวอย่าง ให้ผลถูกต้องผ่านเกณฑ์ $|Z| < 2$ จำนวน 14 แห่ง (93.3%) และระดับผิดปกติ 1 ตัวอย่าง ให้ผลถูกต้องผ่านเกณฑ์ $|Z| < 2$ จำนวน 15 แห่ง (100%) การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าผลการทดสอบส่วนใหญ่ให้ผลถูกต้อง อย่างไรก็ตามควรมีการเพิ่มจำนวนห้องปฏิบัติการในการประเมินเพื่อเพิ่มความมั่นใจของวัสดุทดสอบมากขึ้น วัสดุควบคุมคุณภาพที่เตรียมขึ้นเองสามารถนำไปพัฒนาต่อไปเพื่อให้ได้เป็นวัสดุทดสอบความชำนาญของการวัดอัตราการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดงด้วยวิธี modified Westergren ต่อไป

คำสำคัญ: วัสดุควบคุมคุณภาพ, การวัดอัตราการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง, วิธี modified Westergren

Corresponding author E-mail: sriwanitchrak@yahoo.com

Received: 22 May 2024

Revised: 26 December 2024

Accepted: 17 January 2025

บทนำ

การวัดอัตราการตกตะกอนเม็ดเลือดแดง (Erythrocyte Sedimentation Rate; ESR) เป็นการทดสอบทางโลหิตวิทยาที่ทำได้ง่าย ราคาไม่แพง บ่งบอกภาวะอักเสบที่เกิดขึ้นในร่างกายจากโรคหลายชนิด และเป็นเครื่องบ่งชี้การเจ็บป่วย (sickness indicator) เช่น โรค Rheumatoid arthritis และโรค Polymyalgia rheumatic เป็นต้น^(1,2) ค่า ESR ที่มีความผิดปกติสามารถพบได้ในหญิงตั้งครรภ์ การติดเชื้อ โรคเมะเร็ง โรคหลอดเลือดและโรคเรื้อรังต่างๆ⁽³⁾ ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการอักเสบมากที่สุด คือ ปริมาณของโปรตีนในพลาสมา (acute phase protein) ได้แก่ fibrinogen, immunoglobulin, prothrombin, plasminogen, C-reactive protein, alpha-1 antitrypsin เป็นต้น⁽⁴⁾ อย่างไรก็ตามผู้ป่วยที่มีค่า ESR สูง จำเป็นต้องได้รับการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพิ่มเติมต่อไป ด้วย ESR ยังขาดความจำเพาะต่อโรค เนื่องจากการวัด ESR มีผลกระทบจากปัจจัยต่างๆ ที่สำคัญ ได้แก่ จำนวน ขนาด และรูปร่างของเม็ดเลือดแดง⁽⁵⁾

การตรวจ ESR วิธีที่นิยมใช้และเป็นวิธีอ้างอิง คือ วิธี Westergren ซึ่งในปี ค.ศ. 2017 International Council for Standardization in Hematology (ICSH)⁽⁶⁾ กำหนดให้เป็นวิธีมาตรฐาน ซึ่งวิธี Westergren อาศัยหลักการตกตะกอนเม็ดเลือดแดง (sedimentation) ในหลอดทดลอง ทำให้มีข้อจำกัดในการตรวจ คือ เวลาที่ใช้ในการทดสอบนาน 1 ชั่วโมง และการใช้ระบบเปิดทำให้สามารถติดเชื้อจากการสัมผัสได้ง่าย ปัจจุบันการตรวจวัด ESR มีหลายวิธีซึ่งผลการตรวจวัดที่ได้แต่ละวิธีนั้นมีความแตกต่างกันไปตามหลักการและปัจจัยต่างๆ^(3-5, 7) การทดสอบ ESR ด้วยวิธี modified Westergren เป็นการเก็บตัวอย่างเลือดในสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA เจือจางกับน้ำเกลือในอัตราส่วนเลือด 4 ส่วนต่อน้ำเกลือ 1 ส่วน (modified Westergren method) เขย่าผสมให้เข้ากัน ใช้หลอด Westergren ดูดเลือดจนถึงขีด 0 แล้วนำไปวางใน Westergren rack เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา อ่านระยะทางที่เม็ดเลือดแดงตกลงมา มีหน่วยเป็น mm/h. อย่างไรก็ตาม การตรวจ ESR จะต้องมีการควบคุมคุณภาพเพื่อความมั่นใจว่าผลการทดสอบมี

ความถูกต้องและแม่นยำ แต่วัสดุควบคุมคุณภาพสำหรับ ESR ต้องนำเข้าจากต่างประเทศและมีราคาแพง โดยส่วนประกอบของวัสดุควบคุมคุณภาพจะต้องมีเม็ดเลือดแดงและพลาสมาเพื่อให้เหมือนตัวอย่างจริง

จากการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการนำกลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) มาตรึงและรักษาสภาพเซลล์ ซึ่งเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กประกอบด้วยหมู่อัลดีไฮด์และหมู่เมทิลที่สามารถเชื่อมต่อกันระหว่างกลุ่มอะมิโน สามารถซึมผ่านเข้าเซลล์ได้อย่างรวดเร็วและเกิดการเชื่อมข้ามเส้น (cross-linking) ของโปรตีนและสร้างพันธะทางเคมีระหว่างโปรตีน เกิดเป็นสารประกอบที่แข็งแรงกว่าเดิมและมีความคงตัวอยู่นานไม่ละลายน้ำหรือสารละลายอินทรีย์^(8,9) Cluitmans JC และคณะ⁽¹⁰⁾ ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเม็ดเลือดแดงที่ตรึงสภาพด้วยกลูตารัลดีไฮด์ พบว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ตรึงสภาพด้วยกลูตารัลดีไฮด์มีความยืดหยุ่นและคงสภาพได้ดี เบญจพร เถาว์โท และคณะ⁽¹¹⁾ ศึกษาและประเมินสารควบคุมคุณภาพน้ำตาลที่มีเนื้อสารใกล้เคียงกับตัวอย่างเลือดจริงสำหรับใช้ในการควบคุมคุณภาพการตรวจวัดน้ำตาลจากเลือดปลายนิ้ว โดยเตรียมสารควบคุมคุณภาพน้ำตาลที่มีส่วนผสมของเม็ดเลือดแดงที่รักษาสภาพด้วยกลูตารัลดีไฮด์ ผลการศึกษาพบว่าสารควบคุมคุณภาพที่รักษาสภาพด้วยกลูตารัลดีไฮด์ที่ร้อยละ 1-3 สามารถใช้ได้ไม่มีผลกระทบต่อการวัดค่าของน้ำตาลที่ความเข้มข้นระดับต่ำ กลาง สูง โดยสารควบคุมคุณภาพมีคุณสมบัติความเป็นเนื้อเดียวกันและมีความคงตัวที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ และเมื่อทดสอบความแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ทั้ง 3 ระดับ

การทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing; PT) โดยหน่วยงานภายนอก (External Quality Assessment; EQA) ทำหน้าที่เป็น PT Provider จัดเตรียมและจัดส่งตัวอย่างวัสดุทดสอบ (PT item) ไปยังห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วม ซึ่งห้องปฏิบัติการจะต้องทำการทดสอบด้วยวิธีที่ใช้ในงานประจำ และทดสอบกับวัสดุทดสอบความชำนาญเสมือนตัวอย่างของผู้ป่วยและส่งผลกลับมาให้ PT provider เพื่อทำการวิเคราะห์ผลและแจ้งผลการประเมินต่อไป ในประเทศไทยมี PT provider ของโปรแกรมการทดสอบความชำนาญ

การตรวจอัตราการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดงเปิดให้บริการเพียงแห่งเดียว ให้บริการไม่เพียงพอ โดยคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่⁽¹²⁾ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพวัสดุทดสอบความชำนาญสำหรับการวัดอัตราการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงที่เตรียมขึ้นเองสำหรับวิธี modified Westergren โดยห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ของโรงพยาบาลเครือข่ายจังหวัดสกลนคร

วัสดุและวิธีการ

การเตรียมวัสดุทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing Materials; PT Materials) สำหรับ การวัดอัตราการตกตะกอนเม็ดเลือดแดง

การเตรียมวัสดุทดสอบความชำนาญสำหรับการวัดอัตราการตกตะกอนเม็ดเลือดแดง ใช้เลือดผู้บริจาคโลหิต จากงานธนาคารเลือด โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ ที่หมดอายุไม่เกิน 7 วัน ซึ่งผ่านการตรวจคัดกรองให้ผลเอชไอวี ไวรัสตับอักเสบบี และไวรัสตับอักเสบบีเป็นลบ มีผลซีฟิลิสเป็นผล non-reactive โดยมีขั้นตอนการเตรียมดังนี้ นำเลือดไปปั่นล้างด้วยสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) เข้มข้น 0.15 M pH 7.4 (Sigma, Merck, USA) ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที (Rotanta 460, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Germany) จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นนำไปตรึงและรักษาสภาพด้วยสารละลายกลูตาไรลดีไฮด์ (Loba, Loba Chemie Pvt. Ltd., India) จากการศึกษาที่ผ่านมาสามารถใช้ความเข้มข้น 1-3% ในการศึกษาจึงเลือกความเข้มข้นที่ต่ำที่สุด คือ 1% ในสารละลาย PBS pH 7.4 ในอัตราส่วน 1:2 นำเข้าเครื่องเขย่า (Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific Inc., Thailand) ให้ผสมกันที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาปั่นล้างด้วยสารละลาย sodium chloride เข้มข้นร้อยละ 0.85 (NSS) (Sigma, Merck, USA) จำนวน 3 ครั้ง หลังจากนั้นใส่สารละลาย sodium azide (NaN_3) (Sigma, Merck, USA) เข้มข้น 0.01% วัสดุทดสอบความชำนาญที่เตรียมขึ้นมามีลักษณะเหมือนตัวอย่างเลือดจริง

ขั้นตอนการเตรียมวัสดุทดสอบระดับปกติ นำเลือดที่ผ่านการตรึงมาปรับความเข้มข้นเป็น 50% ด้วยน้ำเกลือผสมกับพลาสมาของมนุษย์ในอัตราส่วน 4:6 และ 0.01% sodium azide ส่วนการเตรียมวัสดุทดสอบระดับผิดปกติจะใช้เลือดที่ผ่านการตรึงมาปรับความเข้มข้นเป็น 50% ด้วยน้ำเกลือผสมกับพลาสมาของมนุษย์ และสารช่วยเร่งการจับกลุ่มของเม็ดแดง คือ น้ำยาตรวจหมู่โลหิต (murine monoclonal blend) ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ในอัตราส่วน 4:2:6 และ 0.01% sodium azide หลังจากเตรียมวัสดุทดสอบทั้งสองระดับเสร็จแล้ว นำไปทดสอบหาค่าฮีมาโทคริต (Hematocrit; HCT) (ค่าปริมาณความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงต่อปริมาตรของเลือดทั้งหมด) ซึ่งค่าของระดับปกติและผิดปกติมีค่าเท่ากับ 20% และ 12% ตามลำดับ

หลังจากนั้นนำมาเตรียมวัสดุทดสอบความชำนาญ 2 ระดับ คือ ระดับปกติ จะมีผลการทดสอบอยู่ในช่วง 0-20 mm/hr การเตรียมประกอบด้วยเลือดที่ผ่านการตรึงและรักษาสภาพผสมกับพลาสมา และระดับผิดปกติจะมีผลการทดสอบอยู่ในช่วง มากกว่า 20 mm/hr โดยเตรียมเหมือนระดับปกติและเพิ่มน้ำยาตรวจหมู่โลหิตเป็นสารช่วยเร่งการจับกลุ่มของเม็ดแดง วิธีที่ใช้ในการทดสอบทั้งสองระดับ คือ วิธี modified Westergren เมื่อได้ผลการทดสอบตามที่กำหนดแบ่งใส่หลอดพลาستيك ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร และเก็บที่ตู้แช่อุณหภูมิต่ำ 2-8 องศาเซลเซียส (Z-COOL, ZCO-2DQ30 AE, บริษัทเซสท์-เมด จำกัด, ประเทศไทย) จากนั้นนำวัสดุทดสอบความชำนาญไปทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity) และการทดสอบความคงตัว (stability) ตามมาตรฐาน ISO 17034:2016⁽¹³⁾ โดยใช้สถิติตามที่ ISO 13528:2022⁽¹⁴⁾ ด้วยวิธี modified Westergren

การวัดอัตราการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงโดยวิธี modified Westergren

การตรวจวัด ESR โดยวิธี modified Westergren นำวัสดุทดสอบความชำนาญปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร ใส่ในน้ำเกลือปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าผสมให้เข้ากัน ใช้หลอด modified Westergren (ESR pipettes, Greiner

Bio-One, Austria) ดูดเลือดจนถึงขีด 0 แล้วนำไปวางใน Westergren rack (ESR Rack, Greiner Bio-One, Austria) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา อ่านระยะทางที่เม็ดเลือดแดงตกลงมา มีหน่วยเป็น mm/h

การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (Homogeneity testing)

การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของวัสดุทดสอบความชำนาญเพื่อความมั่นใจว่าวัสดุทดสอบไม่มีความแตกต่างกันหลังจากที่บรรจุลงในภาชนะเพื่อส่งไปให้ผู้เข้าร่วมประเมิน โดยหลังจากเตรียมวัสดุทดสอบความชำนาญเรียบร้อยแล้ว ทำการสุ่ม (random sampling) มา 10% ของจำนวนที่เตรียม ยกตัวอย่างเช่นเตรียมวัสดุทดสอบจำนวน 100 ชุด จะสุ่มมา 10 ชุด โดยจะเรียงหมายเลขชุดทดสอบจาก 1-100 แล้วแบ่งเป็น 10 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 จะมีหมายเลข 1-10 กลุ่มที่ 2 หมายเลข 11-20 แบ่งกลุ่มตามนี้จะครบ 10 กลุ่ม หลังจากนั้นจะทำการสุ่มในแต่ละกลุ่มมา 1 ชุด โดยไม่เจาะจงหมายเลข จะเป็นหมายเลขใดก็ได้แต่ได้มาจากทุกกลุ่มเพื่อตรวจสอบความเป็นเนื้อเดียวกันที่มีความน่าเชื่อถือในการเตรียมวัสดุทดสอบ

วัสดุทดสอบความชำนาญทั้ง 2 ระดับ ๆ ละ 10 ตัวอย่าง นำมาทดสอบ ESR ด้วยวิธี modified Westergren โดยทดสอบตัวอย่างละ 2 ชั่วโมง และนำค่าที่ได้จากการทดสอบมาคำนวณหาค่าความเป็นเนื้อเดียวกันตามมาตรฐาน ISO 13528:2022 ภาคผนวก B.2 และ B.3 เกณฑ์การยอมรับว่าตัวอย่างทดสอบมีความเป็นเนื้อเดียวกัน คือ $S_s < 0.3 \sigma_{pt}$ โดยค่า S_s คือ Estimate of between samples standard deviation และ σ_{pt} คือ Standard deviation of proficiency assessment หรือส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ซึ่งเกณฑ์การยอมรับว่าตัวอย่างทดสอบมีความเป็นเนื้อเดียวกัน คือ

$$S_s \leq 0.3 \sigma_{pt}$$

โดย σ_{pt} = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานซึ่งคำนวณจากการประเมินผลการทดสอบความชำนาญในแต่ละรอบ

เนื่องจากการศึกษานี้เป็นการศึกษาครั้งแรก การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันใช้สถิติ One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ในรอบที่ 1 และรอบที่ 2

การทดสอบความคงตัว

ทำการสุ่มวัสดุทดสอบความชำนาญที่ผ่านการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันมาศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวในการเก็บรักษาของตัวอย่าง อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษา 2-8 องศาเซลเซียส เก็บเป็นเวลา 1 เดือน ทำการทดสอบตั้งแต่ก่อนส่งตัวอย่างและหลังส่งตัวอย่างให้ครอบคลุมตลอดช่วงวันที่กำหนดให้ส่งผลการทดสอบ โดยเริ่มนับตั้งแต่วันที่เตรียม เช่น วันที่เตรียมวันที่ 1 วันที่ทดสอบวันที่ 7 วันที่ส่งตัวอย่างวันที่ 14 หลังจากได้รับตัวอย่าง วันที่สมาชิกทดสอบและส่งรายงานวันที่ 21 วันปิดรับผลจากสมาชิกวันที่ 30 หลังจากวันปิดรับผลจากสมาชิก 5 วัน นำตัวอย่างวัสดุทดสอบความชำนาญทั้ง 2 ระดับ ระดับละ 4 ตัวอย่าง ที่ผ่านการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันมาทดสอบ ESR ด้วยวิธี modified Westergren ทำการทดสอบตัวอย่างละ 2 ชั่วโมง นาน 1 เดือน ทำการทดสอบสัปดาห์ละ 1 ครั้ง การวิเคราะห์ผลการทดสอบเป็นไปตามมาตรฐาน ISO 13528:2022

การคำนวณ

1) พิจารณาจากค่า $|y_1 - y_2|$ โดย

y_1 = ค่าเฉลี่ยผลการทดสอบครั้งแรก (การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน)

y_2 = ค่าเฉลี่ยผลการทดสอบความคงตัวในเวลาที่กำหนด

2) เกณฑ์การตัดสินว่ามีความคงตัวเมื่อค่า $|y_1 - y_2| \leq 0.3 \sigma_{pt}$ ให้ถือว่าผลการทดสอบความคงตัวผ่านเกณฑ์โดย σ_{pt} = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานซึ่งคำนวณจากการประเมินผลการทดสอบความชำนาญในแต่ละรอบ

ห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์สมาชิกที่ทำการทดสอบ

ห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วม จำนวน 15 แห่ง ประกอบด้วย แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกษัตริย์สีระรา กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลโพธินาแก้ว โรงพยาบาลวาริชภูมิ โรงพยาบาลบ้านม่วง โรงพยาบาลพังโคน โรงพยาบาลเต่างอย โรงพยาบาลกุสุมาลย์ โรงพยาบาลส่องดาว โรงพยาบาลโคกศรีสุพรรณ โรงพยาบาลคำตากล้า โรงพยาบาลอากาศอำนวย โรงพยาบาลนิคมน้ำอุ่น โรงพยาบาลพระอาจารย์ฝั้น

อาจารย์ โรงพยาบาลพระอาจารย์แบน ธนากโร และ
โรงพยาบาลกุดบาก

การทดสอบ ESR จากห้องปฏิบัติการอ้างอิง

ทำการส่งวัสดุทดสอบความชำนาญทั้ง 2 ระดับๆ ละ 2 หลอด ไปยังห้องปฏิบัติการอ้างอิง ได้แก่ ห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลหนองบัวลำภู จังหวัดหนองบัวลำภู ห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลสุรินทร์ จังหวัดสุรินทร์ และห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์โรงพยาบาลสกลนคร จังหวัดสกลนคร ซึ่งมีหน้าที่ทดสอบคุณลักษณะ (characterization) วัสดุทดสอบ โดยเลือกห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ ที่ได้รับมาตรฐานงานเทคนิคการแพทย์ ติดต่อกันมากกว่า 3 ปี จำนวน 3 แห่ง ที่มีการทดสอบการวัดอัตราการตกตะกอนเม็ดเลือดแดง โดยวิธี modified Westergren ทั้งในรอบที่ 1 และ 2 โดยทำการทดสอบระดับละ 2 ชั่วโมง นำค่าที่ได้มาหาค่า Mean, SD และ $\text{Mean} \pm 2\text{SD}$ ซึ่งห้องปฏิบัติการอ้างอิงจะไม่ได้เข้าร่วมในการประเมินวัสดุทดสอบความชำนาญ นำค่าที่ได้จากห้องปฏิบัติการอ้างอิงมาเปรียบเทียบกับค่าของผู้วิจัย เพื่อยืนยันผลการทดสอบวัสดุทดสอบว่ามีค่าถูกต้องเมื่อเปรียบเทียบกับห้องปฏิบัติการอ้างอิง โดยเครื่องมือที่ใช้ต้องผ่านการสอบเทียบ

การประเมินวัสดุควบคุมคุณภาพโดยสมาชิกห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์

นำส่งวัสดุทดสอบความชำนาญที่พัฒนาขึ้นเพื่อให้สมาชิกห้องปฏิบัติการ จำนวน 15 แห่ง ในโรงพยาบาลเครือข่ายจังหวัดสกลนคร ซึ่งห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมประเมินทั้งหมดใช้วิธีทดสอบ ESR ด้วยวิธี modified Westergren ที่ใช้ในงานประจำโดยทำการประเมิน 2 รอบ โดยรอบที่ 1 เดือนมีนาคม 2566 และรอบที่ 2

เดือนกันยายน พ.ศ. 2566 โดยแต่ละรอบจัดส่ง จำนวน 3 ตัวอย่าง ให้รหัสแต่ละตัวอย่างในรอบที่ 1 มีระดับปกติ จำนวน 2 ตัวอย่าง (ESR1_1, ESR1_2) เป็นตัวอย่างเดียวกัน และระดับผิดปกติ จำนวน 1 ตัวอย่าง (ESR1_3) ในรอบที่ 2 มีระดับปกติ จำนวน 2 ตัวอย่าง (ESR2_1, ESR2_2) เป็นตัวอย่างเดียวกัน และระดับผิดปกติ จำนวน 1 ตัวอย่าง (ESR2_3) โดยให้มารับที่ห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลค่ายกษณีสวรรค์ ซึ่งเป็นโรงพยาบาลแม่ข่ายรับผิดชอบการทดสอบ ESR พร้อมภาชนะน้ำส่งที่บรรจุอุณหภูมิเย็นเพื่อรักษาอุณหภูมิ รวมทั้งเอกสารประกอบการทดสอบการรายงานผลและระยะเวลาการส่งผล ซึ่งห้องปฏิบัติการดังกล่าวจะต้องลงนามยินยอมเข้าร่วมงานวิจัย การหาค่ากำหนด (assigned value) ค่ากำหนดของแต่ละวัสดุทดสอบความชำนาญได้มาจากนำผลการทดสอบของสมาชิกห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมประเมิน (Consensus value from participants) ตามมาตรฐาน ISO 17043:2023 ข้อกำหนดที่ 7.2.3 Determination of assigned values ซึ่งให้ใช้วิธีตามมาตรฐาน ISO 13528:2022 มาตรฐานนี้ได้กำหนดว่าก่อนที่จะหาค่ากำหนดให้พิจารณาข้อมูลก่อนว่ามีค่าที่เป็น outliers หรือไม่ กรณีที่พบว่าให้มีเอาค่าที่เป็น outliers ออกก่อนตามข้อกำหนดที่ 6.6.3 สามารถใช้ Grubbs' test (<https://xcatliu.github.io/grubbs/?base=on>) ในการหาว่าข้อมูลที่ได้มี outliers หรือไม่ แล้วจึงจะนำข้อมูลที่เหลือมาคำนวณหาค่ากำหนดต่อไป ซึ่งจะทำในทุกรอบของการทดสอบ^(14,15)

การประเมินการทดสอบ นำผลการทดสอบของแต่ละห้องปฏิบัติการมาหาค่า Mean, SD และเกณฑ์การประเมินสำหรับการทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ตามค่า Z-score ดังนี้

สูตรในการคำนวณค่า Z-score

$$Z\text{-Score} = \frac{\text{ผลวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมโครงการ} - \text{ค่าเฉลี่ยของผลวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการสมาชิกในกลุ่ม}}{\text{ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน}}$$

$ Z < 2.0$	แสดงว่าผลการทดสอบนั้น ยอมรับได้ (acceptable)
$2.0 < Z < 3.0$	แสดงว่าผลการทดลองนั้น น่าสงสัย (questionable)
$ Z > 3$	แสดงว่าผลการทดสอบนั้น ยอมรับไม่ได้ (unacceptable)

จริยธรรมการวิจัย

การศึกษานี้ได้รับการรับรองจากจริยธรรมการวิจัย
ในคน มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์ รหัส
โครงการวิจัยที่ 66AH041 ลงวันที่ 16 ตุลาคม พ.ศ. 2566

ผล

ผลการเตรียมวัสดุทดสอบความชำนาญสำหรับการวัด
อัตราการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดงด้วยวิธี
modified Westergren

ผลการศึกษาพบว่าสามารถเตรียมวัสดุทดสอบ
ความชำนาญโดยนำเลือดที่หมดอายุมาแปรรูปเพื่อรักษา
สภาพเม็ดเลือดแดงให้สามารถอยู่ได้นานมากขึ้นด้วย
สารกลูตาไรต์ไฮโดรเจนซัลไฟด์ 1% เนื่องจากเป็นเปอร์เซ็นต์
ที่น้อยที่สุดที่ยังสามารถนำมาใช้ได้ หลังจากเตรียมใน
แต่ละรอบทำการสุ่มตัวอย่าง ผลการเตรียมวัสดุทดสอบ
ความชำนาญระดับปกติและระดับผิดปกติ ในรอบที่ 1
ระดับปกติ เท่ากับ 1-3 mm/hr ระดับผิดปกติ เท่ากับ
44-47 mm/hr รอบที่ 2 ระดับปกติ เท่ากับ 1-3 mm/hr
ระดับผิดปกติ เท่ากับ 44-47 mm/hr ดังแสดงใน
ตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยผลการทดสอบของวัสดุทดสอบความชำนาญการวัดอัตราการตกตะกอนเม็ดเลือดแดง (ESR)
ด้วยวิธี modified Westergren ในการเตรียมรอบที่ 1 และรอบที่ 2 โดยวัสดุทดสอบความชำนาญที่สุ่ม
มาในแต่ละรอบๆ ละ 10 ชุด หมายเลขแสดงถึงจำนวนที่สุ่มออกมา

ผลการทดสอบ ESR (mm/hr)				
วัสดุทดสอบ ความชำนาญ (n = 10)	รอบที่ 1		รอบที่ 2	
	ระดับปกติ (mm/hr)	ระดับผิดปกติ (mm/hr)	ระดับปกติ (mm/hr)	ระดับผิดปกติ (mm/hr)
1	2	47	2	47
2	3	46	3	46
3	2	46	2	45
4	3	46	3	46
5	2	45	2	45
6	2	45	2	46
7	2	45	3	45
8	2	45	2	45
9	2	45	2	46
10	2	46	3	46
Mean	2.20	45.60	2.40	45.70
SD	0.42	0.70	0.50	0.70
Mean ± 2SD	2.20 ± 0.42	45.60 ± 0.70	2.40 ± 0.50	45.70 ± 0.70

ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน

ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของวัสดุ
ทดสอบ ESR ระดับปกติและระดับผิดปกติ โดยสุ่ม
ตัวอย่างมา 10 ตัวอย่างต่อระดับ แล้วทำการทดสอบ

ตัวอย่างละ 2 ข้าง ของการเตรียมรอบที่ 1 และ 2 ดังแสดง
ในตารางที่ 2 พบว่าวัสดุทดสอบผ่านการทดสอบความเป็น
เนื้อเดียวกันทุกตัวอย่าง โดยใช้สถิติ One-way ANOVA
ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตามสูตร $S_s \leq 0.3 \sigma_{pt}$ จะถือว่าผ่านเกณฑ์โดยค่า σ_{pt} ได้มาจากค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของผู้เข้าร่วมประเมินความชำนาญในแต่ละรอบ ในรอบที่ 1 ระดับปกติ ค่า $S_s = 0.24$ ค่า $0.3 \sigma_{pt} = 0.64$ และระดับผิดปกติ

ค่า $S_s = 0.29$ ค่า $0.3 \sigma_{pt} = 2.26$ ในรอบที่ 2 ระดับปกติ ค่า $S_s = 0.45$ ค่า $0.3 \sigma_{pt} = 0.48$ และระดับผิดปกติ ค่า $S_s = 0.21$ ค่า $0.3 \sigma_{pt} = 0.59$ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 2 การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันรายตัวอย่าง ของการทดสอบ ESR ระดับปกติและระดับผิดปกติ โดยสุ่มตัวอย่างมา 10 ตัวอย่างต่อระดับ แล้วทำการทดสอบตัวอย่างละ 2 ชั่วโมงของการเตรียมรอบที่ 1 และ 2

ผลการทดสอบ ESR (mm/hr)								
รอบที่ 1					รอบที่ 2			
วัสดุทดสอบความชำนาญ (n = 10)	ระดับปกติ (mm/hr)		ระดับผิดปกติ (mm/hr)		ระดับปกติ (mm/hr)		ระดับผิดปกติ (mm/hr)	
1	2	2	45	45	3	3	45	45
2	3	3	45	45	3	3	46	45
3	2	2	47	45	2	2	46	44
4	3	3	46	47	3	3	46	47
5	3	3	45	45	2	2	45	45
6	2	2	46	47	2	2	46	47
7	3	3	45	45	3	3	45	45
8	2	2	44	47	3	3	44	47
9	2	2	45	45	2	3	45	45
10	2	2	46	47	3	3	46	47
Mean	2.40		45.60		2.65		45.55	
SD	0.52		0.70		0.47		0.69	
Mean $\pm$ 2SD	2.40 $\pm$ 0.52		45.60 $\pm$ 0.70		2.65 $\pm$ 0.47		45.55 $\pm$ 0.69	

ตารางที่ 3 การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของวัสดุทดสอบความชำนาญการวัดอัตราการตกตะกอนเม็ดเลือดแดง ด้วยวิธี modified Westergren ในรอบที่ 1 และรอบที่ 2

รอบ	PT items		S_s	σ_{pt}	$0.3\sigma_{pt}$	$S_s < 0.3\sigma_{pt}$
1	ระดับปกติ	ESR1_1	0.24	2.14	0.64	ผ่านเกณฑ์
	ระดับผิดปกติ	ESR1_3	0.29	7.54	2.26	ผ่านเกณฑ์
2	ระดับปกติ	ESR2_1	0.45	1.60	0.48	ผ่านเกณฑ์
	ระดับผิดปกติ	ESR2_3	0.21	1.96	0.59	ผ่านเกณฑ์

หมายเหตุ: รหัส ESR1_1, ESR1_2 และ ESR1_3 หมายถึงการส่งวัสดุทดสอบรอบที่ 1 ของตัวอย่างที่ 1, 2 และ 3
รหัส ESR2_1, ESR2_2 และ ESR2_3 หมายถึงการส่งวัสดุทดสอบรอบที่ 2 ของตัวอย่างที่ 1, 2 และ 3

ผลการทดสอบความคงตัว

ผลการทดสอบความคงตัวของวัสดุทดสอบความชำนาญการทดสอบ ESR ซึ่งทำการทดสอบทั้งระดับปกติและผิดปกติ ตัวอย่างละ 2 ชั่วโมงของการเตรียมในรอบที่ 1 และ 2 จะทดสอบนาน 1 เดือน (สัปดาห์ที่ 1, 2, 3, และ 4)

ดังแสดงในตารางที่ 4 พบว่าวัสดุทดสอบผ่านการทดสอบความคงตัวทุกตัวอย่างทั้งรอบที่ 1 และรอบที่ 2 ตามสูตร $|y_1 - y_2| < 0.3\sigma_{pt}$ จะถือว่าผ่านเกณฑ์ โดยค่า σ_{pt} ได้มาจากค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของผู้เข้าร่วมประเมินความชำนาญในแต่ละรอบ ในรอบที่ 1 ระดับปกติ

ค่า $|y_1 - y_2| = 0.10$ ค่า $0.3\sigma_{pt} = 0.64$ และระดับผิดปกติ
ค่า $|y_1 - y_2| = 0.60$ ค่า $0.3\sigma_{pt} = 2.26$ ในรอบที่ 2
ระดับปกติ ค่า $|y_1 - y_2| = 0.35$ ค่า $0.3\sigma_{pt} = 0.48$ และ
ระดับผิดปกติ ค่า $|y_1 - y_2| = 0.55$ ค่า $0.3\sigma_{pt} = 0.59$
ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความคงตัวของตัวอย่าง ของการทดสอบ ESR ซึ่งทำการทดสอบทั้งระดับปกติและผิดปกติ
ตัวอย่างละ 2 ชั่วโมง การเตรียมในรอบที่ 1 และ 2 จะทดสอบนาน 1 เดือน (สัปดาห์ที่ 1, 2, 3, และ 4)

ผลการทดสอบ ESR (mm/hr)								
รอบที่ 1					รอบที่ 2			
สัปดาห์ที่ (n = 4)	ระดับปกติ (mm/hr)	ระดับผิดปกติ (mm/hr)	ระดับปกติ (mm/hr)	ระดับผิดปกติ (mm/hr)	ระดับปกติ (mm/hr)	ระดับผิดปกติ (mm/hr)	ระดับปกติ (mm/hr)	ระดับผิดปกติ (mm/hr)
1	3	3	45	44	3	3	45	45
2	2	2	44	45	3	3	45	45
3	2	2	45	45	3	3	45	45
4	3	3	45	45	3	3	45	45

ตารางที่ 5 การทดสอบความคงตัวของวัสดุทดสอบความชำนาญการวัดอัตราการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงระดับปกติ
และผิดปกติด้วยวิธี modified Westergren ในรอบที่ 1 และรอบที่ 2

รอบ	PT items	Mean (mm/hr)		$ y_1 - y_2 $	σ_{pt}	$0.3\sigma_{pt}$	$ y_1 - y_2 < 0.3\sigma_{pt}$	
		(y1)	(y2)					
1	ระดับปกติ	ESR1_1	2.40	2.50	0.10	2.14	0.64	ผ่านเกณฑ์
	ระดับผิดปกติ	ESR1_2	45.60	45.00	0.60	7.54	2.26	ผ่านเกณฑ์
		ESR1_3						
2	ระดับปกติ	ESR2_1	2.65	3.00	0.35	1.60	0.48	ผ่านเกณฑ์
	ระดับผิดปกติ	ESR2_2	45.55	45.00	0.55	1.96	0.59	ผ่านเกณฑ์
		ESR2_3						

หมายเหตุ: รหัส ESR1_1, ESR1_2 และ ESR1_3 หมายถึงการส่งวัสดุทดสอบรอบที่ 1 ของตัวอย่างที่ 1, 2 และ 3

รหัส ESR2_1, ESR2_2 และ ESR2_3 หมายถึงการส่งวัสดุทดสอบรอบที่ 2 ของตัวอย่างที่ 1, 2 และ 3

ผลการทดสอบ ESR จากห้องปฏิบัติการอ้างอิง

วัสดุทดสอบความชำนาญระดับปกติและผิดปกติที่ผ่านการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวถูกส่งไปทดสอบ ESR ด้วยวิธี modified Westergren ที่ห้องปฏิบัติการอ้างอิงซึ่งเป็นห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ที่ได้รับมาตรฐานงานเทคนิคการแพทย์ พ.ศ. 2565 จำนวน 3 แห่ง ทั้งรอบที่ 1 และ 2 โดย

จะทำการทดสอบทั้ง 2 ระดับ ระดับละ 2 ชั่วโมง เพื่อนำค่าที่ได้มาหาค่า mean, SD และ $mean \pm 2SD$ ดังแสดงในตารางที่ 6 ในรอบที่ 1 ระดับปกติเท่ากับ 2-3 mm/hr ระดับผิดปกติ เท่ากับ 45-46 mm/hr รอบที่ 2 ระดับปกติ เท่ากับ 2-3 mm/hr ระดับผิดปกติ เท่ากับ 44-45 mm/hr ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบ ESR ด้วยวิธี modified Westergren ในรายตัวอย่าง จากห้องปฏิบัติการอ้างอิง จำนวน 3 แห่ง ทั้งรอบที่ 1 และ 2 โดยจะทำการทดสอบทั้ง 2 ระดับ ๆ ละ 2 ชั่วโมง

ผลการทดสอบ ESR (mm/hr)									
รอบที่ 1					รอบที่ 2				
ห้องปฏิบัติการ อ้างอิง (n = 3)	ระดับปกติ (n = 3)		ระดับผิดปกติ (mm/hr)		ระดับปกติ (mm/hr)		ระดับผิดปกติ (mm/hr)		
1	3	3	45	45	2	2	45	45	
2	2	3	46	45	3	2	45	44	
3	3	3	46	45	2	2	45	45	
Mean	2.83		45.33		2.17		44.83		
SD	0.29		0.29		0.29		0.29		
Mean $\pm$ 2SD	2.83 $\pm$ 0.29		45.33 $\pm$ 0.29		2.17 $\pm$ 0.29		44.83 $\pm$ 0.29		

ผลการประเมินวัสดุทดสอบความชำนาญโดยสมาชิก ห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์

ผลการประเมินวัสดุทดสอบความชำนาญที่พัฒนาขึ้นเองสำหรับการทดสอบ ESR จัดส่งไปยังห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์จำนวน 15 แห่ง ในเครือข่ายโรงพยาบาลจังหวัดสกลนคร ทดสอบและเก็บข้อมูล 2 รอบ โดยแต่ละรอบมีจำนวน 3 ตัวอย่าง

ผลการทดสอบรอบที่ 1 จากข้อมูลที่ได้รับนำไปวิเคราะห์หาค่าที่เป็น outliers จากการใช้ Grubbs' test พบว่ารหัสตัวอย่าง ESR1_1 มีข้อมูลที่เป็น outlier 1 ค่า รหัสตัวอย่าง ESR1_2 มีข้อมูลที่เป็น outliers 2 ค่า รหัสตัวอย่าง ESR1_3 ไม่มีข้อมูลที่เป็น outlier ค่า mean และ median ที่ได้ของตัวอย่างรหัสตัวอย่าง ESR1_1 และ รหัสตัวอย่าง ESR1_2 ได้เท่ากันคือ mean เท่ากับ 3 และ median เท่ากับ 2 รหัสตัวอย่าง ESR1_3 มีค่า mean เท่ากับ 45 และ median เท่ากับ 45 เมื่อนำมาวิเคราะห์ผลด้วย Z-score พบว่าตัวอย่างทดสอบรหัส

ตัวอย่าง ESR1_1 ให้ผลยอมรับได้ จำนวน 14 แห่ง และยอมรับไม่ได้ จำนวน 1 แห่ง รหัสตัวอย่าง ESR1_2 ให้ผลยอมรับได้ จำนวน 12 แห่ง น่าสงสัย จำนวน 1 แห่ง และยอมรับไม่ได้ จำนวน 2 แห่ง รหัสตัวอย่าง ESR1_3 ให้ผลยอมรับได้ จำนวน 15 แห่ง ดังแสดงในตารางที่ 7

ผลการทดสอบรอบที่ 2 จากข้อมูลที่ได้รับนำไปวิเคราะห์หาค่าที่เป็น outliers จากการใช้ Grubbs' test พบว่ารหัสตัวอย่าง ESR2_1 และ ESR2_2 มีข้อมูลที่เป็น outlier อย่างละ 1 ค่า รหัสตัวอย่าง ESR2_3 ไม่มีข้อมูลที่เป็น outlier ค่า mean, median ที่ได้ของตัวอย่างรหัสตัวอย่าง ESR2_1 และ รหัสตัวอย่าง ESR2_2 ได้เท่ากันคือ mean เท่ากับ 4 และ median เท่ากับ 4 รหัสตัวอย่าง ESR2_3 มีค่า mean เท่ากับ 43 และ median เท่ากับ 43 เมื่อนำมาวิเคราะห์ผลด้วย Z-score พบว่าตัวอย่างทดสอบรหัสตัวอย่าง ESR2_1 และ ESR2_2 ให้ผลยอมรับได้ จำนวน 14 แห่ง และยอมรับไม่ได้ จำนวน 1 แห่ง รหัสตัวอย่าง ESR1_3 ให้ผลยอมรับได้ จำนวน 15 แห่ง ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบวัสดุทดสอบความชำนาญการวัดอัตราการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงด้วยวิธี modified Westergren ของห้องปฏิบัติการ ประเมินด้วย Z-score ($|Z| < 2$ = ยอมรับ, $2.0 < |Z| < 3.0$ น่าสงสัย, $|Z| > 3$ = ยอมรับไม่ได้) รอบที่ 1

รหัส รพ. หมายเลข	วัสดุทดสอบความชำนาญ					
	ESR1_1	Z-score	ESR1_2	Z-score	ESR1_3	Z-score
1	2	-0.523	2	-0.60	41	-0.57
2	2	-0.523	2	-0.60	33	-1.63
3	1	-1.440	1	-1.56	46	0.10
4	3	0.394	3	0.37	45	-0.04
5	2	-0.523	2	-0.60	34	-1.49
6	2	-0.523	2	-0.60	43	-0.30
7	2	-0.523	2	-0.60	42	-0.43
8	2	-0.523	5	2.29	53	1.03
9	2	-0.523	3	0.37	52	0.89
10	5	2.229	3	0.37	40	-0.70
11	3	0.394	3	0.37	48	0.36
12	4	1.312	2	-0.60	60	1.95
13	2	-0.523	4	1.33	55	1.29
14	4	1.312	8	5.17	47	0.23
15	8	4.982	10	7.10	40	-0.70
Mean	3		3		45	
Median	2		2		45	
SD	1.09		1.04		7.54	
Uncertainty	0.35		0.34		2.41	
ยอมรับได้		14		12		15
น่าสงสัย		0		1		0
ยอมรับไม่ได้		1		2		0

หมายเหตุ: Standard division (SD) ที่ตัด outliers ออกแล้ว นำค่าที่ได้ไปใช้ในการคิดค่า Z-score

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบวัสดุทดสอบความชำนาญการวัดอัตราการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงด้วยวิธี modified Westergren ของห้องปฏิบัติการประเมินด้วย Z-score ($|Z| < 2$ = ยอมรับ, $2.0 < |Z| < 3.0$ น่าสงสัย, $|Z| > 3$ = ยอมรับไม่ได้) รอบที่ 2

รหัส รพ. หมายเลข	วัสดุทดสอบความชำนาญ					
	ESR1_1	Z-score	ESR1_2	Z-score	ESR1_3	Z-score
1	4	0.00	10	11.76	45	1.02
2	3	-1.37	4	0.00	42	-0.51
3	5	1.37	5	1.96	40	-1.53
4	4	0.00	4	0.00	45	1.02
5	4	0.00	4	0.00	43	0.00
6	4	0.00	5	1.96	45	1.02

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบวัสดุทดสอบความชำนาญการวัดอัตราการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงด้วยวิธี modified Westergren ของห้องปฏิบัติการประเมินด้วย Z-score ($|Z| < 2$ = ยอมรับ, $2.0 < |Z| < 3.0$ น่าสงสัย, $|Z| > 3$ = ยอมรับไม่ได้) รอบที่ 2 (ต่อ)

รหัส รพ. หมายเลข	วัสดุทดสอบความชำนาญ					
	ESR1_1	Z-score	ESR1_2	Z-score	ESR1_3	Z-score
7	3	-1.37	5	1.96	43	0.00
8	3	-1.37	4	0.00	42	-0.51
9	4	0.00	4	0.00	40	-1.53
10	4	0.00	4	0.00	41	-1.02
11	5	1.37	5	1.96	45	1.02
12	5	1.37	5	1.96	44	0.51
13	5	1.37	4	0.00	40	-1.53
14	4	0.00	5	1.96	45	1.02
15	10	8.22	4	0.00	43	0.00
Mean	4		4		43	
Median	4		4		43	
SD	0.73		0.51		1.96	
Uncertainty	0.24		0.16		0.63	
ยอมรับได้		14		14		15
น่าสงสัย		0		0		0
ยอมรับไม่ได้		1		1		0

หมายเหตุ: Standard division (SD) ที่ตัด outliers ออกแล้ว นำค่าที่ได้ไปใช้ในการคิดค่า Z-score

วิจารณ์

ปัจจุบันการทดสอบความชำนาญทางห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์มีความสำคัญต่อผลการทดสอบ ปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ผลการทดสอบมีคุณภาพ คือ การควบคุมคุณภาพจากองค์กรภายนอก การทดสอบการตรวจอัตราการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง (ESR) เป็นหนึ่งในการทดสอบที่ต้องมีการควบคุมคุณภาพ จากผลงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาวัสดุควบคุมคุณภาพสำหรับการตรวจอัตราการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง จากเลือดสด มีรายงานว่ามีการใช้งานระยะสั้น⁽¹⁶⁾ ในปัจจุบันมีหน่วยงานที่ให้บริการไม่เพียงพอ อาจเกิดจากตัวอย่างวัสดุควบคุมคุณภาพส่วนใหญ่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศและมีราคาแพง หน่วยงานที่ให้บริการภายในประเทศมีเพียงแห่งเดียวที่ให้บริการ ทำให้เป็นข้อจำกัดในการให้บริการ

ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวัสดุทดสอบความชำนาญการทดสอบ ESR โดยใช้สารกลูตารัลดีไฮด์ช่วยรักษาสภาพและผสมพลาสมาเพื่อให้วัสดุทดสอบความชำนาญที่เตรียมมีคุณลักษณะเหมือนตัวอย่างเลือดจริงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการทดสอบ เนื่องจากปัจจุบันห้องปฏิบัติการหลายแห่งยังต้องใช้เลือดจริงในการทดสอบ โดยใช้เลือดที่เหลือจากการทดสอบในห้องปฏิบัติการในแต่ละวัน ซึ่งมักมีปริมาณเลือดเหลือไม่เพียงพอ หรือต้องเจาะเลือดใหม่จากบุคคลากรในห้องปฏิบัติการ แต่ก็มีปัญหาที่ไม่มีตัวอย่างทดสอบที่ผิดปกติ แหล่งที่ได้มาของตัวอย่างทดสอบทั้งสองวิธีก็มีข้อจำกัดที่จะต้องรับทำการทดสอบเพื่อป้องกันการแตกของเม็ดเลือดแดงหากเก็บไว้นาน ดังนั้นตัวอย่างวัสดุทดสอบความชำนาญที่เตรียมขึ้นจะช่วยแก้ปัญหาที่เกิดขึ้น นอกจากนี้ข้อจำกัดอีกประการของตัวอย่างทดสอบที่นำเข้าจากต่างประเทศคือมีราคาแพง

โดยทั่วไปมีราคาเฉลี่ย 500 บาทต่อมิลลิลิตร วัสดุทดสอบความชำนาญที่ผลิตขึ้นในงานวิจัยนี้มีต้นทุนส่วนใหญ่ คือ สารเคมีกลูตารัลดีไฮด์และสารช่วยเร่งการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ในส่วนเม็ดเลือดแดงและพลาสมา ได้มาจากเลือดที่หมดอายุ เมื่อคิดค่าใช้จ่ายในการเตรียมทั้งหมด พบว่าในการผลิตเฉลี่ย 100 บาทต่อมิลลิลิตร ทำให้ช่วยลดค่าใช้จ่ายในงานคุณภาพของห้องปฏิบัติการ

การประเมินการนำไปใช้จริงของตัวอย่างวัสดุทดสอบความชำนาญการวัดอัตราการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงด้วยวิธี modified Westergren จากห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์จำนวน 15 แห่ง ในเครือข่ายโรงพยาบาลจังหวัดสกลนคร โดยส่งตัวอย่าง จำนวน 3 ตัวอย่างต่อครั้ง ซึ่งในแต่ละครั้งทั้ง 3 ตัวอย่าง โดยมีทั้งระดับปกติจำนวน 2 ตัวอย่าง และผิดปกติจำนวน 1 ตัวอย่าง เหตุผลที่ต้องส่ง 3 ตัวอย่างต่อครั้ง เนื่องจากตัวอย่างที่ปกติเป็นตัวอย่างเดียวกัน เช่น รอบที่ 1 รหัส ESR1_1, ESR1_2 และรอบที่ 2 รหัส ESR2_1, ESR2_2 ผู้วิจัยต้องการทดสอบความแม่นยำของผู้ทำการทดสอบ ซึ่งผู้ให้บริการทดสอบส่วนใหญ่จะให้ตัวอย่าง จำนวน 2 ตัวอย่าง คือ ได้ตัวอย่างที่ปกติและผิดปกติ จากผลการทดสอบรอบที่ 1 และ 2 ผลการทดสอบที่ได้จากสมาชิกห้องปฏิบัติการโดยพิจารณาจากค่า Z-score ของการประเมินวัสดุทดสอบความชำนาญ พบว่า วัสดุทดสอบที่ส่งไปประเมินสมาชิกส่วนใหญ่ให้ผลยอมรับได้ที่ค่า $|Z| < 2$ ถึงร้อยละ 93.3 แสดงว่าในเบื้องต้นที่พัฒนาวัสดุให้ผลการทดสอบเป็นที่น่าพอใจ เนื่องจากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นเพื่อจะพัฒนาวัสดุทดสอบความชำนาญที่มีความเหมาะสมนำไปใช้สำหรับทดสอบความชำนาญการวัดอัตราการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดงสำหรับวิธี modified Westergren เท่านั้น

โดยสรุปการศึกษานี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นที่ทำการวิจัยมีการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัว เพื่อให้สอดคล้องกับมาตรฐานที่กำหนด เช่น ISO 17043:2023 และ ISO 13528:2022 วัสดุทดสอบอาจสามารถนำไปใช้หรือต่อยอดในการทดสอบความชำนาญได้ เนื่องจากการศึกษาเบื้องต้น ดังนั้นจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมมากกว่านี้ เช่น การทดสอบ Short-term stability (Transportation stability)

รวมทั้งเพิ่มกลุ่มสมาชิกห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ที่ประเมินมากยิ่งขึ้น

สรุป

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการเตรียมวัสดุทดสอบความชำนาญการวัดอัตราการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดงที่เตรียมขึ้นเองสำหรับวิธี modified Westergren พบว่า วัสดุทดสอบที่เตรียมขึ้นเอง มีความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัว และเมื่อส่งไปให้สมาชิกห้องปฏิบัติการเพื่อทดสอบผลที่ได้ส่วนใหญ่ให้ผลเป็นที่ยอมรับได้ การศึกษานี้เป็นการศึกษาเบื้องต้น เพื่อจะนำข้อมูลที่ได้ไปศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้มีความเหมาะสมตามมาตรฐานที่กำหนดและพัฒนานำไปสู่การให้บริการทดสอบความชำนาญต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ พันเอก จัตรมงคล คนชัยน นักเทคนิคการแพทย์ หัวหน้าห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลค่ายกษัตริย์ศึก จังหวัดสกลนคร ที่สนับสนุนการดำเนินงาน จัดส่งวัสดุทดสอบและรวบรวมข้อมูลผลการทดสอบ จนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Brigden ML. Clinical utility of the erythrocyte sedimentation rate. Am Fam Physician 1999; 60 (5): 1443-50.
2. Bochen K, Krasowska A, Milaniuk S, Kulczynska M, Prystupa A, Dzida G. Erythrocyte sedimentation rate—an old marker with new applications. J Pre Clin Clin Res 2011; 5(2): 50-5.
3. Diggs. Sedimentation rate. In: Miller SE, editor. A textbook of clinical pathology. 6th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1960. p. 47-50.
4. Noe DA, Rock RC. Geriatrics. In: Noe DA, Rock RC, editors. Laboratory medicine. Maryland: William & Wilkins; 1994. p. 179-182.

5. Bray WE. Sedimentation velocity of red blood cells. In: Bray WE, editor. Clinical laboratory methods. 5th ed. St Louis: Mosby; 1957. p. 190-192.
6. Kratz A, Plebani M, Peng M, Lee YK, McCafferty R, Machin SJ. ICSH recommendations for modified and alternate methods measuring the erythrocyte sedimentation rate. Int J Lab Hematol 2017; 39(5): 448-57.
7. Ravel R. Miscellaneous diagnostic procedures. In: Richard R, editor. Clinical laboratory medicine: clinical application of laboratory data. 6th ed. St Louis: Mosby, 1995. p. 639-649.
8. Kiernan JA. Formaldehyde, formalin, para-formaldehyde and glutaraldehyde: what they are and what they do. Microsc Today 2000; 8: 8-13.
9. Yan EK, Cao HL, Zhang CY, Lu QQ, Ye YJ, He J, et al. Cross-linked protein crystals by glutaraldehyde and their applications. RSC Adv 2015; 5: 26163-74.
10. Cluitmans JC, Chokkalingam V, Janssen AM, Brock R, Huck WT, Bosman GJ. Alterations in red blood cell deformability during storage: a microfluidic approach. Biomed Res Int 2014; 2014: 764268. (9 pages).
11. เบญจพร เถาว์โท, ปราโมทย์ ศรีวานิชรักษ์, สุดาวดี คงขำ, สมศักดิ์ ฟองสุภา. การพัฒนาและประเมินสารควบคุมคุณภาพน้ำตาลที่มีส่วนผสมของเม็ดเลือดแดงสำหรับเครื่องตรวจวัดน้ำตาลจากเลือดปลายนิ้ว. ว เทคนิคการแพทย์ 2564; 49(1): 7653-75.
12. โครงการทดสอบความชำนาญการตรวจอัตราการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง (EQA Program for Erythrocyte Sedimentation Rate). [ออนไลน์]. 2567; [สืบค้น 19 พ.ค. 2567]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://www.ams.cmu.ac.th/main/web/index.php/site/article?id=1915>.
13. ISO 17034:2016. General requirements for the competence of reference material producers. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2016.
14. ISO 13528:2022. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2022.
15. ISO/IEC 17043:2023 Conformity assessment – General requirements for the competence of proficiency testing providers. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2023.
16. Plebani M, Piva E. Erythrocyte sedimentation rate: use of fresh blood for quality control. Am J Clin Pathol 2002; 117(4): 621-6.

Evaluation of Control Materials for Erythrocyte Sedimentation Rate Measurement by Using the Modified Westergren Method

Nundakorn Kittisuk¹, Somsak Fongsupa², Sudawadee Kongkhum³,
and Pramote Sriwanitchrak^{1,3}

¹*Master of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Pathum Thani 12120, Thailand*

²*Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Pathumthani University, Pathum Thani 12000, Thailand*

³*Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Pathum Thani 12120, Thailand*

ABSTRACT Erythrocyte Sedimentation Rate (ESR) measurement is a widely used test to assess inflammation or response in the acute phase. There is only one service unit available in Thailand which is insufficient, thus, proficiency testing (PT) materials need to be developed to supply to establish more test sites. This study aimed to evaluate the control materials prepared for ESR testing with the modified Westergren method. The materials consisted of glutaraldehyde-preserved red blood cells and plasma evaluated for homogeneity and stability according to the ISO 13528:2022 standards. Following these, the material samples were sent to 15 medical technology laboratories for evaluation over 2 rounds. Each round consisted of 3 samples: 2 samples were at normal levels and 1 sample at abnormal levels. The Z-score value was used to assess the results, with a value of $|Z| < 2$ considered passing. The study results showed that the ESR control materials at both levels in both rounds of preparation were homogeneous and stable. The evaluation of ESR control material samples by 15 medical technology laboratories found consistent results. For the normal level, 2 samples had $|Z| < 2$ in 14 laboratories (93.3%), and for the abnormal level, 1 sample had $|Z| < 2$ in all 15 laboratories (100%). This study demonstrated that most laboratories provide accurate test results. However, increasing the number of laboratories in the evaluation would further enhance confidence in these control materials. Further development of these control materials will lead to the self-prepared proficiency testing materials for ESR proficiency testing of the modified Westergren method.

Keywords: Control materials, Erythrocyte sedimentation rate, Modified Westergren method

การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพาในประเทศไทยโดยใช้วัสดุอ้างอิงแปรรูปจากเลือด

วันเพ็ญ ดวงสว่าง เรณูภา ภูอาลัย และ อีรุฒิ บุญรักษา

สำนักวิจัยและเครื่องมือแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ การเลือกใช้เครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพาที่มีผลการวัดน่าเชื่อถือ เป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยให้การคัดกรอง การติดตามการรักษา และการควบคุมโรคเบาหวานมีประสิทธิภาพ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพาที่วางจำหน่ายในประเทศไทย โดยใช้วัสดุอ้างอิงแปรรูปจากเลือดจำนวน 3 ระดับความเข้มข้น คือ 86 ± 3.0 mg/dL, 124 ± 5.0 mg/dL และ 192 ± 6.0 mg/dL ทดสอบกับเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพาหลักการ amperometry-glucose dehydrogenase (GDH) จำนวน 20 เครื่อง จาก 11 ยี่ห้อ และหลักการ photometry-glucose oxidase (GOx) จำนวน 2 เครื่อง จาก 1 ยี่ห้อ และความเข้มข้น 64 ± 5.0 mg/dL, 76 ± 12.0 mg/dL และ 131 ± 18.0 mg/dL ทดสอบกับหลักการ amperometry-glucose oxidase (GOx) จำนวน 15 เครื่อง จาก 8 ยี่ห้อ รวม 37 เครื่อง จาก 20 ยี่ห้อ ($n = 10$) พบว่าผลการทดสอบของเครื่องที่ใช้หลักการ amperometry-GDH และ photometry-GOx มากกว่าร้อยละ 90 ผ่านเกณฑ์การยอมรับทั้งความเที่ยงแบบ within-run ($CV \leq 5.0\%$) และความถูกต้องตามเกณฑ์มาตรฐาน ISO 15197:2013 (bias ± 15 mg/dL ที่น้ำตาลกลูโคส < 100 mg/dL และ $\pm 15\%$ ที่น้ำตาลกลูโคส ≥ 100 mg/dL) ทุกระดับความเข้มข้น แต่หลักการ amperometry-GOx มีเพียง 1 เครื่อง ที่ผ่านเกณฑ์การยอมรับ อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้เป็นการประเมินประสิทธิภาพเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพาส่วนหนึ่งซึ่งยังไม่ครอบคลุมทุกยี่ห้อที่วางจำหน่ายในประเทศไทย

คำสำคัญ: เครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพา, น้ำตาลกลูโคส, วัสดุอ้างอิงแปรรูปจากเลือด, ความเที่ยง, ความถูกต้อง

Corresponding author E-mail: wanpen.d@dmasc.mail.go.th

Received: 31 October 2024

Revised: 27 December 2024

Accepted: 17 January 2025

บทนำ

เครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพาเป็นอุปกรณ์ทางการแพทย์ ที่มีวัตถุประสงค์ในการใช้เพื่อติดตามระดับน้ำตาลในเลือดผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน ปัจจุบันมีการใช้อย่างแพร่หลายในสถานพยาบาลทุกระดับ (professional use) รวมถึงผู้ป่วยเบาหวานสามารถติดตามระดับน้ำตาลในเลือดได้ด้วยตนเองที่บ้าน (home use) เนื่องจากวิธีการตรวจที่ไม่ยุ่งยาก ทราบผลตรวจได้ทันที อย่างไรก็ตาม ผลการตรวจวัดค่าน้ำตาลกลูโคสด้วยเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพา ไม่ควรนำไปใช้เพื่อการวินิจฉัยโรคเบาหวาน เนื่องจากอาจมีความผิดพลาดจากความคลาดเคลื่อนที่เกิดจากระบบของเครื่องหรือแผ่นตรวจ (test strip) ได้ ในประเทศไทยมีการใช้เครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพาหลากหลายยี่ห้อ จากการศึกษาของณัฐชา เอื้อกาญจนนันท์ และคณะ⁽¹⁾ ได้สำรวจข้อมูลเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพาที่ใช้ในประเทศไทย ในช่วงปี พ.ศ. 2554–2559 จากแหล่งข้อมูลเอกสารทางวิชาการต่างๆ พบว่ามีทั้งหมด 106 ยี่ห้อ ส่วนใหญ่ใช้หลักการ amperometry ด้วยเอนไซม์ glucose dehydrogenase (GDH) มากที่สุด รองลงมาเป็นหลักการ amperometry ด้วยเอนไซม์ glucose oxidase (GOx) และหลักการ photometry ตามลำดับ ซึ่งการตรวจวัดน้ำตาลกลูโคสด้วยเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพาที่ใช้หลักการ photometry เป็นการวัดปฏิกิริยาที่เกิดจากเอนไซม์ GOx และ peroxidase ทำให้เกิดการเปลี่ยนสีโดยระดับความเข้มของสีจะถูกคำนวณเป็นระดับน้ำตาลในเลือด ส่วนหลักการ amperometry เป็นการวัดปฏิกิริยาที่เกิดจากเอนไซม์ GDH หรือ GOx แล้วเกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับอิเล็กตรอน นำมาคำนวณเป็นระดับน้ำตาลในเลือด ทั้งนี้ในการทำงานของเอนไซม์ GDH ต้องอาศัยโคเอนไซม์ ได้แก่ nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), pyrroloquinoline quinone (PQQ) และ flavin adenine dinucleotide (FAD) ซึ่งแต่ละชนิดมีความจำเพาะที่แตกต่างกัน⁽²⁾

เครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพาที่จำหน่ายในประเทศไทย ผู้ผลิตและผู้นำเข้าต้องแสดง

ผลการประเมินประสิทธิภาพสอดคล้องตามมาตรฐานสากล ISO 15197:2013⁽³⁾ และต้องได้รับการขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์เครื่องมือแพทย์จากกองควบคุมเครื่องมือแพทย์ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ก่อนที่จะนำออกจำหน่าย ในปัจจุบันช่องทางจำหน่ายผลิตภัณฑ์เครื่องมือแพทย์มีหลายช่องทาง นอกจากมีการจำหน่ายในร้านค้าที่น่าเชื่อถือแล้ว ยังมีการจำหน่ายบนแพลตฟอร์มออนไลน์ที่ประชาชนสามารถเข้าถึงได้สะดวก ซึ่งผลการสำรวจของ วันวิสาข์ ตรีบุพชาติสกุล และคณะ⁽⁴⁾ ในปี พ.ศ. 2560–2562 จากการรวบรวมข้อมูลเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพาจาก 5 แพลตฟอร์มออนไลน์ จำนวน 79 ยี่ห้อ พบว่าได้รับการขึ้นทะเบียนจากกองควบคุมเครื่องมือแพทย์ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา จำนวน 32 ยี่ห้อ และไม่ได้รับการขึ้นทะเบียน จำนวน 47 ยี่ห้อ ซึ่งผู้บริโภคอาจมีความเสี่ยงจากเครื่องมือแพทย์ที่ไม่ได้มาตรฐาน ด้วยเหตุนี้ห้องปฏิบัติการเครื่องมือแพทย์ สำนักรังสีและเครื่องมือแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งมีหน้าที่ตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการด้านเครื่องมือแพทย์ให้เป็นไปตามกฎหมายและมาตรฐานสากลเพื่อคุ้มครองผู้บริโภค⁽⁵⁾ เล็งเห็นความจำเป็นที่ต้องมีการเฝ้าระวังคุณภาพเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพาหลังออกสู่ตลาดในประเทศไทย

ข้อกำหนดของ CLSI EP15-A2⁽⁶⁾ ได้แนะนำวิธีประเมินความถูกต้อง (accuracy) ด้วยค่าความเอนเอียง (bias) ว่าเป็นไปตามคุณลักษณะเฉพาะที่บริษัทผู้ผลิตระบุหรือไม่ อาจทำได้โดยวิเคราะห์สิ่งส่งตรวจผู้ป่วยและเปรียบเทียบค่าที่วัดได้จากเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพา และจากเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติในห้องปฏิบัติการหรืออาจทำได้โดยวิเคราะห์วัสดุอ้างอิงรับรอง ที่ทราบค่าความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส ซึ่งวัสดุอ้างอิงต้องเหมาะสมกับการใช้งาน มีคุณลักษณะใกล้เคียงกับตัวอย่างที่ใช้ตรวจประจำวัน ต้องมีความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity) ความเสถียร (stability) และมีคุณสมบัติในการสลับที่ได้ (commutability) ซึ่งหมายถึงการที่ผลต่างของน้ำตาลกลูโคสในวัสดุอ้างอิงที่ตรวจวัดด้วยเครื่องมือสองหลักการที่แตกต่างกัน ไม่แตกต่างกับผลต่างของน้ำตาลกลูโคส

ในเลือดจริงจากผู้ป่วยหรืออาสาสมัครที่ตรวจวัดด้วยเครื่องมือสองหลักการด้วย⁽⁷⁾ โดยค่าอ้างอิงหรือค่ากำหนด (assigned value) ได้มาจากวิธีการวัดที่สามารถสอบกลับได้ทางมาตรวิทยา (traceability) ตามข้อกำหนดของ ISO 17511⁽⁸⁾ ทั้งนี้การศึกษาของ วันวิสาข์ ตรีบุษยาสกุล และคณะ⁽⁹⁾ ได้พัฒนากรรมวิธีเตรียมวัสดุอ้างอิงสำหรับการตรวจวิเคราะห์น้ำตาลในเลือดด้วยเครื่องตรวจวัดชนิดพกพา ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำวัสดุอ้างอิงมาใช้ในการประเมินประสิทธิภาพเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพา และได้รับความร่วมมือระหว่าง 3 หน่วยงาน ได้แก่ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และสถาบันมาตรวิทยาแห่งชาติ เพื่อพัฒนาวัสดุอ้างอิงและวิธีการทวนสอบเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพา โดยมหาวิทยาลัยนเรศวรรับผิดชอบพัฒนากรรมวิธีการเตรียมวัสดุอ้างอิง ศึกษาความเป็นเนื้อเดียวกัน ความเสถียร และกำหนดค่าของวัสดุอ้างอิง สถาบันมาตรวิทยาแห่งชาติ รับผิดชอบตรวจวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคสในวัสดุอ้างอิง ด้วยเทคนิค Isotope Dilution Liquid Chromatography–Mass Spectrometric (ID–LC–MS) และรับรองค่าวัสดุอ้างอิง ทั้งนี้การทดสอบความสามารถในการสลับที่ได้ (commutability) อยู่ภายใต้ความรับผิดชอบของมหาวิทยาลัยนเรศวรและสถาบันมาตรวิทยาแห่งชาติ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพา 20 ยี่ห้อ ที่มีจำหน่ายในประเทศไทย โดยใช้วัสดุอ้างอิงแปรรูปจากเลือดทดสอบความเที่ยงแบบ within-run และทดสอบความถูกต้องตามข้อกำหนดของมาตรฐาน ISO 15197:2013 เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการคัดเลือกเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพา

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างที่นำมาศึกษา

วัสดุอ้างอิงแปรรูปจากเลือดที่พัฒนากรรมวิธีเตรียมวัสดุอ้างอิงสำหรับการทดสอบการตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือด ด้วยเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพา ผ่านการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน

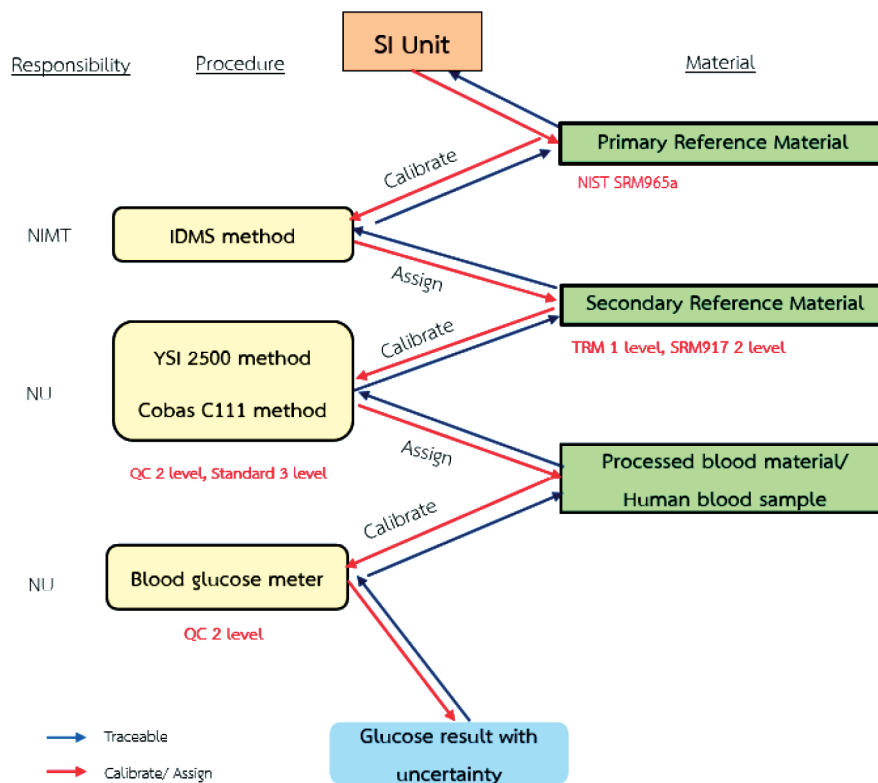
ความเสถียร และความสามารถสลับที่ได้ จากหน่วยวิจัยวัสดุอ้างอิงและนวัตกรรมห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ภาคิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์มหาวิทยาลัยนเรศวร มีการควบคุมอุณหภูมิระหว่างการขนส่งและการเก็บรักษา อยู่ในช่วง 2–8 °C มีลักษณะตัวอย่างเป็นแบบแยกสองส่วน คือ เซลล์เม็ดเลือดแดงและน้ำเหลือง บรรจุในหลอดที่มีฝาปิด มีการระบุค่ากำหนดและค่าความไม่แน่นอนของการวัด จำนวน 3 ระดับความเข้มข้น แยกตามหลักการของเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพา ดังนี้ หลักการ amperometry–GDH และ photometry–GOx ความเข้มข้นระดับต่ำ 86±3.0 mg/dL ความเข้มข้นระดับกลาง 124±5.0 mg/dL ความเข้มข้นระดับสูง 192±6.0 mg/dL และระบุความสอบกลับได้ทางมาตรวิทยา ดังแสดงในภาพที่ 1 สำหรับหลักการ amperometry–GOx มีการระบุเป็นค่า indicative value พร้อมค่าความไม่แน่นอนของการวัด ความเข้มข้นระดับต่ำ 64±5.0 mg/dL ความเข้มข้นระดับกลาง 76±12.0 mg/dL และความเข้มข้นระดับสูง 131±18.0 mg/dL

เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

คัดเลือกเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพายี่ห้อต่างๆ ที่มีหลักการต่างๆ จำนวน 20 ยี่ห้อ โดยกำหนดเกณฑ์การพิจารณาเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา (inclusion criteria) ดังนี้ 1) เป็นเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดปลายนิ้วที่จำหน่ายในประเทศไทย 2) เป็นเครื่องที่ผ่านเกณฑ์การประเมินตามมาตรฐาน ISO 15197:2013 3) เป็นเครื่องใหม่ที่ยังไม่ผ่านการใช้งาน 4) เป็นเครื่องที่ใช้หลักการ amperometry ใช้ enzyme GOx หรือ GDH หรือใช้หลักการ photometry ใช้ enzyme GOx และ 5) เอกสารกำกับเครื่องมือแพทย์ระบุกลุ่มผู้ใช้สำหรับ home use หรือ professional use อย่างน้อยแบบใดแบบหนึ่ง ดังแสดงในตารางที่ 1

การเตรียมความพร้อมก่อนทำการประเมิน

ศึกษาคู่มือการใช้งานเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพา และเอกสารกำกับแผ่นตรวจ



NU มหาวิทยาลัยนเรศวร, NIMT สถาบันมาตรวิทยาแห่งชาติ

ภาพที่ 1 ห่วงโซ่ความสอบกลับได้ทางมาตรวิทยาของการวัดค่าน้ำตาลกลูโคสในเลือด

ตารางที่ 1 เครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพาและแผ่นตรวจที่ใช้ในการศึกษา จำแนกตามหลักการ

ยี่ห้อ	หมายเลขเครื่อง	หมายเลขรุ่นผลิตภัณฑ์ แผ่นตรวจ	เอกสารกำกับเครื่องมือแพทย์ ระบุกลุ่มผู้ใช้	
			Home use	Professional use
หลักการ amperometry และเอนไซม์และโคเอนไซม์บนแผ่นตรวจ GDH-FAD				
1. Meter A	96800322846, 96800323263	301057, 301465	✓	✓
2. Meter B	92507552762, 92508993564	101791, 102440	✓	✓
3. Meter C	7349377, 7350635	DPoKQHC36H, DPoKQHC36F	✓	✓
4. Meter D	4279120220041980	TD21D122-BBD, TD21D106-BCD	✓	
5. Meter E	EC21AA11263	A21B03271	✓	✓
6. Meter F	405C4000B70, 405C4000B3D	1090103	✓	✓
7. Meter G	404E43DF9B7, 404E43DF9C1	1790104	✓	✓
8. Meter H	M05G03AB0049, M05G03AB0054	11K23W1AC0, 11K24F1AC0	✓	✓
9. Meter I	2BKA9R01550, 2BKA9R01564	140319	✓	
10. Meter J	425711612001791F, 4257116120017931	TD20E104-BGD, TD20F109-BGE	✓	✓
หลักการ amperometry และเอนไซม์และโคเอนไซม์บนแผ่นตรวจ GDH-PQQ				
11. Meter K	404R200F8C3, 404R200F79B	1490177	✓	✓
หลักการ photometry และเอนไซม์บนแผ่นตรวจ GOx				
12. Meter L	1603322396, 1603322400	20121117, 21030318	✓	✓
หลักการ amperometry และเอนไซม์บนแผ่นตรวจ GOx				
13. Meter M	EGB025275, EGB025280	S210507D-1	✓	✓

ตารางที่ 1 เครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพาและแผ่นตรวจที่ใช้ในการศึกษา จำแนกตามหลักการ (ต่อ)

ยี่ห้อ	หมายเลขเครื่อง	หมายเลขรุ่นผลิตภัณฑ์ แผ่นตรวจ	เอกสารกำกับเครื่องมือแพทย์ ระบุกลุ่มผู้ใช้	
			Home use	Professional use
14. Meter N	eB-G1GoD2Z50404, eB-G1GoD2Z50410	I2DoC2A01	✓	✓
15. Meter O	CE234572, CE234168	C1S2101002	✓	✓
16. Meter P	16619B001057, 16619B001088	CoT21218A35	✓	✓
17. Meter Q	F001265J0048, F001265J0249	SN23TBME	✓	
18. Meter R	M01J03AA2142, M01J03AA2145	S0420017, S0420018	✓	
19. Meter S	M03TG01HAC1619, M03TG01FAC4852	S0321035	✓	✓
20. Meter T	UDG005580	L200703-1	✓	✓

แต่ละยี่ห้อให้เข้าใจก่อนลงมือปฏิบัติ เตรียมสภาวะแวดล้อมการทดสอบให้มีอุณหภูมิอยู่ระหว่าง ($23\pm 5^{\circ}\text{C}$) และความชื้นสัมพัทธ์ที่ ($50\pm 20\%\text{RH}$) รอสภาวะแวดล้อมคงที่ บันทึกค่าอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ เตรียมเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพาและตรวจสอบแบตเตอรี่ของเครื่องให้พร้อมใช้งาน เตรียมแผ่นตรวจตรวจสอบวันหมดอายุของแผ่นตรวจ ตรวจสอบรหัสเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพา (ถ้ามี) และแผ่นตรวจให้สอดคล้องตรงกันทุกครั้ง เตรียมน้ำยาควบคุมคุณภาพ (ถ้ามี) ตามขั้นตอนที่ระบุในเอกสารกำกับเตรียมอุปกรณ์ที่จำเป็นอื่นๆ เช่น แผ่นพาราฟิล์ม หลอดหยด แท่นวางหลอดบรรจุวัสดุอ้างอิงแปรรูปจากเลือด กระจกยัดติดเชื้อ รวมถึงชุดอุปกรณ์ทำความสะอาดหลังการใช้งาน เป็นต้น บันทึกรายละเอียดต่างๆ ของเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพา แผ่นตรวจ น้ำยาควบคุมคุณภาพ (ถ้ามี) และวัสดุอ้างอิงแปรรูปจากเลือดลงในแบบบันทึกการทวนสอบ ปรับสภาวะเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพา แผ่นตรวจ น้ำยาควบคุมคุณภาพ ในสภาวะแวดล้อมตามที่กำหนด เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที ก่อนการทวนสอบ

การประเมินเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพาด้วยวัสดุอ้างอิงแปรรูปจากเลือด

ปฏิบัติตามเอกสารแนะนำการใช้งานวัสดุอ้างอิงแปรรูปจากเลือด โดยนำตัวอย่างทั้งสองส่วน คือ เซลล์เม็ดเลือดแดงและน้ำเหลืองที่แยกบรรจุอยู่ในหลอดที่มีฝาปิด

วางไว้ในอุณหภูมิห้อง ($23\pm 5^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นใช้ pasteur pipette ดูดน้ำเหลือง ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่บรรจุเซลล์เม็ดเลือดแดง ทำการผสมให้วัสดุอ้างอิงแปรรูปจากเลือดมีความเป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาตร 2 มิลลิลิตร วางวัสดุอ้างอิงแปรรูปจากเลือดไว้ในอุณหภูมิห้องอีกครั้ง เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาใช้ pasteur pipette หยดวัสดุอ้างอิงแปรรูปจากเลือดลงบนแผ่นพาราฟิล์ม ทำการประเมินความเที่ยงและความถูกต้องของผลการตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพาทั้ง 37 เครื่อง ในช่วงเวลาเดียวกัน และทดสอบกับแผ่นตรวจแต่ละรุ่นผลิตภัณฑ์ จำนวน 10 ซ้ำ โดยตรวจวัดแต่ละความเข้มข้นให้เสร็จภายใน 2 ชั่วโมง และใช้ผู้วัดเพียงคนเดียว

การวิเคราะห์ข้อมูลและเกณฑ์การยอมรับ

นำข้อมูลผลการตรวจวัดค่าน้ำตาลกลูโคสในวัสดุอ้างอิงแปรรูปจากเลือด ด้วยเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพา โดยแยกแต่ละหลักการ ประเมินความเที่ยง (precision) แบบ within-run คำนวณค่าเฉลี่ย (mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) ของค่าน้ำตาลกลูโคสในวัสดุอ้างอิงแปรรูปจากเลือดทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น และเปรียบเทียบกับเกณฑ์การยอมรับค่า %CV ต้องมีค่าไม่เกิน 5.0% โดยอ้างอิงเกณฑ์ของ Wisconsin State Laboratory of Hygiene (WSLH) กำหนดให้ค่า %CV ต้องไม่เกิน 0.25 เท่าของค่า Allowable

Total Error (TEA)⁽¹⁰⁾ ของ glucose, whole blood ซึ่งปัจจุบัน คือ 20%⁽¹¹⁾ และประเมินความถูกต้อง โดยคำนวณค่าความเอนเอียง (bias) จากผลต่างของค่าเฉลี่ยของผลการตรวจวัดค่าน้ำตาลกลูโคสในวัสดุอ้างอิงแปรรูปจากเลือด ด้วยเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพา กับค่ากำหนด (assigned value) ของค่าน้ำตาลกลูโคสในวัสดุอ้างอิงแปรรูปจากเลือด ทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น แยกตามหลักการเครื่อง ซึ่งกำหนดเกณฑ์การยอมรับค่า bias ตามมาตรฐาน ISO 15197:2013⁽³⁾ ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในวัสดุอ้างอิงแปรรูปจากเลือด < 100 mg/dL ต้องไม่เกิน ± 15 mg/dL และที่ความเข้มข้นของวัสดุอ้างอิงแปรรูปจากเลือด ≥ 100 mg/dL ต้องไม่เกิน $\pm 15\%$

ผล

ผลการตรวจวัดค่าน้ำตาลกลูโคสในวัสดุอ้างอิงแปรรูปจากเลือดทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น ด้วยเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพาและแผ่นตรวจแต่ละหลักการ พบว่าหลักการ amperometry-GDH จำนวน 11 ยี่ห้อ รวม 20 เครื่อง ที่ความเข้มข้นระดับต่ำ กลาง และสูง มีค่าเฉลี่ยน้ำตาลกลูโคสในเลือด อยู่ในช่วง 78–98 mg/dL, 114–148 mg/dL และ 163–211 mg/dL ตามลำดับ ค่า %CV อยู่ในช่วง 1.0–5.1%, 0.9–7.8% และ 1.2–5.8% ตามลำดับ ค่า bias อยู่ในช่วง -8 mg/dL ถึง 12 mg/dL, -8% ถึง 19% และ -15% ถึง 10% ตามลำดับ เมื่อพิจารณาผลการตรวจวัดระหว่าง 2 เครื่อง ในแต่ละยี่ห้อ พบว่าผลการตรวจวัดสอดคล้องกัน แต่พบความแตกต่างของผลการวัดระหว่างแผ่นตรวจ 2 รุ่นผลิต ใน 2 ยี่ห้อ ได้แก่ Meter H และ Meter J ที่ความเข้มข้นระดับกลาง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ทั้งนี้ พบ 5 เครื่อง ไม่ผ่านเกณฑ์การยอมรับความเที่ยง (%CV > 5.0) ได้แก่ Meter E, Meter F หมายเลขเครื่อง 405C4000B3D, Meter G ทั้ง 2 เครื่อง, Meter H และ 1 เครื่อง ไม่ผ่านเกณฑ์การยอมรับความถูกต้อง (%Bias > ± 15) ได้แก่ Meter I ที่บางระดับความเข้มข้น ดังแสดงในตารางที่ 2

หลักการ photometry-GOx จำนวน 1 ยี่ห้อ รวม 2 เครื่อง กับแผ่นตรวจ 2 รุ่นผลิต ที่ความเข้มข้นระดับต่ำ กลาง และสูง มีค่าเฉลี่ยน้ำตาลกลูโคสในเลือด อยู่ในช่วง 88–89 mg/dL, 113–116 mg/dL และ 190–192 mg/dL ตามลำดับ ค่า %CV อยู่ในช่วง 3.5–5.0%, 1.5–3.3% และ 2.4–3.2% ตามลำดับ ค่า bias อยู่ในช่วง 2 mg/dL ถึง 3 mg/dL, -9% ถึง -6% และ -1% ถึง 0% ตามลำดับ ทั้งนี้พบว่าผลการตรวจวัดทั้ง 2 เครื่อง กับแผ่นตรวจทั้ง 2 รุ่นผลิต ไปในทิศทางเดียวกัน และผ่านเกณฑ์การยอมรับความเที่ยงและความถูกต้อง ทุกระดับความเข้มข้น ดังแสดงในตารางที่ 3

หลักการ amperometry-GOx จำนวน 8 ยี่ห้อ รวม 15 เครื่อง ที่ความเข้มข้นระดับต่ำ กลาง และสูง มีค่าเฉลี่ยน้ำตาลกลูโคสในเลือด อยู่ในช่วง 58–70 mg/dL, 63–97 mg/dL และ 101–160 mg/dL ตามลำดับ ค่า %CV ที่ความเข้มข้นระดับต่ำ กลาง และสูง อยู่ในช่วง 2.2–15.8%, 3.0–6.2% และ 0.8–6.7% ตามลำดับ ค่า bias ที่ความเข้มข้นระดับต่ำ กลาง และสูง อยู่ในช่วง -7 mg/dL ถึง 6 mg/dL, -13 mg/dL ถึง 27 mg/dL และ -23% ถึง 22% ตามลำดับ เปรียบเทียบผลการตรวจวัดระหว่าง 2 เครื่อง ในแต่ละยี่ห้อ พบว่าผลการตรวจวัดไปในทิศทางเดียวกัน แต่ยี่ห้อ Meter R พบความแตกต่างของผลการวัดด้วยแผ่นตรวจระหว่าง 2 รุ่นผลิต ที่ความเข้มข้นระดับกลาง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และมีเพียง 1 เครื่อง ที่ผ่านเกณฑ์การยอมรับความเที่ยงและความถูกต้องทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น ดังแสดงในตารางที่ 4

จากข้อมูลผลการประเมินความเที่ยงและความถูกต้องของเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพา กับแผ่นตรวจทั้ง 3 หลักการ ด้วยวัสดุอ้างอิงแปรรูปจากเลือดทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น พบว่าผลการตรวจวัดค่าน้ำตาลกลูโคสในวัสดุอ้างอิงแปรรูปจากเลือดที่ความเข้มข้นระดับต่ำ กลาง และสูง ด้วยหลักการ amperometry-GDH ผ่านเกณฑ์การยอมรับความเที่ยง คิดเป็น 96.8%, 90.3% และ 93.5% ตามลำดับ และผ่านเกณฑ์การยอมรับความถูกต้อง คิดเป็น 100%, 96.8% และ 100% ตามลำดับ สำหรับหลักการ photometry-GOx ผลการตรวจวัดค่าน้ำตาลกลูโคสในวัสดุอ้างอิงแปรรูป

ตารางที่ 2 ผลการประเมินความเที่ยงและความถูกต้องของเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพาแบบตรวจหลักการ amperometry-GDH จำนวน 11 ยี่ห้อ รวม 20 เครื่อง ด้วยสัตุอ่างอิงแปรูปจากเลือด (n = 10)

ยี่ห้อ	หมายเลขเครื่อง	หมายเลขรุ่นผลิตภัณฑ์ตรวจ	ระดับต่ำ (mg/dL)			ระดับกลาง (mg/dL)			ระดับสูง (mg/dL)		
			Mean	%CV	Bias	Mean	%CV	%Bias	Mean	%CV	%Bias
1. Meter A	96800322846	301057	88	1.6	2	117	2.3	-5	184	2.0	-4
		301465	87	1.0	1	124	2.0	0	189	3.0	-2
	96800323263	301057	86	1.6	0	116	2.0	-6	182	1.3	-5
		301465	88	1.9	2	122	1.8	-2	189	2.4	-2
2. Meter B	92507552762	101791	85	1.8	-1	117	1.9	-6	182	1.7	-5
		102440	84	2.1	-2	116	1.5	-7	178	3.1	-7
	92508993564	101791	86	2.0	-1	114	1.6	-8	182	1.2	-5
		102440	83	2.4	-3	115	0.9	-7	180	2.6	-6
3. Meter C	7349377	DPoKQHC36H	86	2.1	-1	118	3.1	-5	118	2.0	-6
		DPoKQHC36F	83	2.9	-3	118	2.9	-5	181	2.4	-6
	7350635	DPoKQHC36H	86	2.5	0	119	3.3	-4	180	2.2	-6
		DPoKQHC36F	83	2.2	-3	118	1.7	-5	180	1.7	-6
4. Meter D	4279120220041980	TD21D122-BBD	92	2.4	6	136	1.7	10	205	2.9	7
		TD21D106-BCD	92	3.9	6	127	3.1	3	203	1.8	6
5. Meter E	EC21AA11263	A21B03271	83	4.4	-3	116	3.1	-7	163	5.5	-15
6. Meter F	405C4000B70 405C4000B3D	1090103	89	4.8	3	128	4.7	3	211	3.9	10
			90	4.4	4	126	3.2	2	210	5.8	10
7. Meter G	404E43DF9B7 404E43DF9C1	1790104	78	4.9	-8	114	7.0	-8	204	3.5	6
			78	4.3	-8	115	7.8	-7	199	4.3	3
8. Meter H	M05G03AB0049	11K23W1AC0	92	4.8	6	141	4.9	14	189	3.7	-2
		11K24F1AC0	91	4.0	5	125	4.3	1	175	2.4	-9
	M05G03AB0054	11K23W1AC0	89	5.1	3	135	5.2	9	182	4.9	-5
		11K24F1AC0	89	3.1	3	125	4.9	-2	170	2.7	-11

ตารางที่ 2 ผลการประเมินความเที่ยงและความถูกต้องของเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพาที่ผ่านการ amperometry-GDH จำนวน 11 ยี่ห้อ รวม 20 เครื่อง ด้วยวิธีอ้างอิงปรับปรุงจากเลือด (n = 10) (ต่อ)

ยี่ห้อ	หมายเลขเครื่อง	หมายเลขรุ่นผลิตภัณฑ์	ระดับต่ำ (mg/dL)			ระดับกลาง (mg/dL)			ระดับสูง (mg/dL)		
			Mean	%CV	Bias	Mean	%CV	%Bias	Mean	%CV	%Bias
9. Meter I	2BKA9R01550 2BKA9R01564	140319	98	3.5	12	148	3.8	19	188	3.9	-2
			97	3.2	11	142	4.5	14	184	4.0	-4
10. Meter J	425711612001791F 4257116120017931 TD20E104-BGD TD20F109-BGE	TD20E104-BGD TD20F109-BGE TD20E104-BGD TD20F109-BGE	92	1.3	6	143	2.9	15	210	2.9	9
			90	1.9	4	124	2.8	0	211	2.2	10
			90	2.6	4	137	2.6	10	207	2.2	8
			88	3.7	2	123	2.2	-1	203	2.1	6
11. Meter K	404R200F8C3 404R200F79B	1490177	84	1.9	-2	122	3.2	-1	195	2.9	2
			81	3.3	-5	121	4.5	-2	195	1.9	1

ตารางที่ 3 ผลการประเมินความเที่ยงและความถูกต้องของเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพาที่ผ่านการ photometry-GOx จำนวน 1 ยี่ห้อ รวม 2 เครื่อง ด้วยวิธีอ้างอิงปรับปรุงจากเลือด (n = 10)

ยี่ห้อ	หมายเลขเครื่อง	หมายเลขรุ่นผลิตภัณฑ์	ระดับต่ำ (mg/dL)			ระดับกลาง (mg/dL)			ระดับสูง (mg/dL)		
			Mean	%CV	Bias	Mean	%CV	%Bias	Mean	%CV	%Bias
12. Meter L	1603322396 1603322400	20121117 21030318 20121117 21030318	88	3.5	2	116	1.5	-6	191	3.2	0
			89	5.0	3	113	3.1	-9	192	3.0	0
			88	3.7	2	116	2.2	-7	190	2.4	-1
			89	4.7	3	114	3.3	-8	190	2.6	-1

ตารางที่ 4 ผลการประเมินความเที่ยงและความถูกต้องของเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพาที่ผ่านการ amperometry-GOx จำนวน 8 ยี่ห้อ รวม 15 เครื่อง ด้วยสัณฐานเชิงแปรรูปจากเลือด (n = 10)

ยี่ห้อ	หมายเลขเครื่อง	หมายเลขรุ่นผลิตภัณฑ์	ระดับต่ำ (mg/dL)			ระดับกลาง (mg/dL)			ระดับสูง (mg/dL)		
			Mean	%CV	Bias	Mean	%CV	%Bias	Mean	%CV	%Bias
13. Meter M	EGB025275	S210507D-1	59	5.4	-6	67	5.3	-9	111	6.7	-15
	EGB025280		60	6.0	-4	66	6.1	-10	112	4.9	-15
14. Meter N	eB-G1GoD2Z50404	I2DoC2A01	59	3.2	-5	63	3.0	-13	101	0.8	-23
	eB-G1GoD2Z50410		58	3.0	-7	63	4.5	-13	103	4.2	-22
15. Meter O	CE234572	C1S2101002	65	4.7	1	72	5.0	-4	130	3.6	-1
	CE234168		63	5.3	-2	67	4.1	-9	127	2.7	-3
16. Meter P	16619B001057	CoT21218A35	69	15.8	5	72	3.5	-4	150	5.5	14
	16619B001088		70	14.1	6	74	4.0	-2	153	5.1	17
17. Meter Q	F001265J0048	SN23TBMEF	68	3.0	4	93	6.2	17	160	3.0	22
	F001265J0249		67	4.7	3	93	5.6	17	157	3.1	20
18. Meter R	Mo1Jo3AA2142	S0420017	63	3.2	-1	68	5.9	-9	129	4.5	-3
		S0420018	64	2.2	0	97	3.1	21	127	4.4	-3
	Mo1Jo3AA2145	S0420017	62	4.0	-2	67	6.1	-9	127	3.2	-3
		S0420018	63	3.0	-1	93	3.1	17	125	3.4	-4
19. Meter S	Mo3TG01HAC1619	S0321035	62	8.5	-2	68	3.8	-8	132	2.2	0
	Mo3TG01FAC4852		58	6.4	-6	68	5.3	-8	131	3.1	0
20. Meter T	UDG005580	L200703-1	58	5.2	-6	68	5.0	-8	120	5.4	-8

จากเลือดทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น ผ่านเกณฑ์การยอมรับ ความเที่ยงและความถูกต้อง คิดเป็น 100% และหลักการ amperometry-GOx พบผ่านเกณฑ์การยอมรับ

ความเที่ยง คิดเป็น 52.9%, 58.8% และ 76.5% ตามลำดับ และผ่านเกณฑ์การยอมรับความถูกต้อง คิดเป็น 100%, 82.4% และ 70.6% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการประเมินตามเกณฑ์การยอมรับความเที่ยงและความถูกต้องของเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือด ชนิดพกพาและแผ่นตรวจแต่ละหลักการ ด้วยวัสดุอ้างอิงแปรรูปจากเลือด 3 ระดับความเข้มข้น

ระดับความเข้มข้นของค่าน้ำตาลกลูโคส	หลักการ	ความเที่ยง %CV ≤ 5.0	ความถูกต้อง Bias ≤ ±15 mg/dL / ±15%
		จำนวนผลการทดสอบที่ผ่านเกณฑ์/ จำนวนผลการทดสอบทั้งหมด (%)	จำนวนผลการทดสอบที่ผ่านเกณฑ์/ จำนวนผลการทดสอบทั้งหมด (%)
ต่ำ	amperometry-GDH	30/31 (96.8)	31/31 (100)
	photometry-GOx	4/4 (100)	4/4 (100)
	amperometry-GOx	9/17 (52.9)	17/17 (100)
กลาง	amperometry-GDH	28/31 (90.3)	30/31 (96.8)
	photometry-GOx	4/4 (100)	4/4 (100)
	amperometry-GOx	10/17 (58.8)	14/17 (82.4)
สูง	amperometry-GDH	29/31 (93.5)	31/31 (100)
	photometry-GOx	4/4 (100)	4/4 (100)
	amperometry-GOx	13/17 (76.5)	12/17 (70.6)

วิจารณ์

ในการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพาครั้งนี้ ผู้วิจัยสามารถรวบรวมได้ 20 ยี่ห้อ รวม 37 เครื่อง ที่มีจำหน่ายในประเทศไทย และมีความหลากหลายหลักการและเอนไซม์ที่ใช้ 3 หลักการ ได้แก่ amperometry-GDH, photometry-GOx และ amperometry-GOx ซึ่งดำเนินการคัดเลือกเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาอย่างเป็นอิสระ โดยไม่ได้ขอรับการสนับสนุนจากผู้แทนจำหน่ายรายใด และต้องการศึกษาเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพากับแผ่นตรวจแต่ละยี่ห้อ จำนวน 2 ชุด เพื่อให้สามารถวิเคราะห์ผลการตรวจวัดระหว่างเครื่องกับแผ่นตรวจระหว่างรุ่นผลิตได้ เพราะผลการตรวจวัดอาจเกิดจากความแปรปรวนของเครื่องหรือแผ่นตรวจ แต่ในการศึกษานี้มีข้อจำกัดในการจัดหาแผ่นตรวจให้ได้ 2 รุ่นผลิต เนื่องจากผู้แทนจำหน่ายส่วนใหญ่มีจำหน่ายเพียงรุ่นผลิตเดียว ทั้งนี้ผู้วิจัยเลือกใช้วิธีประเมินความเที่ยงและความถูกต้องของเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาล

ในเลือดชนิดพกพา โดยนำมาทดสอบกับวัสดุอ้างอิงแปรรูปจากเลือด จำนวน 3 ระดับความเข้มข้น ซึ่งข้อดีของการใช้วัสดุอ้างอิงแปรรูปจากเลือด คือ ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาสูงและบุคลากรที่ชำนาญการเฉพาะทาง ใช้งบประมาณน้อย รวมทั้งเป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยาก จึงเหมาะที่จะนำมาใช้ประเมินประสิทธิภาพเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพา

สำหรับผลการตรวจวัดค่าน้ำตาลกลูโคสในวัสดุอ้างอิงแปรรูปจากเลือด ด้วยเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพากับแผ่นตรวจที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพากับแผ่นตรวจทั้งหมดที่ใช้หลักการ amperometry-GDH และ photometry-GOx สามารถวัดค่าน้ำตาลกลูโคสในวัสดุอ้างอิงแปรรูปจากเลือดได้ทั้งความเข้มข้นระดับต่ำ กลาง และสูง มีค่าในช่วง 78–98 mg/dL, 114–148 mg/dL และ 163–211 mg/dL ตามลำดับ และหลักการ amperometry-GOx สามารถวัดค่าน้ำตาลกลูโคสในวัสดุอ้างอิงแปรรูปจากเลือดได้ทั้งความเข้มข้นระดับต่ำ กลาง และสูง มีค่าในช่วง 58–70 mg/dL, 63–97 mg/dL

และ 101–160 mg/dL ตามลำดับ โดยไม่มีเครื่องใดที่แสดงข้อความรหัสข้อผิดพลาด (error)

เมื่อพิจารณาผลการประเมินความเที่ยงและความถูกต้องของการตรวจวัดค่าน้ำตาลกลูโคสในวัสดุอ้างอิงแปรรูปจากเลือด แยกตามหลักการวัดของเครื่อง พบว่ามีความแตกต่างกันในบางหลักการและบางยี่ห้อ โดยเครื่องที่ใช้หลักการ amperometry-GDH ส่วนใหญ่ให้ผลการตรวจวัดที่มีความเที่ยงและความถูกต้องทุกระดับความเข้มข้น แต่มีเพียงบางยี่ห้อที่ไม่ผ่านเกณฑ์ความเที่ยงและความถูกต้องที่บางระดับความเข้มข้น สำหรับเครื่องที่ใช้หลักการ photometry-GOx ทุกเครื่องให้ผลการตรวจวัดที่มีความเที่ยงและความถูกต้องอยู่ในเกณฑ์การยอมรับทุกระดับความเข้มข้น ส่วนเครื่องที่ใช้หลักการ amperometry-GOx แม้จะมี 1 เครื่อง ที่ผ่านเกณฑ์ทั้งความเที่ยงและความถูกต้องในทุกระดับความเข้มข้น แต่ส่วนใหญ่ให้ผลการตรวจวัดไม่ผ่านเกณฑ์การประเมินความเที่ยงที่ความเข้มข้นระดับต่ำและกลาง อีกทั้งมีบางส่วนที่ไม่ผ่านเกณฑ์การประเมินความถูกต้องที่ความเข้มข้นระดับกลางและสูง ซึ่งสาเหตุที่ไม่ผ่านเกณฑ์ความเที่ยงและความถูกต้อง อาจเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น ความสม่ำเสมอในการผลิตแผ่นตรวจ เอนไซม์เสื่อมสภาพ ความเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากจำนวนเครื่องมากและไม่ได้ทำการวัด 10 ซ้ำ ให้เสร็จทีละเครื่อง ทำให้ระยะเวลาที่วัดซ้ำของแต่ละเครื่องห่างกันอย่างน้อย 20 วินาที อาจมีผลกระทบต่อความเสถียรของวัสดุอ้างอิงแปรรูปจากเลือด รวมถึงส่วนประกอบของวัสดุอ้างอิงแปรรูปจากเลือด อาจมีผลต่อเครื่องบางหลักการ ทำให้เกิดความแปรปรวนของค่าที่ตรวจวัดได้

จากการศึกษานี้เห็นได้ว่าเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพาหลักการ amperometry-GDH ส่วนใหญ่ให้ผลการวัดค่าน้ำตาลกลูโคสในวัสดุอ้างอิงแปรรูปจากเลือดได้แม่นยำ ถูกต้อง ซึ่งคล้ายกับการศึกษาของ เบญจพร เถาว์โท และคณะ⁽¹²⁾ ที่พัฒนาและประเมินสารควบคุมคุณภาพน้ำตาลที่มีส่วนผสมของเม็ดเลือดแดง จำนวน 3 ระดับความเข้มข้น ทดสอบกับเครื่องหลักการ amperometry ที่ใช้เอนไซม์ GDH และ GOx จำนวน 3 และ 2 เครื่อง ตามลำดับ พบว่าเฉพาะ

เครื่องที่ใช้เอนไซม์ GDH จำนวน 2 เครื่อง ที่ผ่านเกณฑ์การยอมรับความถูกต้อง ตามมาตรฐาน ISO 15197:2013 และเช่นเดียวกันกับการศึกษาของ เอษณีย์ คำเวียงสา และคณะ⁽¹³⁾ ได้ประเมินประสิทธิภาพวัสดุทดสอบความชำนาญชนิดเลือดครบส่วน ที่เตรียมโดยหน่วยวิจัยด้านการพัฒนาสารควบคุมคุณภาพทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ จากการสำรวจ EQA ของการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องตรวจน้ำตาลปลายนิ้ว สำหรับโรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบล (รพ.สต.) 76 แห่งในจังหวัดนนทบุรี ซึ่ง รพ.สต. ทุกแห่งใช้เครื่องตรวจหลักการและเอนไซม์ amperometry-GDH พบว่าผ่านเกณฑ์การยอมรับค่า $|Z| \leq 2$ มากกว่าร้อยละ 90 ทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น เช่นเดียวกับหลักการ photometry-GOx แม้หลักการและเอนไซม์ที่ใช้จะต่างกับ amperometry-GDH แต่ผลการประเมินประสิทธิภาพไม่แตกต่างกัน สอดคล้องกับการศึกษาของ นภาพร อภิรัฐเมธิกุล และคณะ⁽⁷⁾ ที่พบว่าผลการประเมินสมรรถนะการตรวจวัดปริมาณน้ำตาลในเลือดด้วยเครื่องตรวจวัดชนิดพกพาของ รพ.สต. ใน 2 เขตสุขภาพภาคเหนือ ผ่านโปรแกรมการทดสอบความชำนาญในรอบที่ 1 ผลการประเมินเครื่องตรวจที่ใช้หลักการ photometry-GOx จำนวน 17 เครื่อง ผ่านเกณฑ์การยอมรับค่า $|Z| \leq 2$ คิดเป็น 100% ทั้ง 2 ระดับความเข้มข้น สำหรับหลักการ amperometry-GOx แม้จะใช้หลักการเดียวกันแต่ใช้เอนไซม์ต่างกับ amperometry-GDH และหลักการต่างกันแต่ใช้เอนไซม์เดียวกันกับ photometry-GOx แต่ผลการประเมินความเที่ยงและความถูกต้องแตกต่างกัน อาจเนื่องจาก matrix ของวัสดุอ้างอิงน้ำตาลกลูโคสในเลือด มีผลต่อหลักการทำงานหรือรบกวนปฏิกิริยาเอนไซม์ที่ต่างกัน ทำให้มีความผิดพลาดของค่าน้ำตาลกลูโคสที่วัดได้ในแต่ละระดับความเข้มข้น⁽¹⁴⁾ สำหรับในประเทศไทย พบว่ามีรายงานการศึกษาก่อนหน้าโดย ยุวดี พัฒนวงศ์ และคณะ⁽¹⁵⁾ ได้ประเมินประสิทธิภาพเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพาที่จำหน่ายในประเทศไทยจำนวน 26 ยี่ห้อจากผู้จัดจำหน่าย 14 บริษัท ผลการศึกษา precision แบบ within-run โดยใช้สารควบคุมคุณภาพของผู้ผลิต พบว่ามีเครื่องที่ผ่าน

เกณฑ์ %CV ไม่เกิน 5% คิดเป็นร้อยละ 76.92 และ ผลการศึกษา system accuracy โดยตรวจวัดในตัวอย่าง ตรวจเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ (Cobas 6000, Roche Diagnostics, Switzerland) พบว่ามีเครื่องผ่านเกณฑ์ตามมาตรฐาน ISO 15197:2013 คิดเป็นร้อยละ 11.54 อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้ มีข้อจำกัดในเรื่องของกลุ่มตัวอย่างที่ผู้วิจัยสามารถ จัดหาเครื่องแต่ละยี่ห้อได้ส่วนหนึ่ง ซึ่งยังไม่ครอบคลุม ทุกยี่ห้อที่มีจำหน่ายในประเทศไทย และจำกัดขอบเขต ของการศึกษาเฉพาะในกลุ่มตัวอย่างที่เป็นเครื่องใหม่ ที่ยังไม่ผ่านการใช้งานเท่านั้น ซึ่งงานวิจัยในอนาคตควร ขยายขอบเขตให้ครอบคลุมกลุ่มตัวอย่างที่มีการใช้งาน แล้ว

สรุป

การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพเครื่อง ตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพาที่ใช้หลักการ amperometry-GDH, photometry-GOx และ amperometry-GOx จำนวน 20 ยี่ห้อ รวมทั้งหมด 37 เครื่อง ที่วางจำหน่ายในประเทศไทย โดยใช้วัสดุ อ้างอิงแปรรูปจากเลือด จำนวน 3 ระดับความเข้มข้น ส่วนใหญ่ผ่านเกณฑ์การยอมรับความเที่ยงตามข้อกำหนด Wisconsin State Laboratory of Hygiene และ มีความถูกต้องสอดคล้องตามเกณฑ์มาตรฐาน ISO 15197:2013 แต่มีเพียงหลักการ amperometry-GOx เท่านั้นที่ผ่านเกณฑ์การยอมรับความเที่ยงน้อยกว่า 80% ทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น และมีส่วนน้อยที่ไม่ผ่านเกณฑ์ การประเมินความถูกต้อง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รศ.ดร.วันวิสาข์ ตรีบุปผาติสกุล หัวหน้า หน่วยวิจัยวัสดุอ้างอิงและนวัตกรรมห้องปฏิบัติการ ทางการแพทย์ ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะ สหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้ความอนุเคราะห์ วัสดุอ้างอิงแปรรูปจากเลือดและให้ข้อเสนอแนะต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ ขอขอบคุณ สถาบันมาตรวิทยาแห่งชาติ

ที่ได้ให้ความร่วมมือในการดำเนินการตรวจวิเคราะห์ความ เข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในวัสดุอ้างอิงด้วยวิธี Isotope Dilution Mass Spectrometry (IDMS) จนทำให้ การศึกษาวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. ณัฐชา เอื้อกายจนานันท์, ธารทิพย์ เกื่อนศรี, ศุภดา สุรนาภรณ์ชัย, วันวิสาข์ ตรีบุปผาติสกุล. การศึกษาข้อมูล การตรวจวัดน้ำตาลกลูโคสในเลือด: หลักการตรวจวัด และเทคโนโลยี. ว. เทคนิคการแพทย์ 2561; 46(1): 6326-37.
2. พรหมทิพย์ ดันติวงศ์. ประโยชน์และข้อจำกัดในการ ตรวจน้ำตาลในเลือดด้วยเครื่องตรวจชนิดอัตโนมัติ Point-of-Care Test (POCT) for Blood Glucose: Benefits and Pitfalls. เวชสารโรงพยาบาลมหาราช นครราชสีมา 2554; 35(3): 175-80.
3. ISO 15197:2013. *In vitro* diagnostic test systems-requirements for blood-glucose monitoring systems for self-testing in managing diabetes mellitus. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2013.
4. วันวิสาข์ ตรีบุปผาติสกุล, นภาพร อภิรัฐเมธีกุล, ครรชิต คงรส. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์การประเมิน สมรรถนะการตรวจวิเคราะห์ ณ จุดดูแลผู้ป่วยผ่านการ ทดสอบความชำนาญตามมาตรฐาน ISO/IEC 17043. พิษณุโลก: คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร; 2562.
5. พระราชบัญญัติระเบียบบริหารราชการแผ่นดิน พ.ศ. 2534 กฎกระทรวงแบ่งส่วนราชการกรมวิทยาศาสตร์ การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2552. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 126 ตอนที่ 98 ก (วันที่ 28 ธันวาคม 2552). หน้า 70.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. User verification of performance for precision and trueness: approved guideline (CLSI document EP15-A2). 2nd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.

7. นภาพร อภิรัฐเมธีกุล, วันวิสาข์ ตรีบุพชาติสกุล, ผัสดีพร เพียรการ, โสภิตา โทแสง, ครรชิต คงรส. การประเมินสมรรถนะการตรวจทางห้องปฏิบัติการ 4 รายการพื้นฐานที่ดำเนินการ ณ โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบล ใน 2 เขตสุขภาพภาคเหนือ ผ่านโปรแกรมการทดสอบความชำนาญตามเกณฑ์มาตรฐานสากล. ว เทคนิคการแพทย์ 2564; 49(2): 7810–31.
8. ISO 17511:2020. *In vitro* diagnostic medical devices – requirements for establishing metrological traceability of values assigned to calibrators, trueness control materials and human samples. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2020.
9. วันวิสาข์ ตรีบุพชาติสกุล, นภาพร อภิรัฐเมธีกุล, ครรชิต คงรส. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์การพัฒนางานทดสอบความชำนาญและวัสดุอ้างอิงสำหรับการตรวจวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์และการทดสอบ ณ จุดดูแลผู้ป่วย ตามแนวทางมาตรฐาน ISO/IEC 17043 และ ISO 17034. สนับสนุนทุนวิจัยโดยกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม มหาวิทยาลัยนครสวรรค์; 2564.
10. pSMILE. Quantitative validation guidelines. [online]. 2023; [cited 2024 Jul 7]; [12 screens]. Available from: URL: <https://resources.psmile.org/resources/test-method-validation-and-verification>.
11. Data Innovations. Total allowable error table. [online]. 2024; [cited 2024 Jul 7]; [1 screen]. Available from: URL: <https://www.datainnovations.com/allowable-total-error-table>.
12. เบญจพร เถาว์โท, ปราโมทย์ ศรีวานิชรักษ์, สุดาวดี คงขำ, สมศักดิ์ พองสุภา. การพัฒนาและประเมินสารควบคุมคุณภาพน้ำตาลที่มีส่วนผสมของเม็ดเลือดแดงสำหรับเครื่องตรวจวัดน้ำตาลจากเลือดปลายนิ้ว. ว เทคนิคการแพทย์ 2564; 49(1): 7651–75.
13. เอษณีย์ คำเวียงสา, สมศักดิ์ พองสุภา, ปราโมทย์ ศรีวานิชรักษ์. การประเมินประสิทธิภาพของวัสดุทดสอบความชำนาญชนิดเลือดครบส่วนและปัสสาวะเทียมในห้องปฏิบัติการจังหวัดนนทบุรี. ว เทคนิคการแพทย์ 2567; 52(2): 9065–82.
14. Apiratmateekul N, Nammoonnoy J, Kost GJ, Treebuphachatsakul W. Commutable blood materials from the fixed-cell method for performance evaluation of blood glucose by a glucose meter. *Diagnostics*. [serial online]. 2024; [cited 2024 Sep 16]; 14(8): 799. [10 screens]. Available from: URL: <http://doi.org/10.3390/diagnostics14080799>.
15. ยุวดี พัฒนวงศ์, ประภาพร ด้านเศรษฐกุล, จริญญา ผดุงพัฒน์, รัชนา ศานติยานนท์. การประเมินประสิทธิภาพการทำงานและพัฒนากำกับดูแลเครื่องวัดระดับน้ำตาลในเลือดด้วยตนเองที่จำหน่ายในประเทศไทย. ว อาหารและยา 2561; 25(1): 29–39.

A Comparative Study of the Performance of Blood Glucose Meters in Thailand Using Blood-Derived Reference Materials

Wanpen Duangsawang, Renuka Poolai, and Thirawut Bunraksa

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

ABSTRACT Choosing blood glucose meters with reliable measurement results is important in effective diabetes screening, treatment monitoring, and control. This study aimed to compare the performance of blood glucose meters available in Thailand using three concentrations of glucose in blood-derived reference materials. The devices based on amperometry-glucose dehydrogenase (GDH) (20 devices from 11 brands) and photometry-glucose oxidase (GOx) (2 devices from 1 brand) were tested with the glucose concentrations of 86 ± 3.0 mg/dL, 124 ± 5.0 mg/dL, and 192 ± 6.0 mg/dL. Meanwhile, the devices based on amperometry-glucose oxidase (GOx) blood glucose meters (15 devices from 8 brands) were tested at 64 ± 5.0 mg/dL, 76 ± 12.0 mg/dL, and 131 ± 18.0 mg/dL. Totally, 37 blood glucose meters of 20 brands ($n = 10$) were studied. It was found that more than 90% of the blood glucose meters based on amperometry-GDH and photometry-GOx passed the criteria of precision within-run ($CV \leq 5.0\%$) and accuracy according to the ISO 15197:2013 (bias ± 15 mg/dL at blood glucose < 100 mg/dL and $\pm 15\%$ at blood glucose ≥ 100 mg/dL) for all concentration levels of the blood-derived reference materials. However, only one device based on amperometry-GOx passed those accepted criteria. This study evaluated the performance of some blood glucose meters available in Thailand and is not comprehensive of all brands on the market.

Keywords: Blood glucose meters, Blood glucose, Blood-derived reference materials, Precision, Accuracy

การเฝ้าระวังค่าปริมาณรังสีจากเครื่องเอกซเรย์ ทันตกรรมแบบใส่ตัวรับภาพไว้ในช่องปาก ในพื้นที่จังหวัดตรัง พัทลุง และสตูล ปีงบประมาณ พ.ศ. 2560–2566

ศิริขวัญ ยัวเหียง ศิริวรรณ บุญชรัตน์ สุชาวลี เชื้อมหวาน และ จีราภรณ์ สงขลา

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อำเภอเมือง ตรัง 92000

บทคัดย่อ เครื่องเอกซเรย์ทันตกรรมมีความสำคัญในการวินิจฉัยโรค วางแผนรักษา จนถึงตรวจติดตามผลการรักษาช่องปากและฟัน พบมีปริมาณการใช้ 1 ใน 3 ของการถ่ายภาพรังสีทั้งหมด เพื่อไม่ให้ผู้ป่วยได้รับรังสีเกินความจำเป็นและเพื่อลดการใช้ปริมาณรังสี ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จึงเฝ้าระวังการได้รับปริมาณรังสีจากเครื่องเอกซเรย์ทันตกรรมแบบใส่ตัวรับภาพไว้ในช่องปาก ในพื้นที่จังหวัดตรัง พัทลุง และสตูล ตั้งแต่ปีงบประมาณ พ.ศ. 2560–2566 จำนวน 66, 80, 50, 64, 19, 32 และ 60 เครื่อง ตามลำดับ โดยการวัดค่าปริมาณรังสีบริเวณปลายกระบอกลำรังสีจากการตั้งค่าเทคนิคในการถ่ายภาพรังสีสำหรับฟันผู้ใหญ่ 6 กลุ่มซี่ฟัน คือ ฟันหน้าบน ฟันหน้าล่าง ฟันกรามน้อยบน ฟันกรามน้อยล่าง ฟันกรามใหญ่บน และฟันกรามใหญ่ล่าง นำค่าที่ได้มาหาค่ามัธยฐานได้เท่ากับ 1.1–1.7, 0.9–1.4, 1.4–2.2, 1.3–1.8, 1.8–2.9 และ 1.4–2.3 มิลลิเกรย์ (mGy) ตามลำดับ เมื่อแยกตามชนิดตัวรับภาพระบบฟิล์ม ค่าที่ได้เท่ากับ 1.5–2.1, 1.4–1.8, 2.1–2.6, 1.8–2.2, 3.0–3.3 และ 2.2–3.0 mGy ตามลำดับ ระบบดิจิทัล (CR/DR) ค่าที่ได้เท่ากับ 1.0–1.5, 0.8–1.3, 1.3–1.9, 0.9–1.6, 1.6–2.4 และ 1.2–2.0 mGy ตามลำดับ ซึ่งไม่เกินค่าอ้างอิงของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่มีค่าเท่ากับ 2.3, 1.9, 3.1, 2.4, 4.0 และ 3.1 mGy ตามลำดับ เห็นได้ว่าหน่วยงานที่ใช้ตัวรับภาพระบบฟิล์ม ค่าปริมาณรังสีสูงกว่าระบบดิจิทัลทุกกลุ่มซี่ฟัน จึงควรปรับลดค่าทางเทคนิคในการถ่ายภาพรังสีเพื่อให้ผู้ปฏิบัติงานรวมถึงผู้รับบริการได้รับรังสีน้อยที่สุด

คำสำคัญ: เครื่องเอกซเรย์ทันตกรรม, การถ่ายภาพรังสีในช่องปาก, ค่าปริมาณรังสี, ปริมาณรังสีแจ้งผล

Corresponding author E-mail: sirikhwan.y@dmsc.mail.go.th

Received: 30 August 2024

Revised: 20 January 2025

Accepted: 30 January 2025

บทนำ

การใช้รังสีเอกซ์เพื่อการตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์เป็นที่ยอมรับกันทั่วโลกนับแต่มีการค้นพบรังสีเอกซ์เป็นต้นมา การใช้ประโยชน์จากรังสีในทางการแพทย์จึงต้องมีการควบคุมดูแล ให้เป็นไปตามหลักการป้องกันอันตรายจากรังสีตามมาตรฐานสากล คือ การใช้รังสีอย่างเหมาะสมโดยคำนึงถึงประโยชน์ที่อยู่เหนือความเสี่ยง การปรับปริมาณรังสีให้เหมาะสม และการจำกัดปริมาณรังสีที่บุคลากรและผู้รับบริการได้รับ⁽¹⁾ ควรใช้รังสีในปริมาณที่น้อยที่สุดที่ยังคงสามารถสร้างภาพรังสีที่มีคุณภาพเพียงพอต่อความต้องการในการวินิจฉัยโรคได้ซึ่งเป็นไปตามหลักของ ALARA (as low as reasonably achievable) กล่าวคือ ผู้ครอบครองหรือผู้ใช้งานรังสีในทางการแพทย์จะต้องพยายามลดความเสี่ยงจากการใช้รังสีให้น้อยที่สุดเท่าที่จะสามารถกระทำได้ในทางปฏิบัติ⁽²⁾

เครื่องเอกซเรย์ทางทันตกรรมมีความสำคัญในการวินิจฉัยโรค วางแผนรักษา ไปจนถึงตรวจติดตามผลการรักษาช่องปากและฟัน พบว่ามีการใช้เท่ากับ 1 ใน 3 ของการถ่ายภาพรังสีทั้งหมด⁽³⁾ อีกทั้งสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาสหรัฐอเมริกา (United States Food and Drug Administration; US FDA) ได้ออกข้อกำหนดการรับรองและการใช้งานเครื่องเอกซเรย์ทันตกรรมแบบใส่ตัวรับภาพไว้ในช่องปากชนิดมือถือไว้อย่างเข้มงวด⁽⁴⁾

ห้องปฏิบัติการรังสีและเครื่องมือแพทย์ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีภารกิจในการตรวจสอบคุณภาพและความปลอดภัยเครื่องกำเนิดรังสีเอกซ์ ในส่วนภูมิภาคเขตสุขภาพที่ 12 ในเขตพื้นที่รับผิดชอบ 3 จังหวัด คือ จังหวัดตรัง พัทลุง และสตูล ให้มีความปลอดภัยในการใช้เครื่องกำเนิดรังสีเอกซ์และผู้ป่วยได้รับรังสีในปริมาณที่เหมาะสม ห้องปฏิบัติการจึงได้เฝ้าระวังการได้รับปริมาณรังสีจากการถ่ายภาพรังสีฟันของหน่วยงานในเขตพื้นที่รับผิดชอบมาอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ปี พ.ศ. 2560 โดยการแจ้งผลการประเมินระดับปริมาณรังสีที่ผู้ป่วยจากการถ่ายภาพรังสีฟันแก่หน่วยงานที่ใช้ตัว

รับภาพระบบฟิล์ม ซึ่งเป็นการใช้น้ำยา developer ในการสร้างภาพให้เกิดบนฟิล์มเอกซเรย์และใช้น้ำยา replenisher ในการเร่งปฏิกิริยา โดยน้ำยาจะทำปฏิกิริยากับผลึก silver bromide ที่ถูกรังสีเอกซ์ เปลี่ยนเป็นภาพที่มีสีดำบนฟิล์มเอกซเรย์ และใช้น้ำยา fixer ในการล้างผลึก silver bromide ในส่วนที่ไม่ถูกรังสีเอกซ์ออก ทำให้อาจมีส่วนนั้นใสและโปร่งแสง เป็นการคงสภาพของภาพถ่ายบนฟิล์มเอกซเรย์และตัวรับภาพระบบดิจิทัลเป็นการใช้แผ่นรับภาพรังสี imaging plate ถ่ายภาพเอกซเรย์ฟันในช่องปาก โดยใช้เครื่องอ่านแปลงสัญญาณจากแผ่น imaging plate ให้เป็นสัญญาณภาพและแสดงผลบนจอภาพคอมพิวเตอร์

ค่าปริมาณรังสีของการถ่ายภาพเอกซเรย์ฟันส่วนใหญ่ใช้ค่าปริมาณรังสีที่วัดบริเวณปลายกระบอกลำรังสี (open ended cone) ขณะไม่มีผู้ป่วย จึงไม่รวมค่าปริมาณรังสีสะท้อนกลับ (Backscatter Radiation Dose) ซึ่งใช้คำว่า Patient Entrance Dose (PED) โดยตั้งค่าเทคนิคในการถ่ายภาพรังสีตามกลุ่มซี่ฟัน⁽³⁾ ได้แก่ ฟันหน้าบน ฟันหน้าล่าง ฟันกรามน้อยบน ฟันกรามน้อยล่าง ฟันกรามใหญ่บน และฟันกรามใหญ่ล่าง ในต่างประเทศมีหลายประเทศที่มีการจัดทำค่าปริมาณรังสีอ้างอิง เช่น ประเทศญี่ปุ่น⁽⁵⁾ สำหรับประเทศไทยได้มีการจัดทำค่าปริมาณรังสีอ้างอิงของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ดำเนินการเมื่อปี พ.ศ. 2560 และประกาศใช้เมื่อวันที่ 22 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2561⁽⁶⁾ มีค่าเท่ากับ 2.3, 1.9, 3.1, 2.4, 4.0 และ 3.1 mGy ตามลำดับ

การศึกษาครั้งนี้เป็นการนำค่าปริมาณรังสีจากเครื่องเอกซเรย์ทันตกรรมแบบใส่ตัวรับภาพไว้ในช่องปากทั้งชนิดติดตั้งประจำที่และชนิดมือถือของกลุ่มโรงพยาบาลศูนย์ โรงพยาบาลทั่วไป โรงพยาบาลชุมชน และคลินิก ทั้งภาครัฐและเอกชน ในพื้นที่รับผิดชอบ จังหวัดตรัง พัทลุง และสตูล ช่วงปีงบประมาณ พ.ศ. 2560–2566 มาเปรียบเทียบกับค่าอ้างอิงของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์⁽⁶⁾ เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับจัดทำแนวทางการปฏิบัติงานลดการใช้ปริมาณรังสีและการได้รับรังสีที่เกินความจำเป็น

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือ

เครื่องวัดค่ากิโลโวลต์พีค เวลา และปริมาณรังสีเอกซ์ ที่ได้รับการสอบเทียบ จำนวน 2 เครื่อง ได้แก่ ยี่ห้อ Ray Safe รุ่น Xi และยี่ห้อ RTI รุ่น Back Piranha (ราชอาณาจักรสวีเดน)

กลุ่มศึกษา

เครื่องเอกซเรย์ทันตกรรมแบบใส่ตัวรับภาพไว้ในช่องปากของโรงพยาบาลศูนย์ โรงพยาบาลทั่วไป

โรงพยาบาลชุมชน และคลินิก ทั้งภาครัฐและเอกชน ในเขตพื้นที่จังหวัดตรัง พัทลุง และสตูล ปีงบประมาณ พ.ศ. 2560–2566 จำนวน 66, 80, 50, 64, 19, 32 และ 60 เครื่อง ตามลำดับ รวมทั้งสิ้น 371 เครื่อง แบ่งเป็น เครื่องเอกซเรย์ทันตกรรมแบบใส่ตัวรับภาพไว้ในช่องปากชนิดติดตั้งประจำที่ (intraoral dental X-ray machine) จำนวน 360 เครื่อง และเครื่องเอกซเรย์ทันตกรรมแบบใส่ตัวรับภาพไว้ในช่องปากชนิดมือถือ (intraoral hand-held portable dental X-ray unit) จำนวน 11 เครื่อง ดังแสดงในตารางที่ 1 และแบ่งตามชนิดตัวรับภาพ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 จำนวนเครื่องเอกซเรย์ทันตกรรมที่ทำการศึกษา

ชนิดเครื่องเอกซเรย์ทันตกรรม	ปีงบประมาณ						
	2560	2561	2562	2563	2564	2565	2566
แบบติดตั้ง	65	78	49	60	19	30	59
แบบมือถือ	1	2	1	4	–	2	1

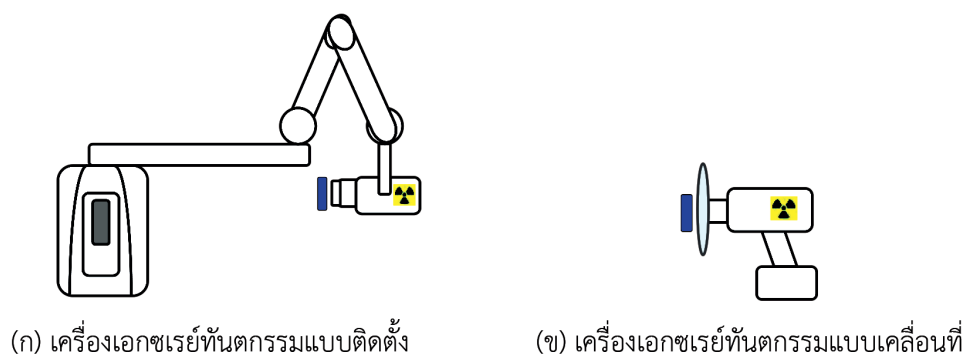
ตารางที่ 2 เครื่องเอกซเรย์ทันตกรรมแบ่งตามชนิดตัวรับภาพ

ปีงบประมาณ	จำนวนทั้งหมด (เครื่อง)	ชนิดตัวรับภาพ			
		ระบบฟิล์ม		ระบบดิจิทัล (CR/DR)	
		จำนวน (เครื่อง)	ร้อยละ	จำนวน (เครื่อง)	ร้อยละ
2560	66	64	97.0	2	3.0
2561	80	62	77.5	18	22.5
2562	50	37	74.0	13	26.0
2563	64	43	67.2	21	32.8
2564	19	9	47.4	10	52.6
2565	32	9	28.1	23	71.9
2566	60	20	33.3	40	66.7

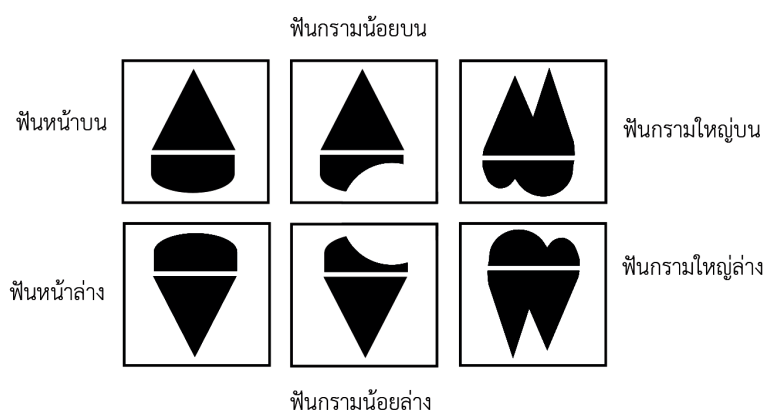
วิธีการศึกษา

วัดค่าปริมาณรังสีด้วยเครื่องมือตรวจสอบคุณภาพเครื่องเอกซเรย์ โดยวางหัววัดห่างจากปลายกระบอกลำรังสี 1 เซนติเมตร ดังแสดงในภาพที่ 1 วัดบริเวณปลายกระบอกลำรังสี (open ended cone) ที่เกิดจากการตั้งค่าทางเทคนิคในการถ่ายภาพรังสี เทคนิครอบปลายราก (periapical; PA) สำหรับผู้ป่วยที่เป็น

ผู้ใหญ่ ใช้เครื่องเอกซเรย์ทันตกรรมแบบใส่ตัวรับภาพไว้ในช่องปากชนิดติดตั้งประจำที่ และเครื่องเอกซเรย์ทันตกรรมแบบใส่ตัวรับภาพไว้ในช่องปากชนิดมือถือ โดยไม่ต้องมีผู้ป่วย แยกตามกลุ่มซี่ฟัน⁽³⁾ ได้แก่ ฟันหน้าบน ฟันหน้าล่าง ฟันกรามน้อยบน ฟันกรามน้อยล่าง ฟันกรามใหญ่บน และฟันกรามใหญ่ล่าง ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 1 เครื่องเอกซเรย์ทันตกรรม



ภาพที่ 2 สัญลักษณ์ชี้ฟันหน้าจอเครื่องเอกซเรย์

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำค่าปริมาณรังสีของหน่วยงานมาแยกตามปีงบประมาณ แยกตามกลุ่มชี้ฟัน และแยกตามชนิดตัวรับภาพ หาค่าต่ำสุด (minimum; min) ค่าสูงสุด (maximum; max) ค่าเฉลี่ย (mean) ค่ามัธยฐาน (median) ค่าควอไทล์ที่ 3 (the third quartile; Q3) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; S.D.) หาค่าความต่างศักย์หลอดเอกซเรย์ (kV) และค่ากระแสหลอดคูณกับเวลา (mAs) ทำการเปรียบเทียบค่าปริมาณรังสีของกลุ่มและค่าปริมาณรังสีเมื่อแยกตามชนิดตัวรับภาพระบบฟิล์มและระบบดิจิทัลกับค่าอ้างอิงของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์⁽⁶⁾

ผล

จากการรวบรวมข้อมูลได้ค่าปริมาณรังสีของกลุ่มชี้ฟัน ฟันหน้าบน ฟันหน้าล่าง ฟันกรามน้อยบน ฟันกรามน้อยล่าง ฟันกรามใหญ่บน และฟันกรามใหญ่อล่าง เท่ากับ 1.1–1.7, 0.9–1.4, 1.4–2.2, 1.3–1.8, 1.8–2.9 และ 1.4–2.3 mGy ตามลำดับ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับค่าอ้างอิงของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่มีค่าเท่ากับ 2.3, 1.9, 3.1, 2.4, 4.0 และ 3.1 mGy ตามลำดับ พบว่าไม่เกินค่าอ้างอิงของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ดังแสดงในตารางที่ 3 เมื่อแยกตามชนิดตัวรับภาพระบบฟิล์มได้ค่าปริมาณรังสีของกลุ่มชี้ฟัน เท่ากับ 1.5–2.1, 1.4–1.8, 2.1–2.6, 1.8–2.2, 3.0–3.3 และ 2.2–3.0 mGy ตามลำดับ และตัวรับภาพระบบดิจิทัลค่าที่ได้ เท่ากับ 1.0–1.5, 0.8–1.3, 1.3–1.9, 0.9–1.6, 1.6–2.4 และ 1.2–2.0 mGy ตามลำดับ พบว่าไม่เกินค่าอ้างอิงของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์เช่นกัน ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 3 ค่าปริมาณรังสีของกลุ่มซีฟันเปรียบเทียบกับค่าอ้างอิงของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ซีฟัน	ปริมาณรังสี (mGy)							ค่าอ้างอิงกรมา (ปี พ.ศ. 2560) ⁽⁶⁾
	2560	2561	2562	2563	2564	2565	2566	
ฟันหน้าบน	1.7	1.6	1.5	1.6	1.4	1.1	1.5	2.3
ฟันหน้าล่าง	1.4	1.4	1.4	1.2	1.1	0.9	1.2	1.9
ฟันกรามน้อยบน	2.1	2.2	2.0	1.9	2.1	1.4	1.8	3.1
ฟันกรามน้อยล่าง	1.7	1.8	1.7	1.6	1.8	1.3	1.4	2.4
ฟันกรามใหญ่บน	2.9	2.7	2.6	2.4	2.7	1.8	2.2	4.0
ฟันกรามใหญ่ล่าง	2.2	2.3	2.3	1.9	2.1	1.4	1.8	3.1

หมายเหตุ: ปี พ.ศ. 2560 จำนวน 66 เครื่อง, ปี พ.ศ. 2561 จำนวน 80 เครื่อง, ปี พ.ศ. 2562 จำนวน 50 เครื่อง, ปี พ.ศ. 2563 จำนวน 64 เครื่อง, ปี พ.ศ. 2564 จำนวน 19 เครื่อง, ปี พ.ศ. 2565 จำนวน 32 เครื่อง และ ปี พ.ศ. 2566 จำนวน 60 เครื่อง และกรมา หมายถึง กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ตารางที่ 4 ค่าปริมาณรังสีของกลุ่มซีฟันแยกตามชนิดตัวรับภาพระบบฟิล์มและดิจิทัล เปรียบเทียบกับค่าอ้างอิงของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ซีฟัน	ปริมาณรังสี (mGy)														ค่าอ้างอิง กรมฯ (ปี พ.ศ. 2560) ⁽⁶⁾
	2560		2561		2562		2563		2564		2565		2566		
	ฟิล์ม	CR/DR	ฟิล์ม	CR/DR	ฟิล์ม	CR/DR	ฟิล์ม	CR/DR	ฟิล์ม	CR/DR	ฟิล์ม	CR/DR	ฟิล์ม	CR/DR	
ฟันหน้าบน	1.8	1.5	1.6	1.5	1.8	1.3	1.8	1.1	2.0	1.1	1.5	1.0	2.1	1.3	2.3
ฟันหน้าล่าง	1.5	1.2	1.5	1.3	1.5	1.0	1.5	0.9	1.8	0.9	1.4	0.8	1.4	1.1	1.9
ฟันกรามน้อยบน	2.1	1.9	2.2	1.9	2.3	1.7	2.3	1.4	2.6	1.3	2.4	1.3	2.6	1.6	3.1
ฟันกรามน้อยล่าง	1.8	1.6	1.8	1.5	1.9	1.3	1.8	1.1	2.2	1.1	1.9	0.9	2.0	1.3	2.4
ฟันกรามใหญ่บน	3.0	2.4	3.0	2.3	3.0	2.2	3.1	1.8	3.2	1.7	3.0	1.6	3.3	2.0	4.0
ฟันกรามใหญ่ล่าง	2.3	2.0	2.4	2.0	2.5	1.5	2.2	1.4	3.0	1.3	2.5	1.2	2.6	1.5	3.1

หมายเหตุ: ระบบฟิล์ม ปี พ.ศ. 2560 จำนวน 64 เครื่อง, ปี พ.ศ. 2561 จำนวน 62 เครื่อง, ปี พ.ศ. 2562 จำนวน 37 เครื่อง, ปี พ.ศ. 2563 จำนวน 43 เครื่อง, ปี พ.ศ. 2564 จำนวน 9 เครื่อง, ปี พ.ศ. 2565 จำนวน 9 เครื่อง และ ปี พ.ศ. 2566 จำนวน 20 เครื่อง ระบบดิจิทัล ปี 2560 พ.ศ. จำนวน 2 เครื่อง, ปี พ.ศ. 2561 จำนวน 18 เครื่อง, ปี พ.ศ. 2562 จำนวน 13 เครื่อง, ปี พ.ศ. 2563 จำนวน 21 เครื่อง, ปี พ.ศ. 2564 จำนวน 10 เครื่อง, ปี พ.ศ. 2565 จำนวน 23 เครื่อง และ ปี พ.ศ. 2566 จำนวน 40 เครื่อง และกรมา หมายถึง กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

จากการหาค่าทางเทคนิคถ่ายภาพรังสีที่ใช้
งานและนำค่าปริมาณรังสีของกลุ่มซีฟันหาค่าต่ำสุด
ค่าสูงสุด ค่าเฉลี่ย ค่ามัธยฐาน ค่าควอไทล์ที่ 3 และ
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน พบว่าการถ่ายภาพรังสีฟันหน้าบน
ค่าปริมาณรังสีเฉลี่ย/ค่ามัธยฐาน/ค่าควอไทล์ที่ 3 อยู่ในช่วง
1.2–1.9/1.1–1.7/1.5–2.5 mGy ใช้ค่าทางเทคนิค
ถ่ายภาพรังสีเฉลี่ย 65.0–66.7 kV, 1.77–3.43 mAs
การถ่ายภาพรังสีฟันหน้าล่าง ค่าปริมาณรังสีเฉลี่ย/ค่า
มัธยฐาน/ค่าควอไทล์ที่ 3 อยู่ในช่วง 1.1–1.5/0.9–

1.4/1.4–2.1 mGy ใช้ค่าทางเทคนิคถ่ายภาพรังสีเฉลี่ย
65.2–66.7 kV, 1.46–2.80 mAs การถ่ายภาพรังสี
ฟันกรามน้อยบน ค่าปริมาณรังสีเฉลี่ย/ค่ามัธยฐาน/
ค่าควอไทล์ที่ 3 อยู่ในช่วง 1.7–2.6/1.4–2.2/2.4–3.4
mGy ใช้ค่าทางเทคนิคถ่ายภาพรังสีเฉลี่ย 64.9–66.7
kV, 2.40–4.49 mAs การถ่ายภาพรังสีฟันกรามน้อยล่าง
ค่าปริมาณรังสีเฉลี่ย/ค่ามัธยฐาน/ค่าควอไทล์ที่ 3 อยู่ในช่วง
1.4–1.9/1.3–1.8/1.9–2.4 mGy ใช้ค่าทางเทคนิค
ถ่ายภาพรังสีเฉลี่ย 65.3–66.6 kV, 1.93–3.52 mAs

การถ่ายภาพรังสีฟันกรามใหญ่บน ค่าปริมาณรังสีเฉลี่ย/
ค่ามาตรฐาน/ค่าควอไทล์ที่ 3 อยู่ในช่วง 2.2–3.3/1.8–2.9/
3.1–4.3 mGy ใช้ค่าทางเทคนิคถ่ายภาพรังสีเฉลี่ย
64.9–66.8 kV, 3.10–5.62 mAs การถ่ายภาพรังสี

ฟันกรามใหญ่ล่าง ค่าปริมาณรังสีเฉลี่ย/ค่ามาตรฐาน/
ค่าควอไทล์ที่ 3 อยู่ในช่วง 1.8–2.5/1.4–2.3/2.4–3.2
mGy ใช้ค่าทางเทคนิคถ่ายภาพรังสีเฉลี่ย 65.1–66.8
kV, 2.49–4.40 mAs ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ค่าทางเทคนิคถ่ายภาพรังสีและค่าปริมาณรังสีของกลุ่มซี่ฟันแยกตามปีงบประมาณ

ปีงบประมาณ	ซี่ฟัน	kV	mAs	ปริมาณรังสี (mGy)			
		mean	mean	mean	median	Q3	S.D.
2560	ฟันหน้าบน	66.7	3.33	1.9	1.7	2.5	0.996
	ฟันหน้าล่าง	66.7	2.80	1.5	1.4	2.1	0.922
	ฟันกรามน้อยบน	66.7	4.40	2.6	2.1	3.4	1.366
	ฟันกรามน้อยล่าง	66.5	3.42	1.9	1.7	2.4	1.014
	ฟันกรามใหญ่บน	66.6	5.62	3.3	2.9	4.3	1.576
	ฟันกรามใหญ่ล่าง	66.7	4.40	2.5	2.2	3.2	1.140
2561	ฟันหน้าบน	66.5	3.43	1.8	1.6	2.4	0.907
	ฟันหน้าล่าง	66.5	2.80	1.4	1.4	1.9	0.744
	ฟันกรามน้อยบน	66.5	4.49	2.4	2.2	3.1	1.244
	ฟันกรามน้อยล่าง	66.6	3.52	1.8	1.8	2.3	0.889
	ฟันกรามใหญ่บน	66.8	5.54	3.1	2.7	3.9	1.562
	ฟันกรามใหญ่ล่าง	66.8	4.40	2.3	2.3	2.9	1.099
2562	ฟันหน้าบน	65.2	2.96	1.8	1.5	1.9	1.238
	ฟันหน้าล่าง	65.5	2.39	1.5	1.4	1.6	1.184
	ฟันกรามน้อยบน	65.3	3.85	2.3	2.0	2.6	1.394
	ฟันกรามน้อยล่าง	65.4	3.07	1.8	1.7	2.1	1.243
	ฟันกรามใหญ่บน	65.4	5.02	3.0	2.6	3.6	1.614
	ฟันกรามใหญ่ล่าง	65.4	3.90	2.3	2.3	2.7	1.325
2563	ฟันหน้าบน	65.0	2.76	1.7	1.6	2.1	0.936
	ฟันหน้าล่าง	65.2	2.14	1.3	1.2	1.6	0.836
	ฟันกรามน้อยบน	64.9	3.46	2.1	1.9	2.7	1.125
	ฟันกรามน้อยล่าง	65.3	2.72	1.6	1.6	2.0	0.923
	ฟันกรามใหญ่บน	64.9	4.41	2.6	2.4	3.4	1.342
	ฟันกรามใหญ่ล่าง	65.1	3.36	2.0	1.9	2.5	1.083
2564	ฟันหน้าบน	65.0	2.88	1.6	1.4	2.1	0.676
	ฟันหน้าล่าง	65.5	2.46	1.4	1.1	1.9	0.677
	ฟันกรามน้อยบน	65.2	3.97	2.2	2.1	2.7	1.186
	ฟันกรามน้อยล่าง	65.3	3.14	1.7	1.8	2.2	0.764
	ฟันกรามใหญ่บน	65.2	4.99	2.7	2.7	3.5	1.375
	ฟันกรามใหญ่ล่าง	65.3	4.01	2.2	2.1	3.1	1.082
2565	ฟันหน้าบน	65.6	1.77	1.2	1.1	1.5	0.615
	ฟันหน้าล่าง	65.8	1.46	1.1	0.9	1.4	0.531
	ฟันกรามน้อยบน	65.4	2.40	1.7	1.4	2.4	0.909

ตารางที่ 5 ค่าทางเทคนิคถ่ายภาพรังสีและค่าปริมาณรังสีของกลุ่มซีฟันแยกตามปีงบประมาณ (ต่อ)

ปีงบประมาณ	ซีฟัน	kV	mAs	ปริมาณรังสี (mGy)			
		mean	mean	mean	median	Q3	S.D.
2566	ฟันกรามน้อยล่าง	65.6	1.93	1.4	1.3	1.9	0.755
	ฟันกรามใหญ่บน	65.3	3.10	2.2	1.8	3.1	1.178
	ฟันกรามใหญ่ล่าง	65.4	2.49	1.8	1.4	2.4	1.106
	ฟันหน้าบน	65.2	2.55	1.6	1.5	2.0	0.700
	ฟันหน้าล่าง	65.2	2.02	1.2	1.2	1.6	0.526
	ฟันกรามน้อยบน	65.5	3.23	2.0	1.8	2.6	0.970
	ฟันกรามน้อยล่าง	65.4	2.50	1.5	1.4	2.0	0.701
	ฟันกรามใหญ่บน	65.7	3.99	2.6	2.2	3.2	1.238
	ฟันกรามใหญ่ล่าง	65.6	3.16	1.9	1.8	2.5	0.888

หมายเหตุ: ปี พ.ศ. 2560 จำนวน 66 เครื่อง, ปี พ.ศ. 2561 จำนวน 80 เครื่อง, ปี พ.ศ. 2562 จำนวน 50 เครื่อง, ปี พ.ศ. 2563 จำนวน 64 เครื่อง, ปี พ.ศ. 2564 จำนวน 19 เครื่อง, ปี พ.ศ. 2565 จำนวน 32 เครื่อง และ ปี พ.ศ. 2566 จำนวน 60 เครื่อง

เมื่อหาค่าความต่างศักย์หลอดเอกซเรย์ (kV) ค่ากระแสหลอดคูณกับเวลา (mAs) และค่าปริมาณรังสีของกลุ่มซีฟัน แยกตามชนิดตัวรับภาพระบบฟิล์มเปรียบเทียบกับระบบดิจิทัล พบว่าหน่วยงานที่ใช้ตัวรับภาพระบบดิจิทัลใช้ค่า kV ต่ำกว่าระบบฟิล์มทุกกลุ่มซีฟัน ค่า mAs ตั้งแต่ปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 เป็นต้นไป ใช้ค่า mAs ต่ำกว่าระบบฟิล์มทุกกลุ่มซีฟัน มีเฉพาะปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 ที่ยังใช้ mAs สูงกว่าระบบฟิล์ม และค่าปริมาณรังสีของกลุ่ม พบว่าระบบดิจิทัลมีค่าปริมาณรังสีที่ต่ำกว่าระบบฟิล์มในทุกกลุ่มซีฟันและทุกปีงบประมาณ ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ค่าทางเทคนิคถ่ายภาพรังสีและค่าปริมาณรังสีของกลุ่มซีฟันของตัวรับภาพระบบฟิล์มเปรียบเทียบกับระบบดิจิทัลแยกตามกลุ่มซีฟัน

ซีฟัน	ปีงบประมาณ	kV (mean)		mAs (mean)		ปริมาณรังสี (mGy)	
		ฟิล์ม	CR/DR	ฟิล์ม	CR/DR	ฟิล์ม	CR/DR
ฟันหน้าบน	2560	66.8	62.1	3.30	4.21	1.8	1.5
	2561	67.3	63.8	3.51	3.16	1.6	1.5
	2562	65.9	63.2	3.16	2.42	1.8	1.3
	2563	65.2	64.6	3.06	2.15	1.8	1.1
	2564	65.3	64.8	3.55	2.28	2.0	1.1
	2565	67.2	64.9	2.65	1.39	1.5	1.0
	2566	68.2	63.8	3.47	2.10	2.1	1.3
ฟันหน้าล่าง	2560	66.8	61.6	2.78	3.43	1.5	1.2
	2561	67.3	63.9	2.85	2.66	1.5	1.3
	2562	66.3	63.3	2.55	1.96	1.5	1.0
	2563	65.5	64.8	2.36	1.71	1.5	0.9
	2564	65.8	65.2	3.19	1.81	1.8	0.9
	2565	67.5	65.0	2.27	1.11	1.4	0.8
	2566	68.0	63.8	2.68	1.68	1.4	1.1

ตารางที่ 6 ค่าทางเทคนิคถ่ายภาพรังสีและค่าปริมาณรังสีของกลุ่มซีฟันของตัวรับภาพระบบฟิล์มเปรียบเทียบกับระบบดิจิทัลแยกตามกลุ่มซีฟัน (ต่อ)

ซีฟัน	ปีงบประมาณ	kV (mean)		mAs (mean)		ปริมาณรังสี (mGy)	
		ฟิล์ม	CR/DR	ฟิล์ม	CR/DR	ฟิล์ม	CR/DR
ฟันกรามน้อยบน	2560	66.9	61.9	4.38	5.02	2.1	1.9
	2561	67.3	63.7	4.65	3.92	2.2	1.9
	2562	66.1	63.1	4.13	3.06	2.3	1.7
	2563	65.2	64.4	3.85	2.69	2.3	1.4
	2564	65.2	65.1	5.16	2.91	2.6	1.3
	2565	67.1	64.7	3.72	1.83	2.4	1.3
	2566	68.2	64.2	4.64	2.55	2.6	1.6
ฟันกรามน้อยล่าง	2560	66.7	59.3	3.37	4.73	1.8	1.6
	2561	67.3	63.9	3.60	3.23	1.8	1.5
	2562	66.2	63.3	3.31	2.40	1.9	1.3
	2563	65.5	64.8	3.02	2.13	1.8	1.1
	2564	65.4	65.2	4.13	2.25	2.2	1.1
	2565	67.3	64.9	3.17	1.40	1.9	0.9
	2566	68.2	64.1	3.63	1.95	2.0	1.3
ฟันกรามใหญ่บน	2560	66.8	61.9	5.60	6.02	3.0	2.4
	2561	67.7	63.9	5.78	4.70	3.0	2.3
	2562	66.3	63.0	5.44	3.85	3.0	2.2
	2563	65.2	64.3	4.98	3.26	3.1	1.8
	2564	65.4	65.0	6.35	3.76	3.2	1.7
	2565	66.7	64.7	4.94	2.30	3.0	1.6
	2566	67.9	64.6	5.71	3.15	3.3	2.0
ฟันกรามใหญ่ล่าง	2560	66.9	61.8	4.38	5.02	2.3	2.0
	2561	67.6	63.9	4.55	3.89	2.4	2.0
	2562	67.1	63.1	4.22	2.99	2.5	1.5
	2563	65.4	64.5	3.69	2.69	2.2	1.4
	2564	65.6	65.0	5.34	2.81	3.0	1.3
	2565	67.0	64.8	4.10	1.78	2.5	1.2
	2566	68.2	64.3	4.62	2.45	2.6	1.5

หมายเหตุ: ระบบฟิล์ม ปี พ.ศ. 2560 จำนวน 64 เครื่อง, ปี พ.ศ. 2561 จำนวน 62 เครื่อง, ปี พ.ศ. 2562 จำนวน 37 เครื่อง, ปี พ.ศ. 2563 จำนวน 43 เครื่อง, ปี พ.ศ. 2564 จำนวน 9 เครื่อง, ปี พ.ศ. 2565 จำนวน 9 เครื่อง และ ปี พ.ศ. 2566 จำนวน 20 เครื่องระบบดิจิทัล ปี พ.ศ. 2560 จำนวน 2 เครื่อง, ปี พ.ศ. 2561 จำนวน 18 เครื่อง, ปี พ.ศ. 2562 จำนวน 13 เครื่อง, ปี พ.ศ. 2563 จำนวน 21 เครื่อง, ปี พ.ศ. 2564 จำนวน 10 เครื่อง, ปี พ.ศ. 2565 จำนวน 23 เครื่อง และ ปี พ.ศ. 2566 จำนวน 40 เครื่อง

วิจารณ์

ผลจากการเฝ้าระวังการได้รับปริมาณรังสีจากเครื่องเอกซเรย์ทันตกรรมแบบใส่ตัวรับภาพไว้ในช่องปาก ในพื้นที่จังหวัดตรัง พัทลุง และสตูล ปีงบประมาณ

พ.ศ. 2560–2566 พบว่าค่าปริมาณรังสีของกลุ่มซีฟันรวมถึงเมื่อแยกตามชนิดตัวรับภาพระบบฟิล์มและดิจิทัลไม่เกินค่าอ้างอิงของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์⁽⁶⁾ ทุกกลุ่มซีฟัน และค่าทางเทคนิค ซึ่งส่วนใหญ่เครื่องเอกซเรย์ที่ใช้ตัว

รับภาพระบบดิจิทัลใช้ค่า kV และ mAs ต่ำกว่าระบบฟิล์ม ซึ่งปริมาณรังสี output ที่ออกจากเครื่องเอกซเรย์อาจมีค่าแปรเปลี่ยนตามคุณสมบัติของตัวแปรอื่น ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณรังสีได้ เช่น ระดับพลังงานแหล่งจ่ายไฟของหลอดเอกซเรย์⁽⁷⁾ เทคโนโลยีของชนิดตัวรับภาพชนิดของซีฟีน การตั้งค่าด้วยมือ (manual) หรือรูปแบบดิจิทัล⁽⁶⁾ เป็นต้น ผลจากการวัดปริมาณรังสี พบว่าเครื่องเอกซเรย์ทันตกรรมชนิดตัวรับภาพระบบดิจิทัลมีค่าปริมาณรังสีน้อยกว่าระบบฟิล์มทุกกลุ่มซีฟีนและทุกปีงบประมาณ เมื่อพิจารณาแนวโน้มการใช้งาน พบว่ามีการใช้ตัวรับภาพระบบดิจิทัลที่เพิ่มสูงขึ้น ปีงบประมาณ พ.ศ. 2560–2566 คิดเป็นร้อยละ 3.0, 22.5, 26.0, 32.8, 52.6, 71.9 และ 66.7 ตามลำดับ

จากค่าปริมาณรังสีอ้างอิงที่ขึ้นกับพื้นที่หรือแต่ละประเทศ เมื่อจะใช้ต้องเปรียบเทียบกับค่าอ้างอิงของประเทศไทย แต่ประเทศไทยยังไม่ได้มีการจัดทำค่าปริมาณรังสีอ้างอิงใหม่ที่ ICRP 135 ได้แนะนำให้ทบทวนค่าปริมาณรังสีวินิจฉัยอ้างอิงทุก 3–5 ปี⁽⁸⁾ และค่าปริมาณรังสีอ้างอิงประเทศไทยที่ดำเนินการล่าสุดเมื่อปี พ.ศ. 2560⁽⁶⁾ มีค่าเท่ากับ 2.3, 1.9, 3.1, 2.4, 4.0 และ 3.1 mGy ตามลำดับ เป็นเครื่องเอกซเรย์ที่ใช้ตัวรับภาพระบบฟิล์ม จำนวน 494 เครื่อง คิดเป็นร้อยละ 90.3 ระบบดิจิทัล จำนวน 53 เครื่อง คิดเป็นร้อยละ 8.7 ซึ่งเป็นการใช้ตัวรับภาพระบบฟิล์มเป็นส่วนใหญ่ขณะที่ค่าอ้างอิงของประเทศญี่ปุ่น⁽⁵⁾ ประกาศใช้เมื่อปี พ.ศ. 2563 ซึ่งเป็นระบบดิจิทัล มีค่าเท่ากับ 1.1, 1.0, 1.6, 1.1, 2.0 และ 1.5 mGy ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าค่าอ้างอิงของประเทศไทย และเพื่อให้มีการใช้ค่าอ้างอิงอย่างเหมาะสม ประเทศไทยควรพิจารณาจัดทำค่าปริมาณรังสีอ้างอิงของเครื่องเอกซเรย์ทันตกรรมใหม่

อย่างไรก็ตามการปรับลดค่าปริมาณรังสีในการถ่ายภาพรังสีให้กับผู้ป่วย ต้องคำนึงถึงคุณภาพของภาพรังสีเป็นสำคัญ การลดปริมาณรังสีอาจทำให้ภาพรังสีไม่สามารถวินิจฉัยโรคได้ ดังนั้นการพิจารณาปรับลดปริมาณรังสีให้พิจารณาจากค่า median (the 50th percentile value; P50) ของกลุ่ม เปรียบเทียบกับค่า median ของค่าอ้างอิงระดับประเทศ หากพบว่าค่า median ของกลุ่มต่ำกว่าค่า median ของค่าอ้างอิง

ระดับประเทศให้พิจารณาคุณภาพของภาพรังสีมากกว่าที่จะปรับลดปริมาณรังสี⁽⁸⁾ และค่าที่ใช้เปรียบเทียบกับค่าอ้างอิงต้องได้จากตัวแทนกลุ่มที่เพียงพอและกระจายให้ครอบคลุม ไม่สามารถเปรียบเทียบกับค่าปริมาณรังสีที่ใช้กับผู้ป่วยรายต่อรายได้

สรุป

ค่าปริมาณรังสีของกลุ่มซีฟีนจากการถ่ายภาพรังสีฟันทั้ง 6 กลุ่มซีฟีน ของโรงพยาบาลศูนย์ โรงพยาบาลทั่วไป โรงพยาบาลชุมชน และคลินิก ทั้งภาครัฐและเอกชน ในเขตพื้นที่จังหวัดตรัง พัทลุง และสตูล ปีงบประมาณ พ.ศ. 2560–2566 จำนวน 66, 80, 50, 64, 19, 32 และ 60 เครื่อง ตามลำดับ พบว่าไม่เกินค่าอ้างอิงของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ทั้งหมด แต่เครื่องเอกซเรย์ที่ใช้ตัวรับภาพระบบฟิล์มมีการใช้ปริมาณรังสีสูงกว่าระบบดิจิทัล ดังนั้นควรมีการปรับลดค่าทางเทคนิคในการถ่ายภาพรังสีเพื่อให้ผู้ปฏิบัติงาน รวมถึงผู้รับบริการได้รับรังสีน้อยที่สุด และสิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึง คือ คุณภาพของภาพรังสีสามารถนำไปวินิจฉัยโรคได้อย่างถูกต้อง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทันตแพทย์และเจ้าหน้าที่ผู้เกี่ยวข้องของโรงพยาบาลและคลินิก ที่ให้ความร่วมมือในการเก็บข้อมูล และขอขอบคุณผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ 12/1 ตรัง กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ หัวหน้าห้องปฏิบัติการรังสีและเครื่องมือแพทย์ รวมทั้งผู้ร่วมงานทุกท่านที่ให้การสนับสนุนให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. ค่าปริมาณรังสีอ้างอิงในการถ่ายภาพรังสีวินิจฉัยทางการแพทย์ของประเทศไทย 2566. กรุงเทพฯ: บริษัท ปิยอนด์พับลิชชิง จำกัด; 2566.
2. IAEA. International basic safety standards for protection against ionizing radiation and for the safety of radiation sources, safety series

- No. 115. Vienna: International Atomic Energy Agency; 1996.
3. Equipment factors in reduction of radiation doses to patients. In: European Commission. European guidelines on radiation protection in dental radiology: the safe use of radiographs in dental practice, issue No. 136. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities; 2004. p. 41–50.
 4. U.S. Food and Drug Administration. Illegal sale of potentially unsafe hand-held dental x-ray units: FDA safety communication. [online]. 2012; [cited 2024 Mar 17]; Available from: URL: <http://wayback.archive-it.org/7993/20170722045031/https://www.fda.gov/Radiation-EmittingProducts/Radiation-Safety/AlertsandNotices/ucm291214.htm>.
 5. Japan Network for Research and Information on Medical Exposures. National diagnostic reference levels in Japan. [online]. 2020; [cited 2024 Jan 9]; [22 screens]. Available from: URL: https://j-rime.qst.go.jp/report/DRL2020_Engver.pdf.
 6. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. ค่าปริมาณรังสีอ้างอิงจากการถ่ายภาพรังสีวินิจฉัยด้วยเครื่องเอกซเรย์ฟันชนิดถ่ายภายในช่องปาก. [ออนไลน์]. 2561; [สืบค้น 9 ม.ค. 2567]; [10 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: [http://dmcsmartlifeblog.com/userfiles/files/ค่าปริมาณรังสีอ้างอิงDent-final\(1\).pdf](http://dmcsmartlifeblog.com/userfiles/files/ค่าปริมาณรังสีอ้างอิงDent-final(1).pdf).
 7. Kim EK. Effect of amount of battery charge on tube voltage in different hand-held dental x-ray systems. *Imaging Sci Dent* 2012; 42: 1–4.
 8. Vaňo E, Miller DL, Martin CJ, Rehani MM, Kang K, Rosenstein M, et al. ICRP publication 135: diagnostic reference levels in medical imaging. *Ann ICRP* 2017; 46(1): 1–144.

Surveillance of Patient Entrance Dose of Intra-oral Dental Radiography in Trang, Phatthalung, and Satun Provinces During 2017–2023

Sirikwan Yewhiang, Siriwan Buncharat, Suchawalee Chuamahawan,
and Jeeraporn Songkow

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

ABSTRACT Dental radiography is important for diagnosis, treatment planning, and orodental treatment follow-up, and is one-third of all X-ray images. To prevent patients from receiving unnecessary radiation and to reduce radiation dose usage, the Regional Medical Sciences Center 12/1 Trang, Department of Medical Sciences, conducted surveillance of radiation doses from intra-oral dental radiography in Trang, Phatthalung, and Satun provinces. From fiscal year 2017 to 2023, there were 66, 80, 50, 64, 19, 32, and 60 intraoral X-ray units, respectively. The doses were measured at an open-end cone called the Patient Entrance Dose (PED). The exposure techniques were set for six dental areas: maxilla incisor, mandible incisor, maxilla canine-premolar, mandible canine-premolar, maxilla molar, and mandible molar. The PED calculated the median as 1.1–1.7, 0.9–1.4, 1.4–2.2, 1.3–1.8, 1.8–2.9, and 1.4–2.3 mGy, respectively. As by the film system, these are 1.5–2.1, 1.4–1.8, 2.1–2.6, 1.8–2.2, 3.0–3.3, and 2.2–3.0 mGy, respectively. For the digital imaging system, these are 1.0–1.5, 0.8–1.3, 1.3–1.9, 0.9–1.6, 1.6–2.4, and 1.2–2.0 mGy, respectively. These results were within the limit of the DRLs issued by the Department of Medical Sciences which are 2.3, 1.9, 3.1, 2.4, 4.0, and 3.1 mGy, respectively. This indicated that the agency that used the film system, PED exceeded the digital imaging system for all groups of teeth. Radiation safety should be concerned for both users and customers.

Keywords: Dental X-ray, Intra-oral radiograph, Patient Entrance Dose, Effective dose

Acute and Sub-Chronic Oral Toxicity of Mycoprotein Product in Wistar Rats

Passaraporn Srimangkornkaew¹, Kittigan Suwannasaroj¹, Kobkul Laoteng²,
Thanaporn Palasak², and Warinthon Chamkhuy²

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

²Industrial Bioprocess Technology Research Team, Functional Ingredients and Food Innovation Research Group, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Pathum Thani 12120, Thailand

ABSTRACT Alternative proteins are becoming more popular with consumers nowadays. Various alternative proteins, such as those from plants, insects, and even microorganisms, are widely available and distributed. In the past, Thailand could not produce protein from microorganisms and had to import it from abroad. Currently, Thailand can successfully develop the technology for producing mycoprotein from the fungus *Aspergillus oryzae* strain BCC7051 found in the country. However, oral toxicology studies of this product have never been undertaken. The safety evaluation has to be conducted on animals before the human studies to obtain safety information on the products for consumers. This study aimed to assess the acute and sub-chronic oral toxicity of mycoprotein in Wistar rats. The results showed that mycoprotein at 300 and 2,000 mg/kg body weight (BW) did not cause acute toxicity and mortalities in the rats, indicating that mycoprotein was classified in GHS (Globally Harmonised System for Classification and Labeling of Chemicals) category 5 or unclassified, with the LD₅₀ cut-off at 5,000 mg/kg BW or over. In the sub-chronic oral toxicity testing, mycoprotein was administered consecutively for 90 days at doses of 500, 1,000, and 2,000 mg/kg BW, with a 14-day recovery period. It was concluded that the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) of mycoprotein was 2,000 mg/kg BW in Wistar rats.

Keywords: Mycoprotein, *Aspergillus oryzae*, Acute and sub-chronic oral toxicity in rat

Corresponding author E-mail: kittigan.suw@mahidol.edu

Received: 3 July 2024

Revised: 27 January 2025

Accepted: 3 February 2025

Introduction

An alternative protein derived from fungal fermentation is shaped into many food products as a meat substitute called “mycoprotein”. Mycoprotein can be produced from the fermentation process of microorganisms of the fungal group. It has the appearance and shape of cells like filaments with a high amount of protein and contains various nutrients that have nutritional value,^(1,2) but has no toxins from mold or mycotoxins. Mycoprotein has been reported to be produced from filamentous fungi of various strains⁽³⁾, and it is an alternative protein source and meat substitute responding to the needs of consumer groups such as vegetarians and flexitarians. Production of mycoprotein from fungi has many advantages because it needs less space to produce, uses less water, and emits less greenhouse gas than raising animals, moreover, this can be expanded more easily and its quality can be controlled. Mycoprotein is expected to be the food for the future (future food) which helps reduce environmental impacts⁽⁴⁾ and meet the increasing global protein demand sustainably.

Mycoprotein produced from *Fusarium venenatum* has been registered with the UK Food and Drug Administration, and in 2001, was classified as a safe food. It has been on the market since 2002 and is accepted as a safe food ingredient⁽⁵⁾. Earlier, Thailand did not produce mycoprotein by itself and needed to import it from abroad. The Functional Ingredients and Food Innovation Research Group at the National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Thailand, has successfully developed the technology for producing this protein using the liquid fermentation process from *Aspergillus*

oryzae strain BCC7051, which is found in the country and is considered a Thai innovation. The fungus *A. oryzae* is used in the production of various food products available on the market, such as tempeh, hamanatto, miso, and shoyu⁽⁶⁾. The strains of *A. oryzae* are safe and classified as food-grade microbes that have remarkable features such as high protein production and hypha formation to get a better texture that is nutritious and safe,⁽⁷⁾ in addition, there are no toxins or mycotoxins⁽⁸⁾ harmful to consumers. Generally, it is used as semi-industrial liquid fermentation technology under Codex Good Hygiene Practices (GHPs), and Hazard Analysis and Critical Point System (HACCP) standards without chemicals or antibiotics (data not shown). The mycoprotein has high nutritional values like that from eggs which contains 39.65–42.29% total protein dry weight, no cholesterol (data not shown), and all essential amino acids as shown in Table 1, including fiber, vitamins, and beta-glucan (data not shown). However, the toxicological testing for this mycoprotein has never been carried out, thus the safety evaluation had to be conducted in animals to provide toxicity data before human studies. In addition, the results of safety studies can be used as supporting data for commercial production and registration with Thailand’s Food and Drug Administration (Thai FDA) and to confirm product safety for consumers.

The purpose of this study was to identify the chemical hazard classification of the mycoprotein produced according to the GHS (Globally Harmonised System for Classification and Labeling of Chemicals) category, which complied with the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD)

Guidelines for the Testing of Chemicals 423. Moreover, studies of acute oral toxicity using the acute toxic class method⁽⁹⁾ and sub-chronic oral toxicity were performed to confirm the edible safety and evaluate the No-Observed-Adverse-Effect Level (NOAEL) for long-term use of mycoprotein following the methodology of sub-chronic oral toxicity modified from the OECD Guidelines for Testing of Chemicals 408, Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents⁽¹⁰⁾.

Materials and Methods

Specification of test item

The test item was mycoprotein, the finished product from *Aspergillus oryzae* BCC7051 as a brownish-yellow powder, obtained from the BIOTEC Bioprocessing Facility, National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Thailand. Its nutrition facts label shown as g/100 g as protein 44.69,⁽¹¹⁾ ash 6.52,⁽¹²⁾ fat 5.94,⁽¹³⁾ total dietary fiber 33.18,⁽¹⁴⁾ sodium 52.55,⁽¹⁵⁾

carbohydrate 37.55,⁽¹⁶⁾ calories from fat 53.46,⁽¹⁶⁾ and 382.42 Kcal/100g⁽¹⁶⁾. For microbiological analysis, its estimated aerobic plate counts (EAPC) were fewer than 2.5×10^2 cfu/g for total plate count,⁽¹⁷⁾ and fewer than 10 cfu/g for *Escherichia coli*⁽¹⁸⁾ and coliforms,⁽¹⁸⁾ while *Salmonella* spp. (per 25 g),⁽¹⁹⁾ heavy metals (mg/kg) as arsenic,⁽²⁰⁾ cadmium,⁽²¹⁾ and mercury,⁽²²⁾ and mycotoxin (µg/kg) such as aflatoxin,^(23,24) ochratoxin A,⁽²⁵⁾ etc., were not detected. In addition, amino acid contents were measured as shown in Table 1. The stability was one year after the manufacturing date, and it was kept in an aluminum foil vacuum bag at room temperature ($22 \pm 3^\circ\text{C}$). The level of microbial contamination based on aerobic plate count (APC) was less than 10 cfu/g, which was monitored by the Laboratory of the Quality Control Office, National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Thailand, before administering the test item orally to Wistar rats. For the production process of mycoprotein, it is unrevealed due to a commercial secret.

Table 1 Amino acid contents of the mycoprotein from *A. oryzae* strain BCC7051

Amino acid	Content (mg/100g)
Histidine	0.28
Isoleucine	0.46
Leucine	0.78
Lysine	0.71
Methionine	0.16
Threonine	0.53
Valine	0.56
Alanine	0.62
Arginine	0.67
Aspartic acid	1.08
Cysteine	0.11
Glutamic acid	1.70
Glycine	0.50
Ornithine	0.06

Table 1 Amino acid contents of the mycoprotein from *A. oryzae* strain BCC7051 (continued)

Amino acid	Content (mg/100g)
Proline	0.41
Serine	0.54
Taurine	0.05
Tyrosine	0.40

Test animals

Both male and female Wistar rats (*Rattus norvegicus*, strain Mlac:WR) were obtained from the Office of Laboratory Animal Production, National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Thailand. For acute oral toxicity, only female Wistar rats with body weight 186–196 grams, 7 weeks of age were used, while sub-chronic oral toxicity, both sexes were used, 5 weeks of age, 153–178 grams for males, and 146–163 grams body weight for females.

Animal husbandry conditions

There were one and two Wistar rats per stainless steel cage for acute oral toxicity and sub-chronic toxicity, respectively, with animal feed (082, Perfect Companions, Thailand) and 5–7 ppm chlorinated water ad libitum, including maintaining the standard condition of a 12:12 light/dark cycle at $22\pm3^{\circ}\text{C}$ and 30–70% RH, respectively. The acclimatization was at least 5 days before the study. The guidelines were followed throughout the study, using the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.⁽²⁶⁾

Acute oral toxicity testing

Twelve Wistar rats at the age of 8 weeks were divided into three female rats per group per each mycoprotein dose and fasted overnight (15–18 hours) with water ad libitum before dose administration. Following the fasting,

mycoprotein was prepared by weighing and mixing with sterile water in a single dose of 300 and 2,000 mg/kg body weight (BW) orally administered to the rats using a gavage needle. After 3–4 hours of administration, the rats were fed with normal feed.

Observation: the rats were observed individually after administration for 30 minutes, and special attention was given during the first 4 hours and periodically during the first 24 hours. The feed and water consumption were measured and recorded daily after each dose administration until necropsy day. Body weights were measured and recorded on days 1, 7, and 14 after dose administration.

Necropsy examination: at the end of acute oral toxicity testing (day 14), surviving rats were euthanized using CO₂ inhalation,⁽²⁷⁾ and the evaluation for positions, shapes, sizes, and colors of internal organs was performed.

Sub-chronic oral toxicity testing

104 Wistar rats consisting of 52 males and 52 females at 6 weeks were weighed and distributed into five groups (20 animals of 10 per sex in each group). The control group was administered with sterile water while the test (Main) groups were administered with mycoprotein as 500, 1,000, and 2,000 mg/kg BW, respectively, and the Recovery group (12 animals of 10 per sex), were identified as

Groups 1, 2, 3, 4, and 5, respectively. Mycoprotein was weighed and calculated to the body weight of animals on the day of dosing at a constant volume of 1 mL per 500 g BW. All animals were administered the test items once daily for 90 days via oral route, while the Recovery group had a recovery period of 14 days without dosing after 90 days of administration.

Observation: Observation of sub-chronic oral toxicity was recorded weekly, and the Recovery group was continuously observed in the recovery period of 14 days after 90 days of dose administration. Cage side observation included evaluation of skin, fur or coat, eyes, and mucous membrane (occurrence of secretions and excretions), autonomic nervous activity (lacrimation, piloerection, pupil size, and respiratory pattern), changes in gait, posture, and response to handling, the presence of clonic and tonic movements, and stereotype or bizarre behavior such as excessive grooming, repetitive cycling, self-mutilation, and walking backwards. Ophthalmological examination was performed once during the acclimatization period and within a week before the scheduled necropsy in the eyes of animals in the high-dose and control groups. In addition, sub-chronic oral toxicity was assessed neurologically once a week, starting in week 11, including sensory reactivity (auditory, visual, proprioception, fore- and hind-limb grip strength tests, and motor activity assessments).

Necropsy examination: the animals were fasted overnight but with sterile water (15–18 hours) and euthanized using CO₂ inhalation⁽²⁷⁾ on the last day of each group. The positions, shapes, sizes, and colors of internal organs were evaluated, and then the cardiac punc-

ture method was used to collect blood samples. The blood samples were separated into two tubes, one containing EDTA for hematological analysis (200 µL) and the other without EDTA for clinical biochemistry analysis (800 µL). Hematology analyses were performed on whole blood using an automated analyzer (Procyte Dx™, IDEXX Laboratories, Westbrook, Maine, USA) to evaluate the following parameters: red blood cell count (RBC), hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), platelet (PLT), white blood cell count (WBC), neutrophil (NEUT), lymphocyte (LYMPH), monocyte (MONO), eosinophil (EO), and basophil (BASO). The clinical biochemistry analyses were conducted for the determination of sodium (Na), potassium (K), chloride (Cl), glucose (GLC), cholesterol (CHOL), triglyceride (TG), uric acid (UA), blood urea nitrogen (BUN), creatinine (CR), total protein (TP), albumin (ALB), globulin (GLO), high-density lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein (LDL), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and alkaline phosphatase (ALP) using an automated blood analyzer (Cobas® c311, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). The organs, such as the liver, kidneys, lung, adrenals, heart, spleen, brain, thymus, testes, and epididymis for males, and the uterus and ovaries for females, were cut and weighed to determine the relative organ's weight per 100 g of body weight. Histopathological examinations used the paraffin section technique for cutting, embedding, and sectioning the organs. Then the scoring of the

organs of the control and high-dose groups were conducted comparatively.

Statistical analysis

All the quantitative results were expressed as mean $\pm$ standard deviation. The data with normality and homogeneity of variances were analyzed using the Kolmogorov-Smirnov test and Levene's test.⁽²⁸⁾ ANOVA and the Mann-Whitney U test were used to compare the data between the control group and each treatment group. In addition, significant difference analyses were performed with SPSS[®] Statistical software version 18.0.0 ($p \leq 0.05$).

Ethical approval

The study was approved by the National Laboratory Animal Center Animal Care and Use Committee (NLAC-ACUC), Mahidol University, Thailand (No. RA2021-34 on September 10, 2021, for acute oral toxicity testing and RA2022-31 on October 19, 2022, for sub-chronic oral toxicity testing).

Results

Acute oral toxicity testing

From the acute oral toxicity testing, body weights and body weight changes of the groups of control, 300 and 2,000 mg/kg BW mycoprotein were shown in Table 2. Health observation results, including feed, and drinking-water consumptions of all animals were normal except one animal at the dose of 300 mg/kg BW that was observed to have hydronephrosis.

Sub-chronic oral toxicity testing

The sub-chronic toxicity studies were carried out on the test item. General clinical

observation, health examination, and ophthalmological examination results of all the rats were not found abnormal. In addition, the neurological examination results of the animals did not show any neurological signs for both sexes. The motor activity assessment scores of only male rats in the 1,000 mg/kg BW mycoprotein group (weeks 12 and 13) were significantly higher than those of the control group ($p \leq 0.05$). The fore-limb grip strength in males of the 500 (week 11) and females of the 2,000 mg/kg BW mycoprotein groups (week 12) were significantly higher and lower than the control group ($p \leq 0.05$), respectively. The hind-limb grip strength of the Recovery group for both sexes (males in week 14 and females in week 15) was significantly lower than the control ($p \leq 0.05$). The body weights of the rats continued to be gained throughout the study, as shown in Figure 1, with no differences when compared with the control groups for both sexes in the Main and Recovery groups.

Figure 2 shows the feed consumption of both sexes in the Main and Recovery groups. In the Main group at 500 (weeks 3, 4, and 5), 1,000 (weeks 2 and 5), and 2,000 mg/kg BW mycoprotein (weeks 2 to 8) of male rats, the significant difference was lower than the control ($p \leq 0.05$), but in the Recovery group (weeks 5, 6, 8, 10, and 12 to 15), it was higher than the control ($p \leq 0.05$). Female animals in the Main group at 500 (week 4), 1,000 (weeks 3 and 4), 2,000 mg/kg BW mycoprotein (week 4), and the Recovery group (weeks 4, 5, 9, 10, and 13 to 15) had significant differences higher than control ($p \leq 0.05$).

The water consumption of both sexes of the animals in the Main and Recovery groups was significantly higher than the control

($p \leq 0.05$). In the Main group, 500 (weeks 2, 4 to 12 for males and week 8, 10 for females), 1,000 (weeks 4 to 13 for males and week 5 for females), 2,000 mg/kg BW mycoprotein (weeks 4 to 13 for males and week 2, 3, 6 to 12 for females), and the Recovery group (weeks 1 to 15 for males and weeks 1, 3 to 15 for females) as shown in Figure 3.

The relative organ weights are summarized in Table 3. The left adrenal glands of male rats in the 500 and 1,000 mg/kg BW mycoprotein groups showed significant differences higher than the control group ($p \leq 0.05$). In female animals, the left and right thyroid and parathyroid glands in the 2,000 mg/kg BW mycoprotein group, including the heart in the 1,000 mg/kg BW mycoprotein group, showed significant differences higher than the control group ($p \leq 0.05$).

Hematological analysis results in Table 4 showed that the averages of HGB, HCT, MCV with 500, WBC, LYMPH with 1,000, and HGB, HCT, WBC, LYMPH with 2,000 mg/kg BW mycoprotein of male animals had significant differences higher than the control group, while the average numbers of NEUT of 1,000, MCHC, NEUT, EO of 2,000 mg/kg BW mycoprotein, and MCHC of the Recovery group had significant differences lower than the control group ($p \leq 0.05$). In female animals, only the average WBC in the Main group of 2,000 mg/kg BW mycoprotein and the Recovery group showed significant differences higher than the control ($p \leq 0.05$). Only WBC, NEUT, and LYMPH of male animals were directly variable to the dose levels of mycoprotein.

In the clinical biochemistry analysis (Table 5), the averages of GLU in the 1,000

and 2,000 mg/kg BW mycoprotein groups and Na in the Recovery group of male animals were significantly higher than in the control group ($p \leq 0.05$). In contrast, the averages of Cl (1,000 and 2,000 mg/kg BW mycoprotein), CREA, and Na (2,000 mg/kg BW mycoprotein) were significantly lower than the control group ($p \leq 0.05$). The averages of TP and ALB in the 1,000 mg/kg BW mycoprotein group were significantly higher than the control group ($p \leq 0.05$) in female animals. Additionally, the averages of ALT (1,000 and 2,000 mg/kg BW mycoprotein), AST, and Cl (2,000 mg/kg BW mycoprotein) were significantly lower than the control group ($p \leq 0.05$). Only GLU and Cl of male animals and ALT of female animals were proportional to the dose levels of mycoprotein.

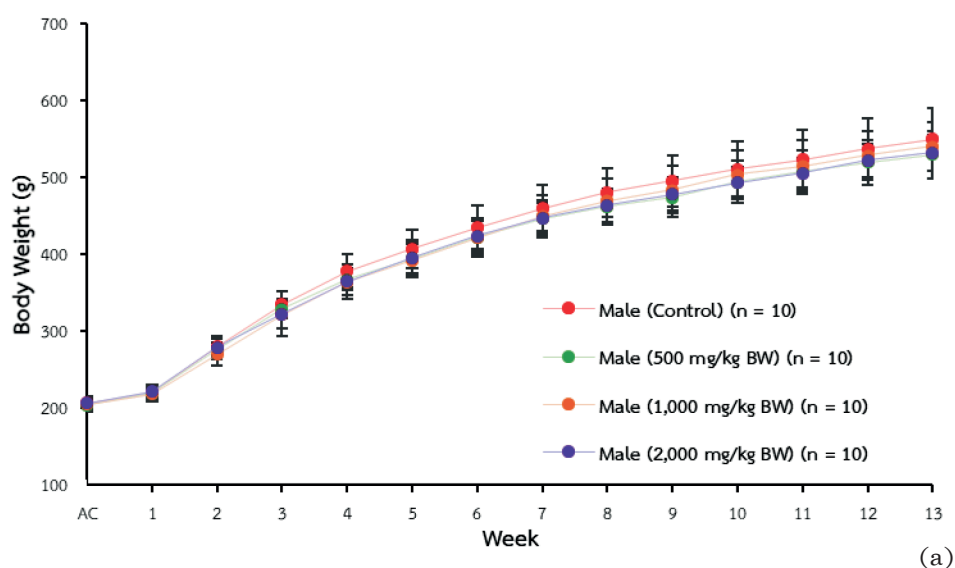
For macroscopic findings, multifocal thymic hemorrhage was found in all study groups, and clear fluid retention in the uterus was found in all female rats. Microscopic findings were observed in the kidney as a tubular hyaline cast of the control, 2,000 mg/kg BW mycoprotein, and the Recovery groups of male animals, and focal tubular mineralization in the females of the 2,000 mg/kg BW mycoprotein group. Focal micro-vesicular fatty degeneration in the liver and focal mononuclear cell infiltration in the heart were shown in males of the Recovery and 2,000 mg/kg BW mycoprotein groups, respectively. Ultimobranchial cyst (females in the 2,000 mg/kg BW mycoprotein group), congenital thyroid cyst (males in the Recovery group), and ectopic thymic tissue (females in the Recovery group) of thyroid and parathyroid glands were found. In addition, it was found that multifocal thymic hemorrhage in all study groups of both sexes was consistent with the macroscopic lesions mentioned above. Uterine

luminal dilation (proestrus) of all groups and small uterine lumen (diestrus) of the 500, 1,000 mg/kg BW mycoprotein, and Recovery groups were observed only in female rats.

Based on the results, it was concluded that mycoprotein was classified in GHS category 5 or unclassified, the LD₅₀ cut-off at 5,000 mg/kg BW or above, and the NOAEL of mycoprotein was considered to be 2,000 mg/kg BW per day.

Table 2 Body weight (g) of Wistar rats in acute oral toxicity testing after administrations of 300 and 2,000 mg/kg BW mycoprotein.

Mycoprotein (mg/kg BW)	Animal no.	Body weight (g)						BW change (%)
		Quarantine	Acclimatization	Day 0	Day 7	Day 14	Terminated	
300	1	196	206	210	234	257	251.35	22.38
	2	194	203	202	228	242	238.77	19.80
	3	192	198	201	223	234	231.43	16.42
	4	191	200	205	232	263	253.69	28.29
	5	190	198	210	234	249	248.64	18.57
	6	190	202	205	230	245	246.17	19.51
2,000	7	189	195	207	229	248	244.25	19.81
	8	189	202	212	236	250	246.60	17.92
	9	189	201	215	245	259	253.88	20.47
	10	187	189	203	234	245	239.64	20.69
	11	187	190	198	231	242	234.24	22.22
	12	186	203	214	244	260	251.78	21.50



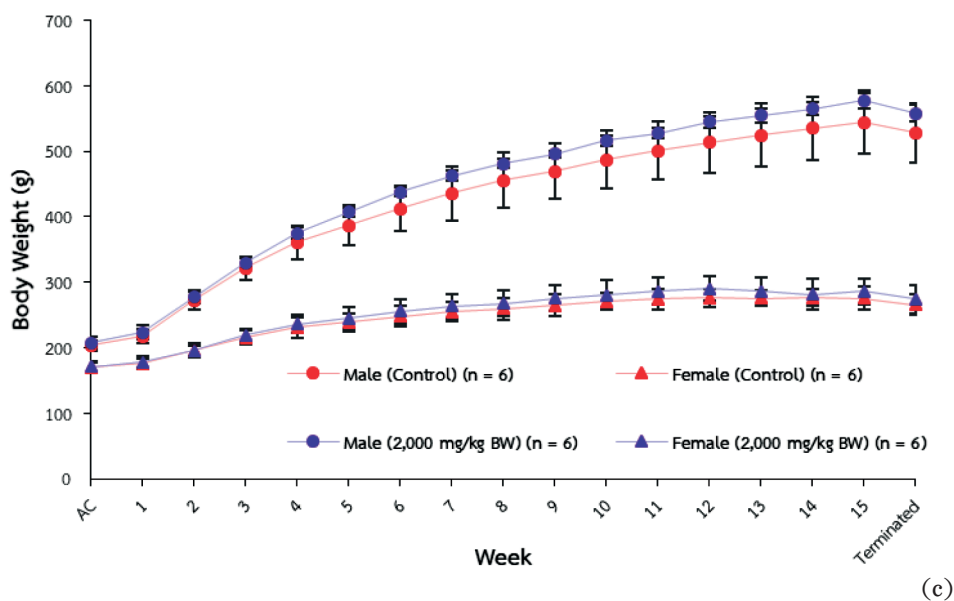
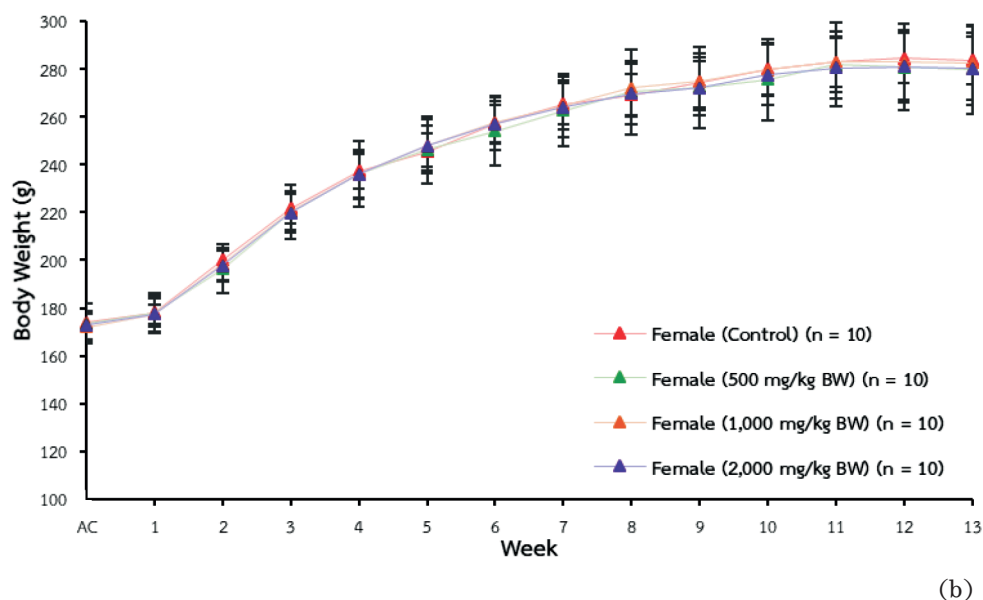


Figure 1 Body weight (g) of male and female Wistar rats administered with mycoprotein for 90 days. (a) Control and treated male rats with 500, 1,000, and 2,000 mg/kg BW mycoprotein, (b) Control and treated female rats with 500, 1,000, and 2,000 mg/kg BW mycoprotein, and (c) the Recovery group of male and female rats. AC = acclimatization.

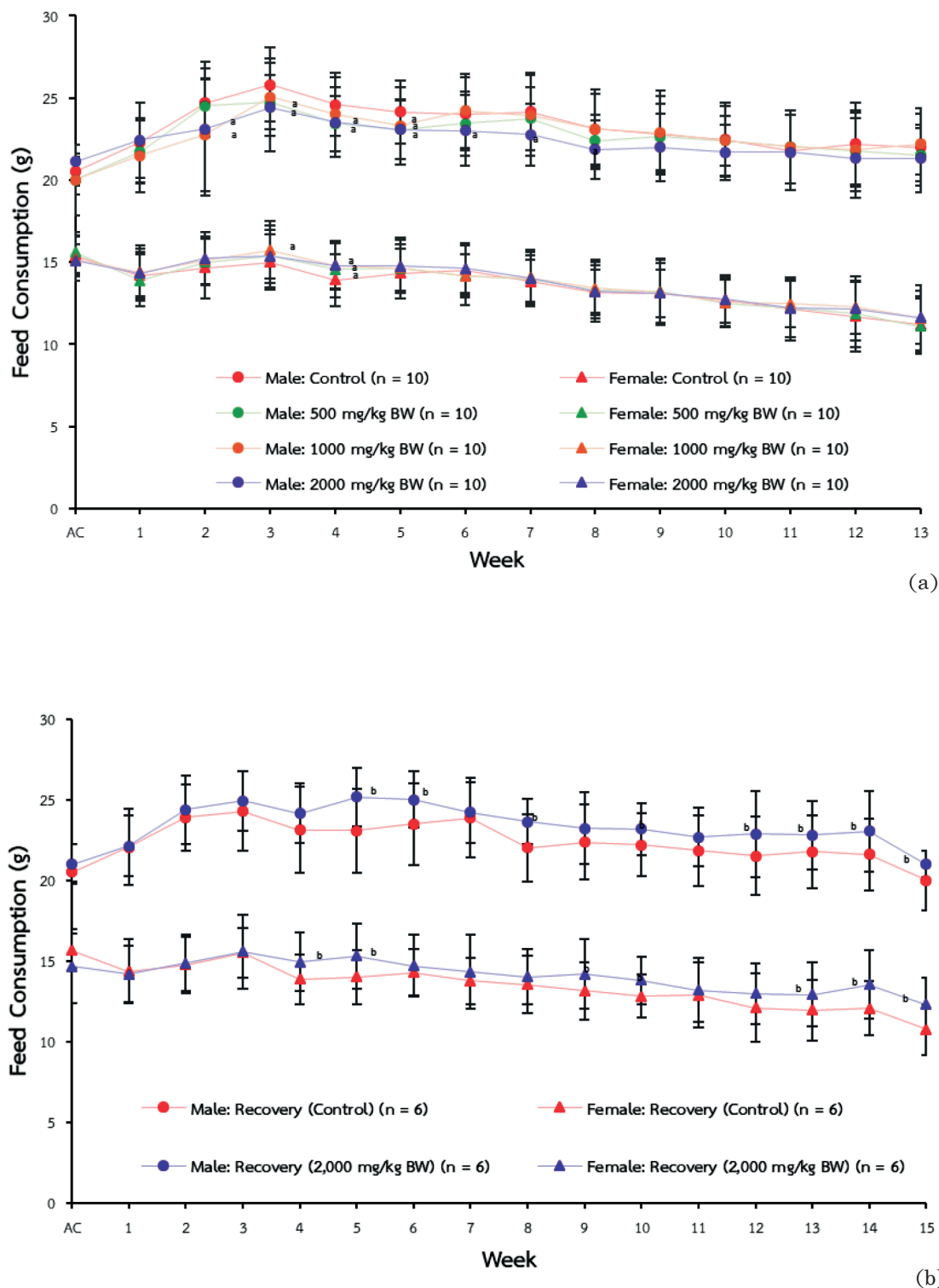


Figure 2 Feed consumptions (g) in male and female Wistar rats administered with mycoprotein for 90 days. (a) Control and treated male and female rats with 500, 1,000, and 2,000 mg/kg BW mycoprotein, and the average is significantly different from the control group ($p \leq 0.05$). (b) The Recovery group of male and female rats, and the average is significantly different from the Control-Recovery group ($p \leq 0.05$). AC = acclimatization.

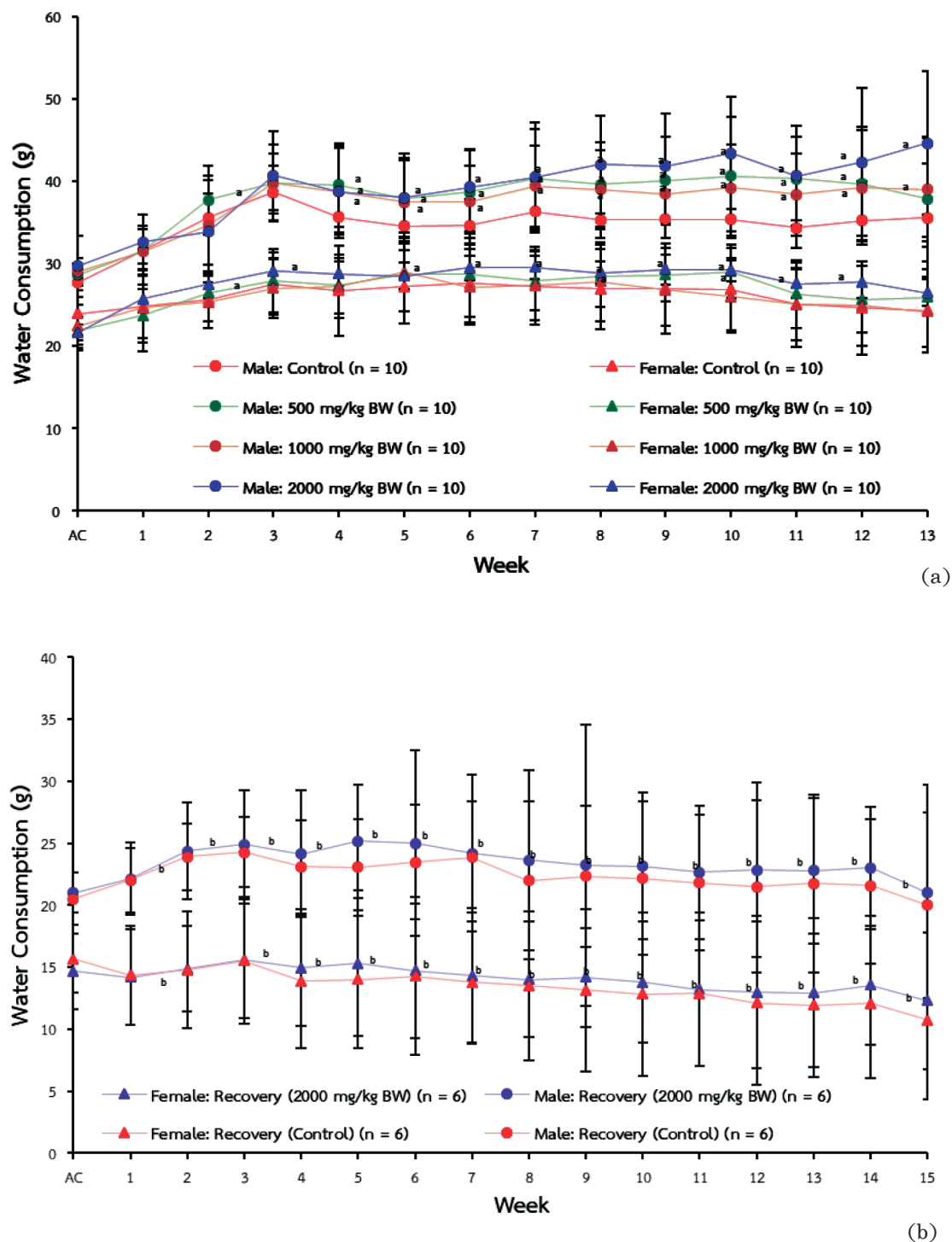


Figure 3 Water consumption (g) in male and female Wistar rats treated with mycoprotein for 90 days. (a) Control and treated male and female rats with 500, 1,000, and 2,000 mg/kg BW mycoprotein, and the average is significantly different from the control group ($p \leq 0.05$). (b) The Recovery group of male and female rats, and the average is significantly different from the Control-Recovery group ($p \leq 0.05$). AC = acclimatization.

Table 3 Relative organ weights in Wistar rats treated with 500, 1,000, and 2,000 mg/kg BW mycoprotein for 90 days.

Organ	Main Group (organ weight in grams after administration with mycoprotein)					
	Control		Sterile water (n = 20)		500 mg/kg BW (n = 20)	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Liver	2.6653±0.14	2.5589±0.26	2.6165±0.14	2.5207±0.16	2.7516±0.14	2.6909±0.15
Right Kidney	0.2601±0.02	0.2865±0.01	0.2584±0.01	0.2879±0.01	0.2473±0.02	0.2922±0.01
Left Kidney	0.2465±0.01	0.2728±0.01	0.2364±0.06	0.2754±0.01	0.2491±0.02	0.2851±0.01
Heart	0.3053±0.01	0.3463±0.01	0.3067±0.02	0.3519±0.02	0.3004±0.01	0.3690±0.02 ^a
Spleen	0.1798±0.02	0.2421±0.03	0.1877±0.02	0.2490±0.02	0.1788±0.02	0.2512±0.03
Pituitary	0.0022±0.00	0.0047±0.00	0.0022±0.00	0.0047±0.00	0.0024±0.00	0.0049±0.00
Brain	0.4110±0.03	0.7491±0.04	0.4310±0.03	0.7664±0.05	0.4191±0.03	0.7457±0.05
Right Thyroid, Para	0.0023±0.00	0.0031±0.00	0.0027±0.00	0.0047±0.00 ^a	0.0025±0.00	0.0038±0.00
Left Thyroid, Para	0.0022±0.00	0.0032±0.00	0.0027±0.00	0.0041±0.00 ^a	0.0025±0.00	0.0036±0.00
Right Adrenal	0.0073±0.00	0.0167±0.00	0.0082±0.00	0.0168±0.00	0.0078±0.00	0.0176±0.00
Left Adrenal	0.0080±0.00	0.0177±0.00	0.0093±0.00 ^a	0.0189±0.00	0.0093±0.00 ^a	0.0196±0.00
Right Testis / Right Ovary, oviduct	0.3722±0.03	0.0266±0.00	0.3821±0.02	0.0278±0.00	0.3779±0.03	0.0267±0.00
Left Testis / Left Ovary, oviduct	0.3773±0.03	0.0261±0.00	0.3892±0.02	0.0279±0.00	0.3844±0.03	0.0261±0.00
Right Epididymis	0.1170±0.01	-	0.1199±0.01	-	0.1171±0.01	-
Left Epididymis	0.1201±0.01	-	0.1200±0.01	-	0.1184±0.01	-
Prostate / Uterus	0.0852±0.02	0.1923±0.05	0.0886±0.01	0.1876±0.05	0.0859±0.01	0.2230±0.08
Thymus	0.0578±0.01	0.0871±0.02	0.0532±0.01	0.0908±0.02	0.0616±0.01	0.0955±0.01

Note: Main group: mycoprotein was administered once daily for 90 days via oral route, values are average ± standard deviation. ^a The average is significantly different from the control group ($p \leq 0.05$).

Table 3 Relative organ weights in Wistar rats treated with 500, 1,000, and 2,000 mg/kg BW mycoprotein for 90 days. (continued)

Organ	Recovery Group (organ weight in grams after administration with mycoprotein)			
	Control		2,000 mg/kg BW (n = 12)	
	Sterile water (n = 12)			
	Male	Female	Male	Female
Liver	2.4485±0.10	2.4920±0.15	2.5003±0.16	2.6407±0.17
Right Kidney	0.2445±0.02	0.3019±0.01	0.2499±0.02	0.2963±0.01
Left Kidney	0.2326±0.02	0.2798±0.02	0.2468±0.02	0.2802±0.02
Heart	0.3075±0.03	0.3626±0.01	0.2977±0.01	0.3640±0.02
Spleen	0.1777±0.02	0.2421±0.03	0.1723±0.01	0.2404±0.03
Pituitary	0.0021±0.00	0.0052±0.00	0.0021±0.00	0.0051±0.00
Brain	0.4233±0.04	0.7686±0.05	0.4049±0.01	0.7508±0.05
Right Thyroid, Para	0.0021±0.00	0.0037±0.00	0.0022±0.00	0.0031±0.00
Left Thyroid, Para	0.0020±0.00	0.0035±0.00	0.0022±0.00	0.0033±0.00
Right Adrenal	0.0078±0.00	0.0180±0.00	0.0062±0.00	0.0173±0.00
Left Adrenal	0.0085±0.00	0.0201±0.00	0.0083±0.00	0.0187±0.00
Right Testis/Right Ovary, oviduct	0.3728±0.05	0.0250±0.00	0.3746±0.03	0.0268±0.00
Left Testis/Left Ovary, oviduct	0.3851±0.06	0.0259 ±0.00	0.3792±0.03	0.0260±0.00
Right Epididymis	0.1213±0.01	–	0.1166±0.01	–
Left Epididymis	0.1239±0.02	–	0.1188±0.01	–
Prostate / Uterus	0.0851±0.01	0.2134±0.04	0.0858±0.02	0.1975±0.04
Thymus	0.0510±0.01	0.0828±0.01	0.0590±0.01	0.0772±0.01

Note: Recovery group: mycoprotein was administered once daily for 90 days via oral route, and recovery was in 14 days without dosing.

Table 4 Hematological analysis results in Wistar rats treated with 500, 1,000, and 2,000 mg/kg BW mycoprotein for 90 days.

Parameter	Main Group (after administration with mycoprotein)							
	Control							
	Sterile water (n = 20)		500 mg/kg BW (n = 20)		1,000 mg/kg BW (n = 20)		2,000 mg/kg BW (n = 20)	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
RBC (M/ μ L)	9.74 $\pm$ 0.43	9.85 $\pm$ 0.38	9.98 $\pm$ 0.23	9.74 $\pm$ 0.30	10.05 $\pm$ 0.42	9.77 $\pm$ 0.49	10.10 $\pm$ 0.35	9.72 $\pm$ 0.55
HGB (g/dL)	16.92 $\pm$ 0.65	17.90 $\pm$ 0.55	17.68 $\pm$ 0.42 ^a	18.07 $\pm$ 0.43	17.44 $\pm$ 0.29	17.91 $\pm$ 1.11	17.48 $\pm$ 0.41 ^a	17.93 $\pm$ 0.96
HCT (%)	52.69 $\pm$ 2.32	55.65 $\pm$ 1.84	55.30 $\pm$ 1.38 ^a	56.24 $\pm$ 1.57	54.58 $\pm$ 1.30	55.88 $\pm$ 3.72	55.16 $\pm$ 1.35 ^a	55.91 $\pm$ 3.10
MCV (fL)	54.07 $\pm$ 0.84	56.52 $\pm$ 1.15	55.41 $\pm$ 1.07 ^a	57.74 $\pm$ 1.17	54.34 $\pm$ 1.49	57.19 $\pm$ 1.43	54.63 $\pm$ 1.40	57.56 $\pm$ 1.24
MCH (pg)	17.38 $\pm$ 0.25	18.19 $\pm$ 0.43	17.72 $\pm$ 0.42	18.56 $\pm$ 0.36	17.36 $\pm$ 0.55	18.35 $\pm$ 0.37	17.31 $\pm$ 0.52	18.45 $\pm$ 0.41
MCHC (g/dL)	32.12 $\pm$ 0.34	32.17 $\pm$ 0.29	31.97 $\pm$ 0.28	32.13 $\pm$ 0.31	31.96 $\pm$ 0.35	32.07 $\pm$ 0.32	31.69 $\pm$ 0.26 ^a	32.07 $\pm$ 0.14
PLT (K/ μ L)	689.20 $\pm$ 38.70	746.70 $\pm$ 45.32	724.60 $\pm$ 59.72	728.10 $\pm$ 62.52	680.13 $\pm$ 66.18	715.60 $\pm$ 58.55	684.78 $\pm$ 57.83	737.90 $\pm$ 76.25
WBC (K/ μ L)	6.15 $\pm$ 0.59	4.56 $\pm$ 0.71	6.64 $\pm$ 1.04	4.61 $\pm$ 0.76	7.47 $\pm$ 1.17 ^a	5.35 $\pm$ 1.23	7.83 $\pm$ 1.48 ^a	5.79 $\pm$ 0.86 ^a
NEUT (%)	12.90 $\pm$ 1.56	9.20 $\pm$ 2.19	12.86 $\pm$ 1.31	8.95 $\pm$ 2.02	10.94 $\pm$ 1.44 ^a	8.57 $\pm$ 1.63	10.66 $\pm$ 0.90 ^a	7.51 $\pm$ 1.35
LYMPH (%)	81.68 $\pm$ 1.89	85.76 $\pm$ 1.89	81.81 $\pm$ 1.18	85.64 $\pm$ 2.41	84.19 $\pm$ 1.66 ^a	85.58 $\pm$ 1.97	84.97 $\pm$ 2.46 ^a	86.72 $\pm$ 2.12
MONO (%)	3.97 $\pm$ 0.70	4.19 $\pm$ 0.90	4.00 $\pm$ 1.41	4.28 $\pm$ 0.71	3.66 $\pm$ 0.86	5.19 $\pm$ 1.61	3.53 $\pm$ 1.70	5.11 $\pm$ 1.66
EO (%)	1.24 $\pm$ 0.39	0.62 $\pm$ 0.29	0.96 $\pm$ 0.20	0.88 $\pm$ 0.46	0.99 $\pm$ 0.20	0.42 $\pm$ 0.13	0.64 $\pm$ 0.25 ^a	0.38 $\pm$ 0.19
BASO (%)	0.21 $\pm$ 0.14	0.23 $\pm$ 0.13	0.37 $\pm$ 0.20	0.25 $\pm$ 0.21	0.23 $\pm$ 0.19	0.24 $\pm$ 0.12	0.20 $\pm$ 0.18	0.28 $\pm$ 0.12

Note: Main group: mycoprotein was administered once daily for 90 days via oral route. Values are average $\pm$ standard deviation. ^a The average is significantly different from the control group ($p \leq 0.05$).

Table 4 Hematological analysis results in Wistar rats treated with 500, 1,000, and 2,000 mg/kg BW mycoprotein for 90 days. (Continued)

Parameter	Recovery Group (after administration with mycoprotein)			
	Control		2,000 mg/kg BW (n = 12)	
	Sterile water (n = 12)			
	Male	Female	Male	Female
RBC (M/ μ L)	10.38 $\pm$ 0.58	9.70 $\pm$ 0.28	10.37 $\pm$ 0.24	9.55 $\pm$ 0.56
HGB (g/dL)	18.18 $\pm$ 0.81	18.03 $\pm$ 0.44	17.74 $\pm$ 0.37	17.93 $\pm$ 0.95
HCT (%)	56.85 $\pm$ 2.94	56.22 $\pm$ 1.16	56.52 $\pm$ 1.54	56.30 $\pm$ 3.03
MCV (fL)	54.78 $\pm$ 1.38	58.00 $\pm$ 0.73	54.48 $\pm$ 0.99	59.00 $\pm$ 1.88
MCH (pg)	17.53 $\pm$ 0.51	18.60 $\pm$ 0.18	17.14 $\pm$ 0.36	18.80 $\pm$ 0.64
MCHC (g/dL)	32.00 $\pm$ 0.35	32.07 $\pm$ 0.30	31.38 $\pm$ 0.38 ^b	31.85 $\pm$ 0.24
PLT (K/ μ L)	688.00 $\pm$ 48.82	760.83 $\pm$ 61.77	718.00 $\pm$ 63.45	723.33 $\pm$ 52.00
WBC (K/ μ L)	7.07 $\pm$ 2.14	4.64 $\pm$ 0.84	7.19 $\pm$ 0.96	5.85 $\pm$ 0.97 ^b
NEUT (%)	16.08 $\pm$ 10.65	12.33 $\pm$ 4.62	11.48 $\pm$ 2.78	9.13 $\pm$ 1.75
LYMPH (%)	78.45 $\pm$ 10.41	82.23 $\pm$ 4.68	82.58 $\pm$ 3.53	85.18 $\pm$ 1.64
MONO (%)	4.27 $\pm$ 0.72	4.53 $\pm$ 0.81	4.68 $\pm$ 1.21	4.88 $\pm$ 0.77
EO (%)	0.85 $\pm$ 0.28	0.62 $\pm$ 0.17	1.00 $\pm$ 0.42	0.55 $\pm$ 0.24
BASO (%)	0.35 $\pm$ 0.24	0.28 $\pm$ 0.16	0.26 $\pm$ 0.18	0.25 $\pm$ 0.16

Note: Recovery group: mycoprotein was administered once daily for 90 days via oral route, and recovery was in 14 days without dosing. Values are average $\pm$ standard deviation. ^bThe average is significantly different from the control recovery group ($p \leq 0.05$).

Main Group (after administration with mycoprotein)

Note: Main group: mycoprotein was administered once daily for 90 days via oral route. Values are average $\pm$ standard deviation. ^a The average is significantly different from the control group ($p \leq 0.05$).

Table 5 Clinical biochemistry analysis results in Wistar rats treated with 500, 1,000, and 2,000 mg/kg BW mycoprotein for 90 days. (continued)

Parameter	Recovery Group (after administration with mycoprotein)			
	Control			
	Sterile water (n = 12)		2,000 mg/kg BW (n = 12)	
	Male	Female	Male	Female
GLU (mg/dL)	332.80±59.93	220.25±31.06	348.48±28.00	206.80±70.80
BUN (mg/dL)	17.33±1.46	15.70±1.37	17.86±2.36	16.52±1.58
CREA (mg/dL)	0.37±0.03	0.40±0.02	0.38±0.03	0.43±0.02
UA (mg/dL)	6.12±1.36	4.00±0.58	6.66±0.54	3.92±0.42
CHOL (mg/dL)	82.20±9.19	93.08±12.98	75.14±8.71	99.03±11.29
TRIGL (mg/dL)	97.15±27.84	61.07±10.67	85.54±11.18	50.83±8.03
LDL (mg/dL)	10.83±3.61	7.90±2.14	8.76±1.76	10.03±2.74
AST (U/L)	92.38±17.40	79.32±16.64	113.90±46.84	80.05±6.39
ALT (U/L)	61.45±11.44	40.43±7.72	84.38±65.67	36.65±5.02
ALP (U/L)	78.67±11.64	40.17±4.02	85.00±12.25	42.00±4.56
TP (g/dL)	6.93±0.23	7.24±0.30	7.18±0.09	7.00±0.24
ALB (g/dL)	4.86±0.09	5.38±0.23	4.93±0.06	5.13±0.15
HDL (mg/dL)	58.20±7.61	74.77±10.44	51.88±6.93	78.30±8.08
Na (mmol/L)	146.33±1.03	144.67±1.03	147.80±0.45 ^b	145.67±1.51
K (mmol/L)	9.13±0.58	9.86±0.92	9.51±0.44	10.40±0.53
Cl (mmol/L)	101.37±1.34	103.08±1.35	100.72±0.46	103.17±0.95
GLO (mg/dL)	2.07±0.17	1.86±0.15	2.25±0.08	1.87±0.18

Note: Recovery group: mycoprotein was administered once daily for 90 days via oral route, and recovery was in 14 days without dosing. Values are average ± standard deviation. ^bThe average is significantly different from the control recovery group ($p \leq 0.05$).

Discussion

The toxicity study of mycoprotein in Wistar rats started with acute oral toxicity with a single dose of mycoprotein as the test substance at 300 and 2,000 mg/kg BW. All animals did not show signs of toxic effects, moribundity, or mortality except one rat at a dose of 300 mg/kg BW that was observed to have hydronephrosis. This lesion was found in a Wistar rat because it was associated with naturally occurring

background lesions,⁽²⁹⁾ indicating that this study did not find abnormal gross findings related to the test item. Thus, this result suggested that mycoprotein was classified in GHS category 5 or unclassified, with the LD₅₀ cut-off at 5,000 mg/kg BW or over.

Then, sub-chronic oral toxicity was performed by oral administration of mycoprotein at doses of 500, 1,000, and 2,000 mg/kg BW for a total of 90 days. The clinical signs of toxicity

were not observed and did not cause animal mortalities up to the dose of 2,000 mg/kg BW for this test item. All animals had changes in the eye, compared between before and after dosing for ophthalmological examination. In addition, there was little alopecia and scaling skin in health examinations but they were unrelated to the test items. There was a significant difference in the results of the animal motor activity assessment and fore-limb grip strength test. The results were normal transient changes and not related to doses of the test items. The animals continued to gain weight throughout the study, and there were significant differences in feed and water consumption that were not related to the test item because the consumption was a normal transient change. Only WBC, NEUT, and LYMPH of male rats in hematological analysis results, and GLU and Cl of the male and ALT of female rats in clinical biochemistry analysis results were related to the doses of mycoprotein tested. However, it was still in the range of historical control data, which was based on (Mlac:WR),⁽³⁰⁾ RccHanTM:WIST, and Crl:WI(Han).⁽³¹⁾ The lesions were observed in the study that commonly occurred as background lesions for the kidney⁽²⁹⁾ and heart,⁽³²⁾ and physiological changes⁽³³⁻³⁵⁾ during the estrus cycle for the uterus, attributed to euthanasia or necropsy technique, and considered a dissection-induced artifact⁽³⁶⁾ for the thymus, congenital anomaly⁽³⁷⁾ for the thyroid gland, which showed no relation with other groups⁽³⁸⁾ for the liver. Some studies of sub-chronic oral toxicity of different protein products such as the pea (*Pisum sativum*) protein isolate performed with dietary levels of 25,000, 50,000, and 100,000 ppm in Wistar rats,⁽³⁹⁾ lyophilized apoaeguorin

protein (isolated from jellyfish) conducted with doses of 1,000, 2,000, and 4,000 mg/kg BW in Sprague Dawley rats,⁽⁴⁰⁾ and a protein derived from *Xanthobacter* sp. SoF1⁽⁴¹⁾ at doses of 375, 750, and 1,500 mg/kg BW with an additional group at 1,290 mg/kg BW as a positive control in Wistar rats.⁽⁴¹⁾ For those results of the studies mentioned, neither mortalities nor induced toxicological changes were found. Moreover, in this study, no treatment-related adverse effect was observed after 90 days of consecutive administration of mycoprotein by considering the results of body-weight change, feed and water consumption, hematological, clinical biochemistry, clinical pathology, or histopathological examination. The results of our study were consistent with those found in other previous studies.⁽³⁹⁻⁴¹⁾ However, chronic preclinical toxicological investigations of mycoprotein for a longer period are recommended to confirm this observation and to provide adequate safety data for future clinical trials. There should also be a study of efficiency or other related aspects to support this protein product.

Conclusion

In conclusion, the acute oral toxicity study of mycoprotein was observed hydronephrosis at a dose of 300 mg/kg BW, which was just a background lesion of animals. In addition, it showed no effect on body weight, food, or water consumption. Thus, it could be classified in GHS category 5 or unclassified with the LD₅₀ cut-off at 5,000 mg/kg BW or over. The sub-chronic oral toxicity study of mycoprotein was relatively safe. The NOAEL of mycoprotein was considered to be 2,000 mg/kg BW per day for Wistar rats under experimental conditions, which was

confirmed by the results of histopathology (hematological and biochemical assays), body-weight change, food and water consumptions, and organ weights.

Acknowledgments

We are grateful to the BIOTEC Bio-processing Facility, National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Thailand, for providing the test item, and to the National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Nakhon Pathom, Thailand, for the facilities, equipment, materials, and all of the animals used in this study.

References

1. Ritala A, Hakkinen ST, Toivari M, Wiebe MG. Single cell protein—state-of-the-art, industrial landscape and patents 2001–2016. *Front Microbiol.* [serial online]. 2017; [cited 2023 Sep 21]; 8: [18 screens]. Available from: URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02009>.
2. Derbyshire E, Ayoob K-T. Mycoprotein: nutritional health and properties. *Nutr Today* 2019; 54(1): 7–15.
3. Souza Filho PF, Nair RB, Andersson D, Lennartsson PR, Taherzadeh MJ. Vegan-mycoprotein concentrate from pea-processing industry byproduct using edible filamentous fungi. *Fungal Biol Biotechnol.* [serial online]. 2018; [cited 2023 Sep 21]; 5: [10 screens]. Available from: URL: <https://fungalbiobio-tech.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40694-018-0050-9>.
4. Hashempour-Baltork F, Khosravi-Darani K, Hosseini H, Farshi P, Reihani SSF. Mycoproteins as safe meat substitutes. *J Clean Prod.* [serial online]. 2020; [cited 2023 Sep 21]; 253: [10 screens]. Available from: URL: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.119958>.
5. Wiebe M. Myco-protein from *Fusarium venenatum*: a well-established product for human consumption. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002; 58(4): 421–7.
6. Moore D, Chiu SW. Chapter 12 – Impact of developmental, physiological and environmental studies on the commercial cultivation of mushrooms. In: Watling R, Frankland JC, Ainsworth AM, Isaac S, Robinson CH, editors. *Tropical mycology. Vol. 1, macromycetes.* Wallingford: CAB International; 2002. pp. 167–81.
7. Food biotechnology. Mycoprotein: alternative protein from fungi. [online]. [cited 2024 Dec 26]; [1 screen]. Available from: URL: <https://www.foodfocusthailand.com/eBook/208/mobile/index.html?fbclid=IwAR1loj1iccKJfHAajBtdvT77UB-3-BoaG8OB8BQJHkMrRVy4hl7c7YlJ9M#p=20>.
8. Thammarongtham C, Nookaew I, Vorapreeda T, Srisuk T, Land ML, Jeennor S, et al. Genome characterization of oleaginous *Aspergillus oryzae* BCC7051: a potential fungal-based platform for lipid production. *Curr Microbiol* 2018; 75(1): 57–70.
9. The Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Test no. 423: OECD guidelines for the testing of chemicals, acute oral toxicity – acute toxic class method. [online]. 2001; [cited 2023 May 24]; [14 screens]. Available from: URL: https://read.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-423-acute-oral-toxicity-acute-toxic-class-method_9789264071001-en.
10. The Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Test no. 408: OECD guidelines for the testing of chemicals, repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents. [online]. 2018; [cited 2023 May 24];

- [16 screens]. Available from: URL: https://read.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-408-repeated-dose-90-day-oral-toxicity-study-in-rodents_9789264070707-en.
11. AOAC official method 981.10, Crude protein in meat. Block digestion method. In: AOAC official methods. [online]. 1983; [cited 2024 Oct 22]; [2 screens]. Available from: URL: http://www.aoacofficialmethod.org/index.php?main_page=product_info&cPath=1&products_id=2870.
12. AOAC official method 920.153, Ash of meat. In: AOAC official methods. [online]. 1920; [cited 2024 Oct 22]; [1 screen]. Available from: URL: http://www.aoacofficial-method.org/index.php?main_page=product_info&cPath=1&products_id=1694.
13. AOAC official method 922.06, Fat in flour. Acid hydrolysis method. In: AOAC official methods. [online]. 1922; [cited 2024 Oct 22]; [1 screen]. Available from: URL: http://www.aoacofficial-method.org/index.php?main_page=product_info&cPath=1&products_id=1860.
14. AOAC official method 985.29, Total dietary fiber in foods. Enzymatic-gravimetric method. In: AOAC official methods. [online]. 2003; [cited 2024 Oct 22]; [2 screens]. Available from: URL: http://www.aoacofficialmethod.org/index.php?main_page=product_info&cPath=1&products_id=572.
15. AOAC official method 984.27, Calcium, copper, iron, magnesium, manganese, phosphorus, potassium, sodium, and zinc in infant formula. Inductively coupled plasma: emission spectroscopic method (ICP-OES). In: AOAC official methods. [online]. 1986; [cited 2024 Oct 22]; [2 screens]. Available from: URL: http://www.aoacofficialmethod.org/index.php?main_page=product_info&cPath=1&products_id=2126.
16. Sullivan DM, Carpenter DE, editors. Methods of analysis for nutrition labeling. Arlington, Va: AOAC International; 1993. p. 76-106.
17. Maturin L, Peeler JT. Chapter 3: aerobic plate count. In: Bacteriological analytical manual. Silver Spring, MD: U.S. Food and Drug Administration. [online]. 2001; [cited 2024 Oct 22]; [12 screens]. Available from: URL: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-3-aerobic-plate-count>.
18. AOAC official method 991.14, Coliform and escherichia coli counts in foods. Dry rehydratable film (petrifilm? *E.coli*/coliform count plate? and petrifilm? coliform count plate?) methods. In: AOAC official methods. [online]. 2002; [cited 2024 Oct 22]; [6 screens]. Available from: URL: http://www.aoacofficial-method.org/index.php?main_page=product_info&cPath=1&products_id=849.
19. ISO 6579-1:2017/Amd 1:2020, Microbiology of the food chain – horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* – Part 1: Detection of *Salmonella* spp. – Amendment 1: Broader range of incubation temperatures, amendment to the status of Annex D, and correction of the composition of MSRV and SC. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2020.
20. AOAC official method 986.15, Arsenic, cadmium, lead, selenium, and zinc in human and pet foods by inductively coupled plasma mass spectrometry technique (ICP-MS). In: AOAC official methods. [online]. [cited 2024 Oct 22]; [3 screens]. Available from: URL: https://www.aoacofficialmethod.org/index.php?main_page=product_info&products_id=203.
21. AOAC official method 999.10, Lead, cadmium, zinc, copper, and iron in foods by inductively coupled plasma mass spectrometry technique (ICP-MS). In: AOAC official methods. [online].

- 2002; [cited 2024 Oct 22]; [3 screens]. Available from: URL: <https://img.21food.cn/img/biaozhun/20100108/177/11285281.pdf>.
22. AOAC International. Mercury by inductively coupled plasma mass spectrometry technique (ICP-MS). Rockville, Maryland: AOAC International; 2023.
 23. AOAC official method 991.31, Aflatoxins (AFs; sum of aflatoxins B1, B2, G1, and G2) in corn, raw peanuts, and peanut butter. In: AOAC official methods. [online]. [cited 2024 Oct 22]; [7 screens]. Available from: URL: https://www.aocofficialmethod.org/index.php?main_page=product_info&products_id=1723.
 24. AOAC official method 994.08, Aflatoxins in corn, almonds, Brazil nuts, peanuts, and pistachio nuts. In: AOAC official methods. [online]. 2000; [cited 2024 Oct 22]; [2 screens]. Available from: URL: <https://img.21food.cn/img/biaozhun/20100108/177/11285229.pdf>.
 25. AOAC official method 2000.09, Ochratoxin A in roasted coffee immunoaffinity column HPLC method first action 2000. In: AOAC official methods. [online]. [cited 2024 Oct 22]; [3 screens]. Available from: URL: https://www.aocofficialmethod.org/index.php?main_page=product_info&cPath=1&products_id=1822.
 26. National Research Council, Division on Earth and Life Studies, Institute for Laboratory Animal Research, Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, editors. Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. Washington, DC: National Academies Press; 2011.
 27. Institutional Animal Care and Use Committee. Guidelines for euthanasia of rodent fetuses and neonates. [online]. 2013; [cited 2023 Jun 2]; [3 screens]. Available from: URL: https://oacu.oir.nih.gov/system/files/media/file/2021-02/b4_rodent_euthanasia_pup.pdf.
 28. Sarstedt M, Mooi E. Hypothesis testing and ANOVA. In: Sarstedt M, Mooi E, editors. A concise guide to market research. 3rd ed. Germany: Springer; 2011. p. 113-60.
 29. Frazier KS, Seely JC, Hard GC, Betton G, Burnett R, Nakatsuji S, et al. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse urinary system. *Toxicol Pathol* 2012; 40(4 Suppl): 14S-86S.
 30. Srimangkornkaew P, Suwannasaroj K, Yottharat P, Sirimontaporn A. Historical control data from repeated dose 90-days oral toxicity studies of wistar rats (Mlac:WR). *Bull Dept Med Sci* 2021; 63(3): 595-606.
 31. Kort MD, Weber K, Wimmer B, Wilutzky K, Neuenhahn P, Allingham P, et al. Historical control data for hematology parameters obtained from toxicity studies performed on different Wistar rat strains: acceptable value ranges, definition of severity degrees, and vehicle effects. *Toxicol Res Appl* 2020; 4: 1-32.
 32. Berridge BR, Mowat V, Nagai H, Nyska A, Okazaki Y, Clements PJ, et al. Non-proliferative and proliferative lesions of the cardiovascular system of the rat and mouse. *J Toxicol Pathol* 2016; 29(3 Suppl): 1S-47S.
 33. Ajayi AF, Akhigbe E. Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update. *Fertil Res Pract* 2020; 6: 5. (15 pages).
 34. Dixon D, Alison R, Bach U, Colman K, Foley GL, Harleman JH, et al. Nonproliferative and proliferative lesions of the rat and mouse female reproductive system. *J Toxicol Pathol* 2014; 27(3-4 Suppl): 1S-107S.
 35. Westwood FR. The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. *Toxicol Pathol* 2008; 36(3): 375-84.
 36. Willard-Mack CL, Elmore SA, Hall WC, Harleman J, Kuper CF, Losco P, et al. Nonproliferative and proliferative lesions of

- the rat and mouse hematology system. Toxicol Pathol 2019; 47(6): 665-783.
37. Baiocco AB, Balme E, Bruder M, Chandra S, Hellmann J, Hoenerhoff MJ, et al. Nonproliferative and proliferative lesions of the rat and mouse endocrine system. J Toxicol Pathol 2018; 31(3 Suppl): 1S-95S.
 38. Thoolen B, Maronpot RR, Harada T, Nyska A, Rousseaux C, Nolte T, et al. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system. Toxicol Pathol 2010; 38 (7 Suppl): 5S-81S.
 39. Chentouf A, Looten P, Srinivasan M, Srinivas A, Murkunde YV. Subchronic toxicological effects of pea protein isolate (nutrallys) on Wistar rats: a ninety-day dietary. J Toxicol Environ Health 2013; 103: 225-33.
 40. Bauter MR, Mendes O. Subchronic toxicity of lyophilized apoaequorin protein powder in Sprague-Dawley rats. Toxicol Res Appl 2018; 2: 1-15.
 41. Choi B, Glavits R, Murbach TS, Endres JR, Hirka G, Szakonyine IP. 90-day oral toxicity study in rats of a protein-rich powder derived from *Xanthobacter* sp. SoF1. J Appl Toxicol 2024; 44(11): 1816-30.

ความเป็นพิษเฉียบพลันและพิษกึ่งเรื้อรังทางปากของ ผลิตภัณฑ์ Mycoprotein ในหนูแรท สายพันธุ์ Wistar

ภัสสรารณ ศรีมังกรแก้ว¹ กฤติกาญจน์ สุวรรณสโร¹ กอบกุล เหล่าเที่ยง² ธนาพร พลศักดิ์² และ วรินทร์ นุ่มน้อย²

¹ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล นครปฐม 73170

²ทีมวิจัยเทคโนโลยีชีวกระบวนการอุตสาหกรรม กลุ่มวิจัยส่วนผสมฟังก์ชันและนวัตกรรมอาหาร ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ปทุมธานี 12120

บทคัดย่อ โปรตีนทางเลือกกำลังเป็นที่นิยมในผู้บริโภคมากขึ้น จึงมีผลิตภัณฑ์โปรตีนทางเลือก เช่น โปรตีน จากพืช แผลง และจุลินทรีย์ออกมาจำหน่ายจำนวนมาก ที่ผ่านมาประเทศไทยยังไม่สามารถผลิตโปรตีนจากจุลินทรีย์ได้เองต้องมีการนำเข้าจากต่างประเทศ ปัจจุบันประเทศไทยสามารถพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตโปรตีน mycoprotein ได้สำเร็จจากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* สายพันธุ์ BCC7051 และยังไม่มีการศึกษาพิษวิทยาทางปากของผลิตภัณฑ์ดังกล่าว ซึ่งการประเมินความปลอดภัยต้องดำเนินการในสัตว์ทดลองก่อนที่จะศึกษาในมนุษย์ เพื่อให้ได้ข้อมูลความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ต่อผู้บริโภค การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความเป็นพิษเฉียบพลันและพิษกึ่งเรื้อรังทางปากของ mycoprotein ในหนูแรทสายพันธุ์ Wistar ผลการทดสอบพบว่า mycoprotein ขนาด 300 และ 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักสัตว์ทดลอง ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษเฉียบพลันและการตายในสัตว์ทดลอง แสดงให้เห็นว่า mycoprotein จัดอยู่ในระบบการจัดกลุ่มสารเคมี การติดตามและการแสดงรายละเอียดบนเอกสารข้อมูลความปลอดภัยสากลหมวดที่ 5 หรือไม่ระบุประเภท มี LD₅₀ ที่ 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมขึ้นไปของน้ำหนักตัวสัตว์ทดลอง ในการทดสอบความเป็นพิษทางปากแบบกึ่งเรื้อรัง การให้โปรตีนชนิดนี้ติดต่อกันเป็นเวลา 90 วัน ที่ขนาด 500 1,000 และ 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวสัตว์ทดลอง และในกลุ่มพักฟื้นที่มีเวลาพักฟื้น 14 วัน สรุปได้ว่าขนาด mycoprotein ที่มากที่สุดที่ได้รับต่อเนื่องเป็นเวลานาน โดยไม่ก่อให้เกิดอันตรายที่ร้ายแรงต่อร่างกายต่อวันในสัตว์ทดลอง คือ 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวสัตว์ทดลอง

คำสำคัญ: Mycoprotein, *Aspergillus oryzae*, การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันและพิษกึ่งเรื้อรังในหนู

ผลของการใช้โปรแกรม Nongmamong Blood Glucose Meter IQC Online ในการบริหารจัดการระบบควบคุมคุณภาพ เครื่องตรวจวัดน้ำตาลในเลือดชนิดพกพา ในเครือข่ายสุขภาพ อำเภอหนองมะโมง จังหวัดชัยนาท

สุพัตรา สุวรรณศิริ และ วิทยา จันทโรจน์

โรงพยาบาลหนองมะโมง อำเภอหนองมะโมง ชัยนาท 17120

บทคัดย่อ ปัจจุบันเครื่องตรวจวัดน้ำตาลในเลือดชนิดพกพาถูกนำมาใช้ในหน่วยงานต่างๆ เนื่องจากใช้งานง่ายและได้ผลรวดเร็ว ดังนั้น การควบคุมคุณภาพภายในจึงมีความสำคัญ เพื่อป้องกันความผิดพลาดของผลการตรวจให้ถูกต้องแม่นยำ ผู้วิจัยจึงพัฒนาโปรแกรม Nongmamong Blood Glucose Meter IQC Online เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพของกระบวนการตรวจสอบผลการควบคุมคุณภาพภายในทดแทนการบันทึกในกระดาษแบบดั้งเดิม โดยใช้ฐานข้อมูล MySQL ภาษาการเขียนโปรแกรม PHP ทำงานด้วยระบบ Webserver Apache บนระบบปฏิบัติการ Linux เชื่อมต่อกับ LINE Notify เพื่อบันทึก ติดตาม และ วิเคราะห์ผลการควบคุมคุณภาพภายในของหน่วยงาน จำนวน 12 แห่ง ในเครือข่ายสุขภาพอำเภอหนองมะโมง และศึกษาผลสัมฤทธิ์ของระบบจากการทดสอบและประเมินผล พบว่าโปรแกรมฯ มีประสิทธิภาพในการรวบรวมข้อมูล วิเคราะห์ผล แจ้งเตือน เมื่อมีข้อมูลผิดปกติ และสร้างรายงานสรุปผลได้ถูกต้อง จากความคิดเห็นของผู้ใช้บ่งชี้ว่ามีความพึงพอใจระบบในระดับสูง เนื่องจากสามารถปรับปรุงกระบวนการในการจัดเก็บข้อมูล ลดความผิดพลาดของการบันทึกข้อมูล ลดขั้นตอนการทำงานได้ร้อยละ 93 และลดระยะเวลาลงร้อยละ 88 เมื่อเปรียบเทียบกับระบบแบบดั้งเดิม ช่วยให้ผู้ใช้งานสามารถวิเคราะห์ข้อมูลได้อย่างสะดวกและรวดเร็ว อีกทั้งประหยัดค่าใช้จ่าย บ่งชี้ถึงศักยภาพในการนำไปใช้อย่างแพร่หลายในสถานพยาบาลอื่นๆ

คำสำคัญ: เครื่องตรวจวัดน้ำตาลในเลือดชนิดพกพา, การควบคุมคุณภาพภายใน, โปรแกรมควบคุมคุณภาพภายในออนไลน์

Corresponding author E-mail: supattrabow@gmail.com

Received: 29 April 2024

Revised: 20 December 2024

Accepted: 17 Febuary 2025

บทนำ

โรคเบาหวานเป็นปัญหาสาธารณสุขสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อประชากรทั่วโลก และเป็นปัญหาสุขภาพเรื้อรังที่พบบ่อยในประเทศไทย ส่งผลกระทบต่อประชากรทุกเพศทุกวัย ข้อมูลจากรายงานสถิติสาธารณสุข กระทรวงสาธารณสุข ชี้ว่าประเทศไทยมีแนวโน้มพบอุบัติการณ์ของโรคเบาหวานเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องโดยในปี พ.ศ. 2566 มีผู้ป่วยรายใหม่เพิ่มขึ้น 3 แสนคนต่อปี⁽¹⁾ และหากไม่ได้รับการควบคุมอย่างเหมาะสมจะนำไปสู่ภาวะแทรกซ้อนเรื้อรังที่ร้ายแรง เช่น โรคหัวใจ โรคหลอดเลือดสมอง โรคไต โรคตา และโรคระบบประสาท ทำให้คุณภาพชีวิตลดลง เพิ่มอัตราการเสียชีวิต และทำให้ค่ารักษาพยาบาลสูงขึ้น⁽²⁾ การตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดโดยวิธีเจาะปลายนิ้วขณะอดอาหาร (fasting capillary blood glucose, FCBG) ด้วยเครื่องตรวจน้ำตาลในเลือดชนิดพกพา เป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ตรวจเพื่อคัดกรองและวินิจฉัยโรคเบาหวาน^(3,4) ซึ่งผลการตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดที่ถูกต้องมีความสำคัญต่อการตัดสินใจทางการรักษาและช่วยป้องกันภาวะแทรกซ้อนของโรคเบาหวาน⁽³⁻⁵⁾ ในปัจจุบันการตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดด้วยเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพา มีการนำมาใช้อย่างแพร่หลาย กระจายตามหน่วยงานต่าง ๆ ทั้งภายในและภายนอกโรงพยาบาล เนื่องจากใช้งานได้ง่ายและสะดวก ใช้ตัวอย่างเลือดน้อย และใช้เวลาตรวจวิเคราะห์ที่สั้นทำให้ได้ผลที่รวดเร็ว⁽⁶⁾ ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ได้กำหนดให้เครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพาเป็นเครื่องมือแพทย์สำหรับการวินิจฉัยภายนอกร่างกายที่มีความเสี่ยงสูงต่อบุคคลและความเสี่ยงปานกลางต่อสาธารณสุข (*In vitro* diagnostic medical device หรือ IVD ประเภทที่ 3) ซึ่งก่อนใช้งานจะต้องมีการศึกษาวิธีใช้เครื่องมือและแถบทดสอบตามข้อกำหนดอย่างเคร่งครัดเนื่องจากมีความเสี่ยงที่อาจก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพร่างกาย หรือชีวิตของมนุษย์ หรือผลกระทบต่อสาธารณสุข^(7,8) นอกจากนี้มีปัจจัยที่ทำให้ผลตรวจเกิดความคลาดเคลื่อนจาก 4 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยด้านกายภาพ เช่น อุณหภูมิ ความสูงของพื้นที่จากระดับน้ำทะเล ปัจจัยจากผู้ป่วย เช่น ค่าความเข้มข้นของเลือด ปัจจัย

ทางเภสัชวิทยา เช่น ระดับยาในกระแสเลือด และปัจจัยด้านแถบทดสอบ^(9,10) ดังนั้นระบบตรวจสอบคุณภาพภายใน (Internal Quality Control, IQC) จึงเป็นเครื่องมือสำคัญในการตรวจสอบประสิทธิภาพของเครื่องมือและแถบทดสอบก่อนนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์ผู้ป่วย⁽¹¹⁾ โดยใช้สารควบคุมคุณภาพที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลในเลือดที่ทราบค่า เนื่องจากประสิทธิภาพของเครื่องตรวจน้ำตาลในเลือดและแถบทดสอบอาจได้รับผลกระทบจากหลายปัจจัย เช่น ประสิทธิภาพของเครื่องวัด คุณภาพของแถบทดสอบ เทคนิคการวัด และสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ และความชื้นโดยรอบ⁽⁹⁾ ผู้ปฏิบัติงานจะต้องพิจารณาว่าเครื่องและแถบทดสอบได้รับอิทธิพลจากสภาวะภายนอกดังกล่าวหรือไม่ก่อนที่จะทำการตรวจวิเคราะห์ในผู้ป่วย พร้อมทั้งต้องบันทึกผลการตรวจสารควบคุมคุณภาพรายวันอย่างสม่ำเสมอ เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบกับผลครั้งก่อนหน้า ประเมินผลและดูแลแนวโน้มของข้อมูลซึ่งในเครือข่ายบริการสุขภาพอำเภอหนองมะโมงนั้น นักเทคนิคการแพทย์ของโรงพยาบาลหนองมะโมงทำหน้าที่เป็นผู้กำหนดระบบและประสานงานการควบคุมคุณภาพภายในเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพาให้กับหน่วยงานภายในโรงพยาบาลหนองมะโมง จำนวน 5 หน่วยงาน ได้แก่ ห้องปฏิบัติการ (Lab) หน่วยงานฉุกเฉิน (ER) หน่วยงานผู้ป่วยใน (IPD) ห้องคลอด (LR) และเวชปฏิบัติปฐมภูมิฯ และโรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบล จำนวน 7 แห่ง ได้แก่ รพ.สต.หนองมะโมง รพ.สต.วังตะเคียน รพ.สต.บ้านหนองตะขบ รพ.สต.สะพานหิน รพ.สต.บ้านวังตะเคียน รพ.สต.บ้านน้ำพุ และ รพ.สต.กุดจอก โดยการจัดหาสารควบคุมคุณภาพ 2 ระดับความเข้มข้นให้ผู้ใช้งานหน่วยงานต่างๆ เก็บรักษาและตรวจวิเคราะห์อย่างน้อยเดือนละ 1 ครั้ง รายงานโดยการบันทึกค่าผลการตรวจวิเคราะห์สารควบคุมคุณภาพลงในสมุดบันทึก จากนั้นถ่ายภาพหน้าบันทึกผลส่งให้แก่ นักเทคนิคการแพทย์ทาง LINE เพื่อใช้ในการติดตามและวิเคราะห์ผลการควบคุมคุณภาพ รวมถึงทำสรุปรายงานผล ซึ่งปัญหาของวิธีการรายงาน IQC แบบดั้งเดิมนี้มีข้อจำกัดหลายประการ ได้แก่ ผู้ใช้ต้อง

บันทึกผลการตรวจวัด IQC ลงในเอกสารด้วยตนเอง ซึ่งใช้เวลานานและเสี่ยงต่อความผิดพลาด สมุดบันทึกผลการควบคุมคุณภาพหรือคาร์ตจิกการ์ดทำให้ข้อมูลเก่าสุดหาย ไม่มีระบบแจ้งเตือนเมื่อผล IQC อยู่นอกช่วงที่ยอมรับได้ ผู้ใช้อาจไม่ทราบถึงปัญหาของเครื่องวัดน้ำตาลในเลือดจนกว่าจะเกิดความคลาดเคลื่อนกับผลการตรวจวิเคราะห์ผู้ป่วยไปแล้ว รวมทั้งการวิเคราะห์ข้อมูลผล IQC และสรุปรายงานผลนั้นมีหลายขั้นตอนและใช้เวลานาน

ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาระบบการรายงานผลควบคุมคุณภาพภายในของเครื่องตรวจวัดน้ำตาลในเลือดชนิดพกพา และประเมินประสิทธิภาพของโปรแกรม Nongmamong Blood Glucose Meter IQC Online ในการแก้ปัญหาของการดำเนินการในระบบรายงานและติดตาม IQC แบบดั้งเดิม โดยการบันทึกผล IQC แบบอัตโนมัติและรายงานผลอย่างสะดวก รวดเร็ว และถูกต้อง

วัสดุและวิธีการ

วัสดุและสารเคมี

เครื่องตรวจน้ำตาลในเลือดชนิดพกพาและแถบทดสอบน้ำตาลในเลือดชนิดพกพา (ACCU-CHECK® รุ่น Performa, Roche Diabetes Care, Germany), สารควบคุมคุณภาพระดับต่ำ ช่วงค่า 30-60 mg/dL และระดับสูง ช่วงค่า 254-344 mg/dL (ACCU-CHECK® รุ่น Performa Control L2, Roche Diabetes Care, Germany) ซอฟต์แวร์และเทคโนโลยี Visual Studio Code, Apache web server, MySQL Database System, ระบบปฏิบัติการ Windows & Linux, Web browser, Line Notify, Internet/WIFI, เซิร์ฟเวอร์กลาง และคอมพิวเตอร์ PC หรือ smart phones

หน่วยงานทดสอบ

หน่วยงานภายในโรงพยาบาลหนองมะโมง อำเภอหนองมะโมง จังหวัดชัยนาท จำนวน 5 หน่วยงาน ได้แก่ ห้องปฏิบัติการ (Lab) หน่วยงานฉุกเฉิน (ER) หน่วยงานผู้ป่วยใน (IPD) ห้องคลอด (LR) และเวชปฏิบัติปฐมภูมิ

รพ.สต. จำนวน 7 แห่ง ได้แก่ รพ.สต.หนองมะโมง รพ.สต.วังตะเคียน รพ.สต.บ้านหนองตะขบ รพ.สต.สะพานหิน รพ.สต.บ้านวังตะเคียน รพ.สต.บ้านน้ำพุ และ รพ.สต.กุดจอก อำเภอหนองมะโมง จังหวัดชัยนาท

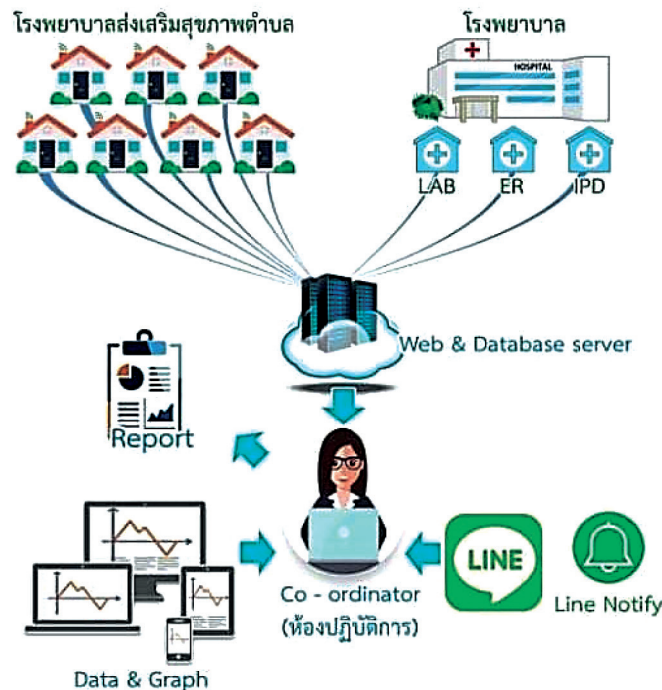
การออกแบบระบบ

กำหนดคุณสมบัติของโปรแกรมให้สามารถใช้งานได้ทุกอุปกรณ์ที่สามารถเชื่อมต่อเครือข่าย Internet กำหนดสิทธิ์ในการใช้งานโปรแกรมโดยกำหนด Username และ Password ของผู้ใช้งานแต่ละหน่วยงานในการ Login ใช้งาน โดยให้หน่วยงานต่างๆ ส่งข้อมูลบุคลากรในหน่วยงานที่ได้รับมอบหมายให้เป็นผู้ที่สามารถเข้าถึงโปรแกรมได้เพื่อให้กวีวิชาการคอมพิวเตอร์ของโรงพยาบาลหนองมะโมงเก็บเป็นฐานข้อมูลผู้มีสิทธิ์เข้าใช้ระบบ โดยออกแบบให้โปรแกรมจัดเก็บข้อมูล Serial number ของเครื่องตรวจ Lot number และ Expiry date ของแถบตรวจและสารควบคุมคุณภาพเชื่อมต่อ Web browser กับ LINE Notify ในการแจ้งเตือนเมื่อมีการบันทึกรายงานผล IQC ออกนอกช่วงที่ยอมรับ แถบทดสอบหมดอายุหรือสารควบคุมคุณภาพหมดอายุ ประมวลผล และวิเคราะห์ค่า Mean, SD, %CV สร้างเป็น Levey-Jennings Control Chart และจัดทำรายงานผลแบบทันที ดังแสดงในภาพที่ 1

ผู้ใช้งานสามารถเข้าถึงข้อมูลผ่าน Web browser โดยใช้ฐานข้อมูล MySQL ภาษาการเขียนโปรแกรม PHP ทำงานบนระบบ Webserver Apache ที่ติดตั้งอยู่ในระบบปฏิบัติการ Linux เรียกใช้งานผ่าน <http://www.nongmamong.com>

ขั้นตอนการใช้งานโปรแกรม Nongmamong Blood Glucose Meter IQC Online

เปิด Web browser เช่น Google Chrome หรือ Fire Fox เข้า website <http://www.nongmamong.com> บุคลากรผู้รับผิดชอบการควบคุมคุณภาพภายในแต่ละหน่วยงาน เข้าสู่ระบบโดยใช้ Username และ Password เฉพาะบุคคล ดังแสดงในภาพที่ 2 หลังเข้าสู่ระบบสำเร็จ คลิกปุ่มบันทึกใหม่เพื่อเพิ่มค่ารายการใหม่เข้าสู่ระบบบรรายละเอียด ได้แก่ ผลการตรวจวิเคราะห์สารควบคุมคุณภาพระดับต่ำ ช่วงค่า 30-60 mg/dl และสารควบคุมคุณภาพระดับสูง ช่วงค่า 254-344 mg/dl



ภาพที่ 1 ระบบการทำงานของโปรแกรม Nongmamong Blood Glucose Meter IQC Online (วาดขึ้นเองโดยนำรูป Icon มาจาก <http://icon-icons.com/icon/wifi-home-house/102155> และ <http://th.ac-illust.com>)

วันที่ตรวจวิเคราะห์สารควบคุมคุณภาพ serial number เครื่องตรวจน้ำตาลในเลือดชนิดพกพา Lot Number วันหมดอายุของแถบทดสอบ วันที่เปิดใช้แถบทดสอบ วันที่เปิดใช้สารควบคุมคุณภาพ และผู้บันทึกรายงานผล ดังแสดงในภาพที่ 3

นักเทคนิคการแพทย์ผู้ประสานงานตรวจสอบผลการตรวจวิเคราะห์สารควบคุมคุณภาพ และรายละเอียดทั้งหมดได้ในทันทีที่แต่ละหน่วยงานมีการรายงานผลเข้าโปรแกรม โดยจะได้รับการแจ้งเตือนและข้อมูลต่างๆ จาก Application LINE Notify: IQC online ซึ่งเชื่อมต่อฐานข้อมูลไว้กับโปรแกรม กรณีค่าที่รายงานมีความผิดปกติจากเกณฑ์ยอมรับที่กำหนดไว้ในโปรแกรม ได้แก่ หมายเลข Serial number เครื่องตรวจไม่ถูกต้อง แถบทดสอบหมดอายุ สารควบคุมคุณภาพหมดอายุ ค่าผลการตรวจวิเคราะห์สารควบคุมคุณภาพออกนอกช่วงที่กำหนด โปรแกรมจะประมวลผลและแจ้งเตือนพร้อมกับส่งข้อความแจ้งเตือนผ่านทาง Application LINE Notify ในทันที เพื่อให้ทันนักเทคนิคการแพทย์ผู้ประสานงานรับทราบความคลาดเคลื่อนและแจ้งประสานงานกับบุคลากรผู้รับผิดชอบในหน่วยงานที่ตรวจวิเคราะห์ เพื่อหา

สาเหตุและแก้ไขความคลาดเคลื่อนทันที เช่น การรายงานผลการตรวจวิเคราะห์สารควบคุมคุณภาพของ รพ.สต. บ้านวังตะเคียน รายงานเข้าระบบวันที่ 5 สิงหาคม พ.ศ. 2567 เครื่องตรวจน้ำตาลในเลือด หมายเลข 97205857600 ใช้แถบทดสอบ Lot Number 302761 วันที่เปิดใช้แถบทดสอบวันที่ 23 กรกฎาคม พ.ศ. 2567 แถบทดสอบมีวันหมดอายุวันที่ 22 กรกฎาคม พ.ศ. 2568 Lot Number ของสารควบคุมคุณภาพ คือ 23702937 เปิดใช้สารควบคุมคุณภาพวันที่ 23 กรกฎาคม พ.ศ. 2567 สารควบคุมคุณภาพหมดอายุวันที่ 31 กรกฎาคม พ.ศ. 2568 ตรวจวิเคราะห์สารควบคุมคุณภาพวันที่ 23 กรกฎาคม พ.ศ. 2567 ผลการควบคุมคุณภาพทั้งสองระดับอยู่ในช่วงที่กำหนด (OK) ดังแสดงในภาพที่ 4-6

นักเทคนิคการแพทย์ผู้ประสานงานเลือกหน่วยงาน ดังแสดงในภาพที่ 7 โดยผู้ประสานงานจะได้รับสิทธิ์ในการเข้าถึงข้อมูลได้ทุกหน่วยงาน ในขณะที่ผู้อื่นๆ ของแต่ละหน่วยงานได้รับสิทธิ์ให้เข้าถึงได้เฉพาะข้อมูลในหน่วยงานของตนเองเท่านั้น สามารถเรียกดู Levey-Jennings Control Chart ดังแสดงในภาพที่ 8 (A,B) และวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ย (Mean) ค่าสัมประสิทธิ์ความ



**Nongmamong
Blood Glucose Meter
IQC Online**

โปรดล็อกอินเพื่อเข้าสู่ระบบ

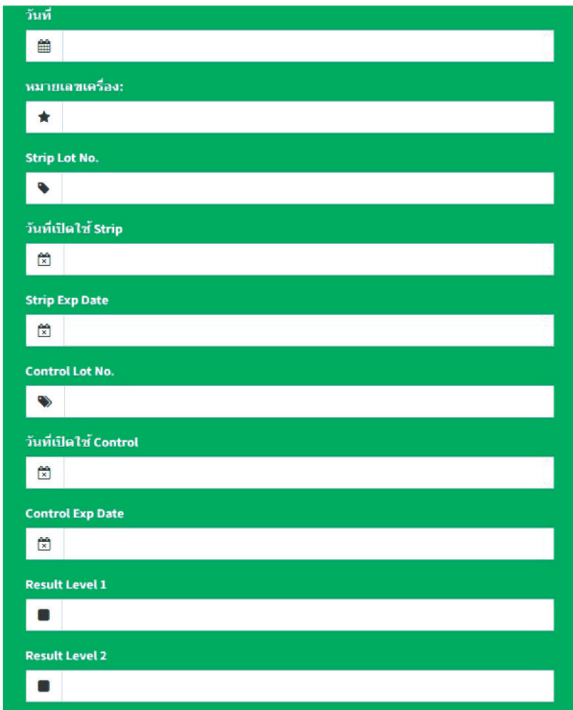
ชื่อผู้ใช้ Username

รหัสผ่าน Password

เข้าสู่ระบบ

[ลืมรหัสผ่าน
ลงทะเบียนใหม่](#)

ภาพที่ 2 การเข้าสู่ระบบโดยใช้ Username และ Password เฉพาะบุคคล (<https://www.nongmamong.com/login.php>)



วันที่

หมายเลขเครื่อง:

Strip Lot No.

วันที่เปิดใช้ Strip

Strip Exp Date

Control Lot No.

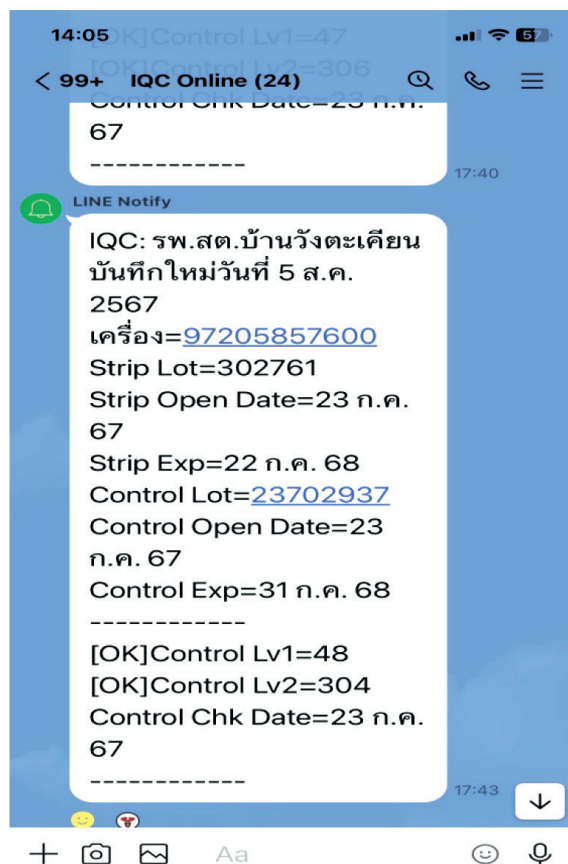
วันที่เปิดใช้ Control

Control Exp Date

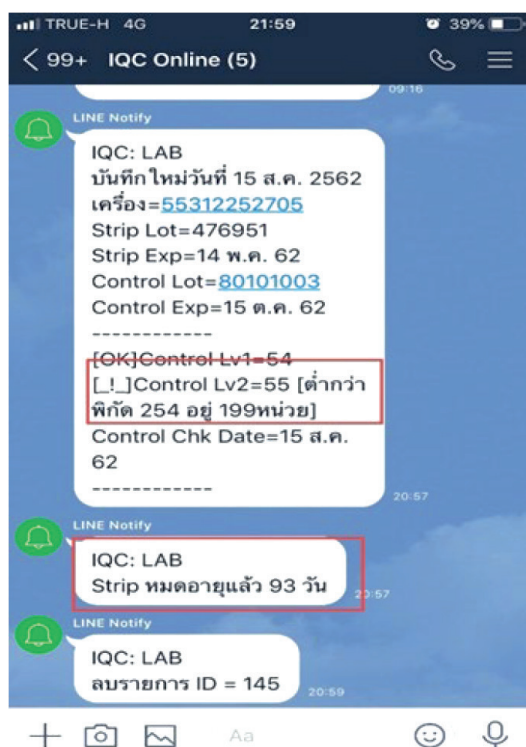
Result Level 1

Result Level 2

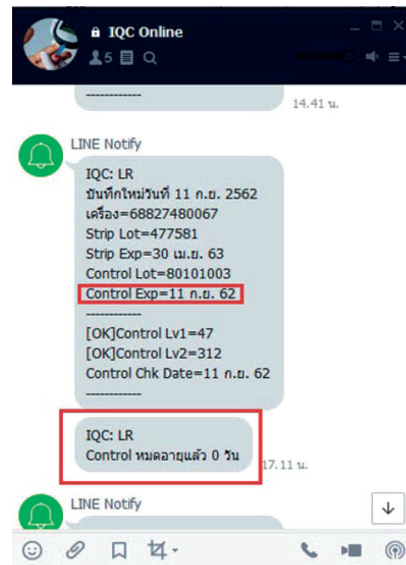
ภาพที่ 3 การบันทึกข้อมูลเข้าโปรแกรม (<https://www.nongmamong.com/data.php>) หมายเลขเครื่อง (Serial number ของเครื่องตรวจวัดน้ำตาลในเลือดชนิดพกพา), Strip Lot No. (Lot Number ของแถบทดสอบ), วันที่เปิดใช้ Strip (วันที่เปิดใช้งานแถบทดสอบ), Strip Exp. Date (วันหมดอายุของแถบทดสอบ), Control Lot No. (Lot Number ของสารควบคุมคุณภาพ), วันที่เปิดใช้ Control (วันที่เปิดใช้งานสารควบคุมคุณภาพ), Control Exp. Date (วันหมดอายุของสารควบคุมคุณภาพ), Result Level 1 (ผลการตรวจวิเคราะห์สารควบคุมคุณภาพระดับต่ำ) และ Result Level 2 (ผลการตรวจวิเคราะห์สารควบคุมคุณภาพระดับสูง)



ภาพที่ 4 การแจ้งเตือนเมื่อมีการรายงานผลเข้าโปรแกรม (LINE: IQC Online)



ภาพที่ 5 การแจ้งเตือน (LINE: IQC Online) เมื่อค่าผลการตรวจวิเคราะห์สารควบคุมคุณภาพออกนอกช่วงที่กำหนด (กรอบสีแดงด้านบน) และแสดงการแจ้งเตือนแถบทดสอบหมดอายุ (กรอบสีแดงด้านล่าง)



ภาพที่ 6 การแจ้งเตือนผ่าน LINE: IQC Online เมื่อสารควบคุมคุณภาพหมดอายุ (กรอบสีแดงด้านบน) และ นับจำนวนวันหมดอายุ ณ วันที่ใช้งาน (กรอบสีแดงด้านล่าง)

แปรปรวน (%CV) และค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) รวมถึงการประมวลผลข้อมูลในการจัดทำรายงานสรุปผลการตรวจวิเคราะห์สารควบคุมคุณภาพประจำปีของแต่ละหน่วยงาน ดังแสดงในภาพที่ 9 เพื่อส่งคืนข้อมูลให้แต่ละหน่วยงานรับทราบผลการควบคุมคุณภาพภายในของหน่วยงานตนเอง เป็นการสะท้อนผลให้ผู้ปฏิบัติงานเกิดการรับรู้และปรับปรุงพัฒนางานอย่างต่อเนื่อง

การทดสอบระบบ

ทดสอบการเข้าใช้งานระบบโดยใช้ Username และ Password ของแต่ละบุคคลทั้งหมด 12 แห่ง ดังนี้ หน่วยงานภายในโรงพยาบาล จำนวน 5 หน่วยงาน ได้แก่ Lab, ER, IPD, LR, เวชปฏิบัติปฐมภูมิฯ และ รพ.สต. จำนวน 7 แห่ง ได้แก่ รพ.สต.หนองมะโมง รพ.สต.วังตะเคียน รพ.สต.บ้านหนองตะขบ รพ.สต.สะพานหิน รพ.สต.บ้านวังตะเคียน รพ.สต.บ้านน้ำพุ และ รพ.สต.กุดจอก กรอกข้อมูลเพื่อยืนยันว่าโปรแกรมทำงานได้ถูกต้อง ตรงตามความต้องการ และมีประสิทธิภาพตามที่กำหนด ได้แก่ ความถูกต้องของสิทธิ์การเข้าใช้งานระบบโดยใช้ Username และ Password ของแต่ละบุคคล ความถูกต้องในการการเก็บรวบรวมข้อมูล ความถูกต้องในการวิเคราะห์ข้อมูล Mean, SD และ %CV การสร้าง Levey-Jennings Control Chart และจัดทำรายงานสรุปผลได้ตามรูปแบบที่ต้องการ การแจ้งเตือนผู้ใช้

เมื่อมีการบันทึกผลเข้าระบบ และเมื่อผลการวัด IQC อยู่นอกช่วงที่ยอมรับ แถบทดสอบหมดอายุ สารควบคุมคุณภาพหมดอายุ ดังแสดงในตารางที่ 1

การประเมินผลระบบ

เปรียบเทียบขั้นตอนและระยะเวลาของระบบ O-IQCMS กับวิธีการบันทึกและรายงานผลควบคุมคุณภาพภายในแบบระบบดั้งเดิม ดังแสดงในภาพที่ 10 และประเมินความพึงพอใจของผู้ใช้งานระบบ ดังแสดงในตารางที่ 2

สำรวจความพึงพอใจของผู้มีสิทธิ์ใช้งานโปรแกรมทั้งหมด 11 ราย จาก 11 หน่วยงาน ได้แก่ รพ.สต. จำนวน 7 แห่ง ได้แก่ รพ.สต.หนองมะโมง รพ.สต.วังตะเคียน รพ.สต.บ้านหนองตะขบ รพ.สต.สะพานหิน รพ.สต.บ้านวังตะเคียน รพ.สต.บ้านน้ำพุ และ รพ.สต.กุดจอก และหน่วยงานภายในโรงพยาบาลหนองมะโมง จำนวน 4 หน่วยงาน ได้แก่ ER, IPD, LR, เวชปฏิบัติปฐมภูมิฯ (ไม่ได้สำรวจหน่วยงาน LAB เนื่องจากเป็นผู้ออกแบบโปรแกรม) เกี่ยวกับความรู้สึกที่มีต่อโปรแกรม เพื่อประเมินความรู้สึกของผู้ใช้งานทั้งในด้านประสิทธิภาพและความเป็นมิตรกับผู้ใช้ (User-Friendly) ใช้การแปลความหมายของระดับคะแนนความพึงพอใจของกลุ่มตัวอย่าง โดยใช้ค่าเฉลี่ยของผลคะแนนเป็น

ตัวชี้วัดตามเกณฑ์ในการวิเคราะห์ตามแนวคิดของ BestJW และคณะ⁽¹²⁾ ได้แก่ 4.50–5.00 คะแนน (พึงพอใจมากที่สุด) 3.50–4.4 (พึงพอใจมาก) 2.50–3.49

คะแนน (พึงพอใจปานกลาง) 1.50–2.49 คะแนน (พึงพอใจน้อย) และ 1.00–1.49 คะแนน (พึงพอใจน้อยที่สุด) ดังแสดงในตารางที่ 2

เลือกหน่วยงาน *

00001 LAB

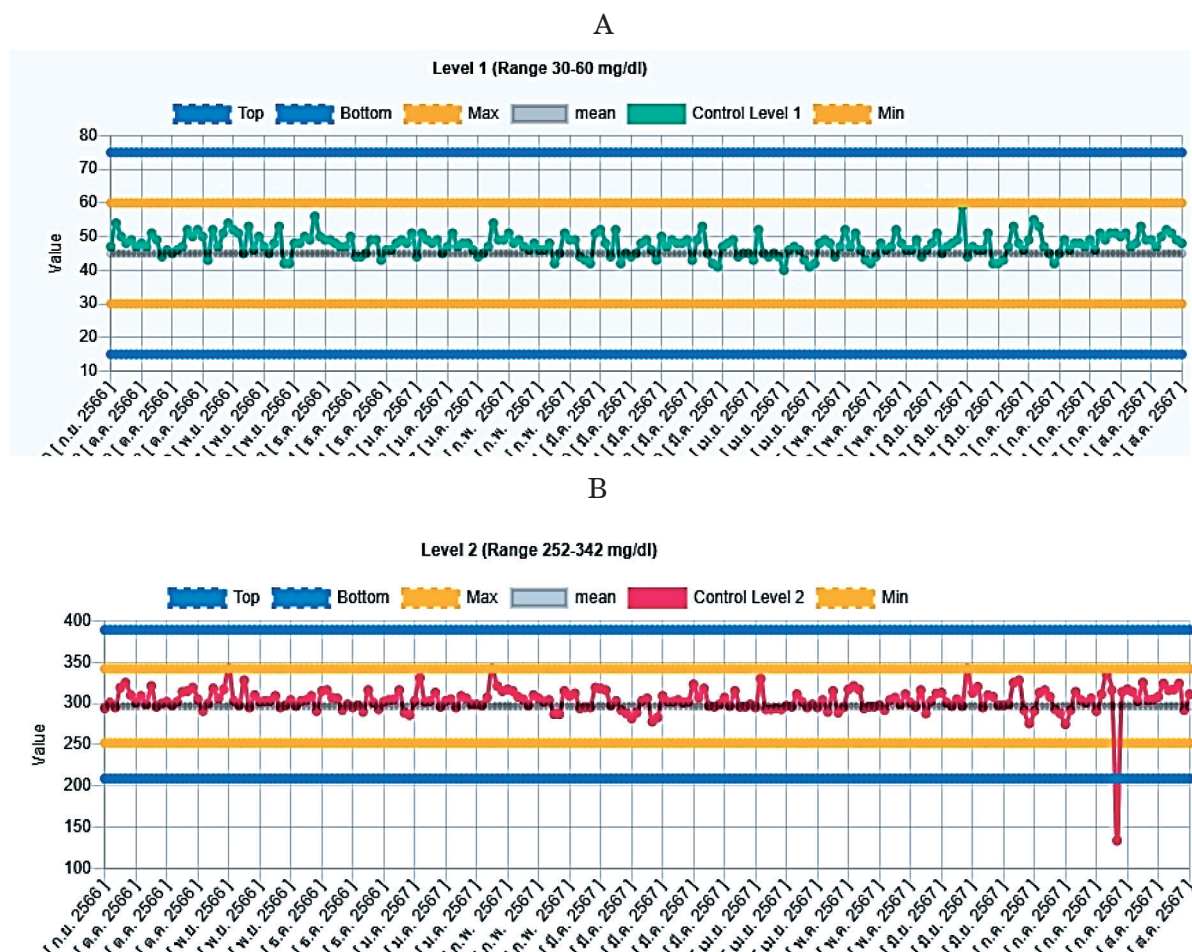
--> LAB --

01666 โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลหนองมะโมง
01667 โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลบ้านหนองตะขบ
01668 โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลวังตะเคียน
01669 โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลบ้านวังตะเคียน
01670 โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลสะพานหิน
01671 โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลบ้านน้ำพ
01672 โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลลูกจอก

00001 LAB

00002 Emergency Room
00003 IPD
00004 Labor Room
00005 เวชศาสตร์และครอบครัว

ภาพที่ 7 การเลือกดูข้อมูลรายหน่วยงาน (<https://www.nongmamong.com/lab/data.php>)



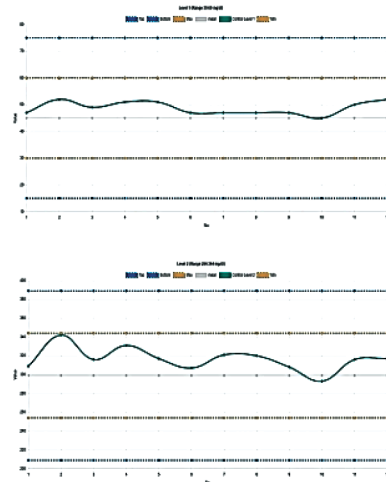
ภาพที่ 8 A แสดง Levey-Jennings Control Chart ของผลการตรวจวิเคราะห์สารควบคุมคุณภาพระดับต่ำ ช่วงค่า 30-60 mg/dl

B แสดง Levey-Jennings Control Chart ของผลการตรวจวิเคราะห์สารควบคุมคุณภาพระดับสูง ช่วงค่า 254-344 mg/dl

(https://www.nongmamong.com/lab/data_all.php)


รายงานผลการควบคุมคุณภาพภายใน เครื่องตรวจน้ำตาลปลายนิ้ว
หมายเลขเครื่อง : 97205857510 , 97205857553
หน่วยงาน : Emergency Room

No.	วันที่	เครื่อง	Strip		Control		Level 1	Level 2
			Lot	Exp	Lot	Exp		
1	02/10/2566	97205857510	302277	28/10/2567	20102931	20/09/2567	47	309
2	01/11/2566	97205857510	302403	29/12/2567	20102931	20/09/2567	52	342
3	01/12/2566	97205857510	302403	29/12/2567	20102931	21/09/2567	49	316
4	05/01/2567	97205857510	302448	21/01/2568	20102931	20/09/2567	51	331
5	01/02/2567	97205857510	302645	14/05/2568	20102931	20/09/2567	51	317
6	31/03/2567	97205857510	302645	14/05/2568	20102931	20/09/2567	47	307
7	05/05/2567	97205857510	302650	21/05/2568	20102931	20/09/2567	47	321
8	12/06/2567	97205857510	302761	22/07/2568	30102936	26/06/2568	47	320
9	02/07/2567	97205857510	302761	22/07/2568	30102936	27/06/2568	47	308
10	02/07/2567	97205857553	302645	14/05/2568	30102936	26/06/2568	45	293
11	01/08/2567	97205857510	302650	21/05/2568	30102936	26/06/2568	50	316
12	01/08/2567	97205857553	302761	22/07/2568	30102936	26/06/2568	52	317
Mean							48.75	316.42
SD							2.28	11.78
%CV							4.67	3.72



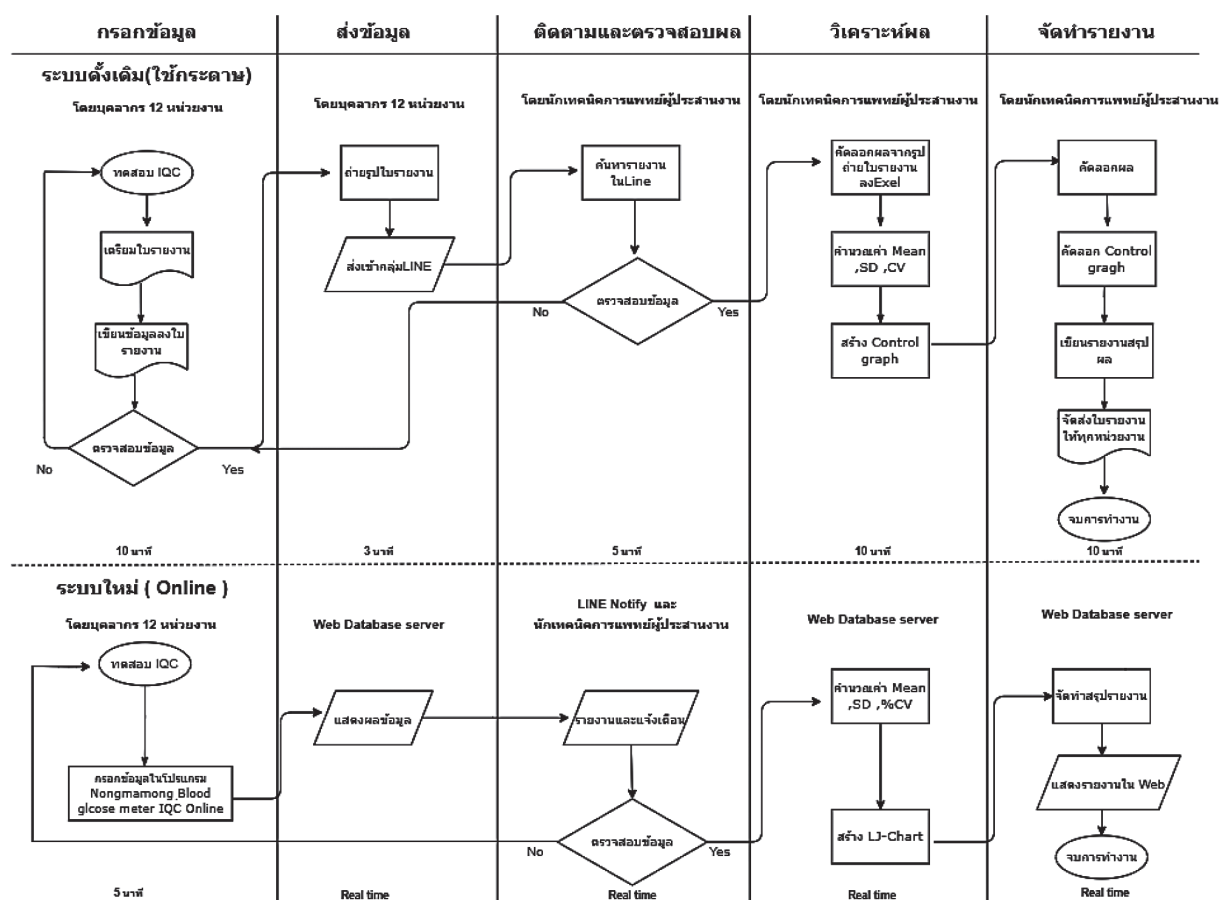
สรุปผล : ผลการควบคุมคุณภาพ จากสารควบคุมคุณภาพทั้ง 2 ระดับ อยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ โดยไม่พบว่ามีผลการควบคุมคุณภาพ ค่าใด ออกนอกเกณฑ์ที่กำหนด หรือ % CV > 5%

ลงชื่อ ผู้สรุปผล
(นางสุพัตรา สุวรรณศิริ)
นักเทคนิคการแพทย์ชำนาญการ

ภาพที่ 9 รายงานสรุปผลการควบคุมคุณภาพภายในของหน่วยงาน ER ในปีงบประมาณ พ.ศ. 2567 แสดงรายละเอียดวันที่รายงาน หมายเลขเครื่องตรวจน้ำตาลในเลือด Lot Number ของแถบทดสอบ วันหมดอายุของแถบทดสอบ Lot Number ของสารควบคุมคุณภาพ วันหมดอายุของสารควบคุมคุณภาพ ผลการตรวจวิเคราะห์สารควบคุมคุณภาพทั้ง 2 ระดับ ค่าเฉลี่ย ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน และ Levey-Jennings Control Chart ของสารควบคุมคุณภาพทั้ง 2 ระดับ (https://www.nongmamong.com/lab/data.php?show_year)

ตารางที่ 1 การทดสอบโปรแกรม Nongmamong Blood Glucose Meter IQC Online

รายละเอียดการทดสอบระบบ	ผลการทดสอบระบบ			
	ถูกต้อง		ไม่ถูกต้อง	
	จำนวน (แห่ง)	ร้อยละ	จำนวน (แห่ง)	ร้อยละ
Username และ Password ของแต่ละบุคคล	12	100	0	0
การแสดงผลข้อมูลที่ป้อนเข้าระบบ	12	100	0	0
การวิเคราะห์ข้อมูล Mean, SD และ %CV	12	100	0	0
การสร้าง Levey-Jennings Control Chart	12	100	0	0
การสร้างรายงานสรุปผล	12	100	0	0
การแจ้งเตือนการบันทึกผลเข้าระบบ	12	100	0	0
การแจ้งเตือน IQC อยู่นอกช่วงที่ยอมรับ	12	100	0	0
การแจ้งเตือนแถบทดสอบหมดอายุ	12	100	0	0
การแจ้งเตือนสารควบคุมคุณภาพหมดอายุ	12	100	0	0



ภาพที่ 10 การเปรียบเทียบจำนวนขั้นตอนและระยะเวลาของโปรแกรม Nongmamong Blood Glucose Meter IQC Online และระบบดั้งเดิม (สร้างจากโปรแกรม Mind On Map: <https://web.mindonmap.com/app/viewer-MDISM2FiMIIXNzE5>)

ตารางที่ 2 ผลสำรวจความพึงพอใจของบุคลากรหน่วยงาน จำนวน 11 แห่ง ที่มีต่อโปรแกรม Nongmamong Blood Glucose Meter IQC Online

รายละเอียด	จำนวนระดับความพึงพอใจ (ร้อยละ)					จำนวนเฉลี่ย
	มากที่สุด	มาก	ปานกลาง	น้อย	น้อยที่สุด	
1. ผู้ประสานงานระบบสนับสนุนสารควบคุมคุณภาพมีคุณภาพและเพียงพอ	7 (63.64)	4 (36.36)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4.64
2. ผู้ประสานงานระบบให้คำปรึกษาในการควบคุมคุณภาพภายใน	7 (63.64)	4 (36.36)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4.64
3. โปรแกรมตรวจวัดอุปกรณ์การใช้งานและประมวลผลข้อมูลได้อย่างมีประสิทธิภาพ	8 (72.73)	3 (27.27)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4.72
4. โปรแกรมมีรูปแบบเหมาะสมและใช้งานได้ง่าย	8 (72.73)	3 (27.27)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4.72
5. โปรแกรมเรียกใช้งานได้สะดวกและแสดงผลได้อย่างรวดเร็ว	7 (63.64)	4 (36.36)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4.72

ตารางที่ 2 ผลสำรวจความพึงพอใจของบุคลากรหน่วยงาน จำนวน 11 แห่ง ที่มีต่อโปรแกรม Nongmamong Blood Glucose Meter IQC Online (ต่อ)

รายละเอียด	จำนวนระดับความพึงพอใจ (ร้อยละ)					จำนวนเฉลี่ย
	มากที่สุด	มาก	ปานกลาง	น้อย	น้อยที่สุด	
6. โปรแกรมมีการประมวลผลข้อมูลได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ	7 (63.64)	4 (36.36)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4.72
7. โปรแกรมช่วยลดขั้นตอนการทำงานและลดความผิดพลาดของการบันทึกข้อมูล	9 (81.82)	2 (18.18)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4.82
8. โปรแกรมช่วยพัฒนาการควบคุมคุณภาพเครื่องตรวจวัดน้ำตาลในเลือดชนิดพกพาให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น	8 (72.73)	3 (27.27)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4.72
9. การกำหนดสิทธิ์ (Username Account) ในการใช้งานโปรแกรมมีความปลอดภัย	5 (45.5)	6 (54.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4.45
10. ความพึงพอใจโดยรวมต่อระบบบริหารจัดการควบคุมคุณภาพเครื่องตรวจวัดน้ำตาลในเลือดชนิดพกพา	8 (72.73)	3 (27.27)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4.72
ระดับความพึงพอใจต่อการให้บริการ						4.69

ผล

จากผลการทดสอบโปรแกรม Nongmamong Blood Glucose Meter IQC Online พบว่าโปรแกรมทำงานได้อย่างถูกต้องตรงตามความต้องการ ได้แก่ การใช้งานระบบของแต่ละบุคคลตาม Username และ Password ถูกต้องตามที่กำหนด เก็บรวบรวมข้อมูลที่บันทึกเข้าระบบได้ถูกต้องครบถ้วน สามารถวิเคราะห์ข้อมูล Mean, SD และ % CV สร้าง Levey-Jennings Control Chart ได้ถูกต้องและจัดทำรายงานสรุปผลรายหน่วยงานได้ตามรูปแบบที่ต้องการ มีการแจ้งเตือนใน Line Notify ทันที เมื่อมีการบันทึกผลเข้าระบบ ผลการควบคุมคุณภาพอยู่นอกช่วงที่ยอมรับแถบทดสอบและสารควบคุมคุณภาพหมดอายุ เมื่อประเมินผลระบบโดยการเปรียบเทียบขั้นตอนและระยะเวลาในการดำเนินการของระบบแบบดั้งเดิมกับโปรแกรม พบว่าระบบดั้งเดิมผู้ใช้งานต้องดำเนินการทั้งหมด 14 ขั้นตอน ขณะที่โปรแกรมมีขั้นตอนที่ผู้ใช้งานต้องดำเนินการเพียง 1 ขั้นตอน ลดขั้นตอนจากเดิมได้

13 ขั้นตอน หรือร้อยละ 93 การเปรียบเทียบระยะเวลาพบว่าระบบดั้งเดิมใช้ระยะเวลารวมทั้งหมด 40 นาที ในขณะที่โปรแกรมใช้ระยะเวลารวมทั้งหมด 5 นาที ลดระยะเวลาจากเดิม 35 นาที หรือร้อยละ 88 และจากผลการสำรวจความพึงพอใจของผู้มีสิทธิ์ใช้งานโปรแกรมทั้งหมด 11 หน่วยงาน ในเครือข่ายบริการสุขภาพ พบว่าได้คะแนนความพึงพอใจเฉลี่ย 4.69 แปลความระดับความพึงพอใจได้ระดับความพึงพอใจมากที่สุด โดยรู้สึกว่าการช่วยลดขั้นตอนการทำงานและลดความผิดพลาดของการบันทึกข้อมูล มีค่าเฉลี่ยของผลคะแนนสูงที่สุด คือ 4.82 คะแนน

วิจารณ์

โปรแกรม Nongmamong Blood Glucose Meter IQC Online เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสำหรับองค์กรที่ต้องการปรับปรุงประสิทธิภาพและประสิทธิผลของกระบวนการตรวจสอบการควบคุมคุณภาพภายใน ซึ่งสอดคล้องกับปัจจุบันที่เทคโนโลยีและ

การประยุกต์ใช้ Internet of Things กำลังพัฒนาและมีความหลากหลายมากขึ้น^(13,14) การนำระบบโปรแกรมมาใช้ในการติดตามการควบคุมคุณภาพภายในแบบออนไลน์สำหรับเครื่องวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพาในเครือข่าย โดยระบบจะทำการวิเคราะห์ข้อมูล IQC และแสดงผลในรูปแบบกราฟและรายงาน ช่วยให้ผู้ใช้งานสามารถติดตามผล IQC และวิเคราะห์ข้อมูลย้อนหลังได้อย่างง่าย ตลอดจนแจ้งเตือนเมื่อผลการวัด IQCอยู่นอกช่วงที่ยอมรับ ช่วยให้มั่นใจว่าผลการตรวจวิเคราะห์ที่ได้มีคุณภาพน่าเชื่อถือ สามารถใช้ในการดูแลรักษาผู้ป่วยได้อย่างปลอดภัย ในขณะที่บุคลากรและองค์กรได้ประโยชน์จากการลดความซ้ำซ้อนของระบบงาน รวมทั้งช่วยลดค่าใช้จ่ายขององค์กรจากการใช้ทรัพยากรสิ้นเปลืองต่างๆ จึงมีข้อดีหลายประการเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการแบบดั้งเดิม ได้แก่ ลดความเสี่ยงของข้อผิดพลาดจากการบันทึกข้อมูลด้วยมือผ่านการตรวจสอบข้อมูลและการส่งข้อมูลทางอิเล็กทรอนิกส์ ลดขั้นตอนและระยะเวลาในการดำเนินงาน สามารถตรวจสอบผลและวิเคราะห์ข้อมูลการควบคุมคุณภาพได้รวดเร็วขึ้น สามารถสื่อสารข้อมูลการตรวจสอบคุณภาพได้อย่างมีประสิทธิภาพและแก้ไขปัญหาได้ทันทีที่แต่ประสิทธิภาพของโปรแกรมอาจขึ้นอยู่กับความถูกต้องของข้อมูลที่กรอกเข้าระบบ รวมถึงประสบการณ์และความคุ้นเคยกับเทคโนโลยีของผู้ใช้ อีกทั้งจำเป็นต้องใช้การเชื่อมต่ออินเทอร์เน็ตเพื่อใช้งาน อาจเป็นข้อจำกัดสำหรับผู้ใช้ที่ไม่มีการเข้าถึงอินเทอร์เน็ตหรือมีการเชื่อมต่อที่ไม่เสถียรและรูปแบบการประมวลผล อาจไม่รองรับกับเครื่องวัดระดับน้ำตาลในเลือดรุ่นที่มีการเปลี่ยนช่วงค่าความเข้มข้นสารควบคุมภาพบ่อย ดังนั้นควรรวบรวมข้อเสนอแนะจากผู้ใช้และผู้มีส่วนได้เสียอื่นๆ เพื่อปรับปรุงโปรแกรมให้มีประสิทธิภาพและตรงกับความต้องการของผู้ใช้งานต่อไป

นอกจากนี้โปรแกรม Nongmamong Blood Glucose Meter IQC Online เป็นเครื่องมือที่ไม่ต้องมีค่าใช้จ่ายหรือข้อผูกมัดทางการค้ากับบริษัทผู้จำหน่ายเครื่องตรวจและแถบทดสอบ สามารถนำไปใช้กับทุกหน่วยงานโดยไม่จำเพาะกับยี่ห้อของเครื่องตรวจและแถบทดสอบ

สรุป

จากการทดสอบและประเมินผลโปรแกรม Nongmamong Blood Glucose Meter IQC Online บ่งชี้ว่าโปรแกรมมีคุณสมบัติและประสิทธิภาพตรงตามวัตถุประสงค์ สามารถนำมาใช้ในการบริหารจัดการระบบการควบคุมคุณภาพภายในเครื่องตรวจวัดน้ำตาลในเลือดชนิดพกพาในเครือข่ายบริการสุขภาพ อำเภอนองมะโมงได้อย่างมีประสิทธิภาพ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ นายแพทย์มนตรี หนองคาย ผู้อำนวยการโรงพยาบาลนองมะโมง ที่ให้คำแนะนำและแนวคิดต่างๆ ในการจัดทำโปรแกรมสำเร็จตามวัตถุประสงค์ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ผู้ใช้งานเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพาในเครือข่ายสุขภาพอำเภอนองมะโมง ที่ให้ความร่วมมือในการควบคุมคุณภาพเครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพาเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

1. สำนักสื่อสารความเสี่ยงและพัฒนาพฤติกรรมสุขภาพ. กรมควบคุมโรค ผนวกวันเบาหวานโลก 2566 มุ่งเน้นให้ความรู้ประชาชนถึงความเสี่ยงโรคเบาหวาน และหากตรวจพบก่อนจะลดภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงได้. [ออนไลน์]. 2566; [สืบค้น 6 ก.ค. 2567]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://ddc.moph.go.th/brc/news.php?news=38403&deptcode=brc&news_views=2606.
2. Reutrakul S, Deerochanawong C. Diabetes in Thailand: status and policy. Curr Diab Rep. [serial online]. 2016; [cited 2024 Jul 7]; 16(3): 28. [10 screens]. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26894266>.
3. ราชวิทยาลัยอายุรแพทย์แห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์. แนวทางเวชปฏิบัติสำหรับโรคเบาหวาน 2566. [ออนไลน์]. 2566; [สืบค้น 6 ก.ค. 2567]; [282 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://drive.google.com/file/d/1OWot_is09sIDaR1f8L-Af6DzIAvToA-h/view.

4. ราชวิทยาลัยอายุรแพทย์แห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์. แนวทางเวชปฏิบัติสำหรับโรคเบาหวาน 2560. พิมพ์ครั้งที่ 3. [ออนไลน์]. 2560; [สืบค้น 16 มิ.ย. 2567]; [212 หน้า]. เข้าถึงได้ที่ URL: <https://w2.med.cmu.ac.th/nd/wp-content/uploads/2019/11/Dm60.pdf>.
5. สมาคมโรคเบาหวานแห่งประเทศไทย. แนวทางเวชปฏิบัติสำหรับโรคเบาหวาน 2566. [ออนไลน์]. 2566; [สืบค้น 6 ก.ค. 2567]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้ที่ URL: <https://www.dmthai.org/new/index.php/sara-khwam-ru/bukhlakr-thangkar-phaethy/cpg/naewthang-wech-ptibati-sah-rab-rokh-bea-hwan-2567>
6. นวพรรณ จารุรักษ์, วรณิกา มโนรมณ์, บรรณาธิการ. การให้บริการทางห้องปฏิบัติการ ณ จุดที่ดูแลผู้ป่วยสำหรับประเทศไทย. กรุงเทพฯ: สมาคมพยาธิวิทยาคลินิกไทย; 2549. หน้า 50-62, 80-97.
7. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.). ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง กลุ่มเครื่องมือแพทย์หรือเครื่องมือแพทย์ที่ผู้ผลิตหรือผู้นำเข้าต้องแจ้งรายการละเอียด (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2563. [ออนไลน์]. 2564; [สืบค้น 5 ก.ค. 2567]; [8 หน้า]. เข้าถึงได้ที่ URL: <https://medical.fda.moph.go.th/relevant-laws-and-standards/law-03>.
8. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง การจัดเครื่องมือแพทย์ตามระดับความเสี่ยง พ.ศ. 2562. [ออนไลน์]. 2562; [สืบค้น 21 ม.ค. 2567]; [14 หน้า]. เข้าถึงได้ที่ URL: <https://medical.fda.moph.go.th/relevant-laws-and-standards/other-85>.
9. วรณิกา มโนรมณ์, และคณะ. คู่มือการใช้เครื่องตรวจน้ำตาลในเลือดชนิดพกพา. กรุงเทพฯ: สภาเทคนิคการแพทย์; 2556. หน้า 27-36.
10. นภาพร อภิรัตน์เมธีกุล, วันวิสาข์ ตริบุพชาติสกุล, ครรชิต คงรส. ผลกระทบของอุณหภูมิ ความชื้น และชนิดของตัวอย่างเลือดต่อความถูกต้องของผลการตรวจวัดน้ำตาลด้วยเครื่องตรวจวัดแบบพกพา. พิษณุโลก: คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร. [ออนไลน์]. 2562; [สืบค้น 21 ม.ค. 2567]; [52 หน้า]. เข้าถึงได้จาก URL: <https://nuir.lib.nu.ac.th/dspace/bitstream/123456789/4758/1/NapapornApi-ratmateekul.pdf>.
11. Mathew TK, Zubair M, Tadi P. Blood glucose monitoring. In: StatPearls. [online]. 2023; [cited 2024 Jun 5]; [13 screens]. Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555976>.
12. Best JW, Kahn JV. Research in education. 7th ed. Boston: Allyn and Bacon; 1993. p. 190.
13. Gubbi J, Buyya R, Marusic S, Palaniswami M. Internet of Things (IoT): a vision, architectural elements, and future directions. Future Gener Comput Syst 2013; 29(7): 1645-60.
14. Rghioui A, Lloret J, Harane M, Oumnad A. A smart glucose monitoring system for diabetic patient. Electronics. [serial online]. 2020; [cited 2024 Jun 5]; 9(4): 678. [18 screens]. Available from: URL: <https://doi.org/10.3390/electronics9040678>

The Effects of Nongmamong Blood Glucose Meter IQC Online Program for Quality Control Management System of Blood Glucose Meter In Nongmamong District Healthcare Service, Chainat

Supattra Suwansiri and Wittaya Juntaroje

Nongmamong Hospital, Nong Mamong District, Chainat 17120, Thailand

ABSTRACT Healthcare providers widely use portable blood sugar meters, since they are easy to use and allow quick results. Internal quality control is crucial to prevent errors and ensure accurate test results, we therefore developed the Nongmamong Blood Glucose Meter IQC Online Program to improve the efficiency of the internal quality control results verification process in place of traditional paper records. Using the MySQL database, PHP programming language, and the Webserver Apache system running on the Linux operating system, connected to LINE Notify to record, track and analyze the results of internal quality control of twelve collaboration institutions in the Nong Mamong District Healthcare Network. From the evaluation, the program showed efficiency in collecting data, analyzing results, and alerting when there was abnormal data, and summarizing accurate result reports. User feedback indicated a high level of satisfaction with the system. This was because the process could be improved to reduce data recording errors. Work steps were reduced by 93% and time was reduced by 88% compared to the traditional system. It was also cost-effective, easy to use, flexible, suitable for the hospital context, and could be developed further. This indicates the potential for widespread use in other healthcare centers.

Keywords: Portable blood sugar meter, Internal quality control, Online internal control program

การพิจารณาปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อความน่าจะเป็น ในการตัดสินใจยอมรับผิดพลาดของห้องปฏิบัติการ ทดสอบและสอบเทียบ

โลมไสล วงศ์จันทา

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 นครสวรรค์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อำเภอเมือง นครสวรรค์ 60000

บทคัดย่อ การตัดสินใจผลการทดสอบทางห้องปฏิบัติการมีความสำคัญ เพราะส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคและผู้ผลิต เป็นที่ทราบกันว่าทุกการวัดอาจมีข้อผิดพลาดอยู่ ปี ค.ศ. 2006 สถาบันมาตรฐานแห่งชาติอเมริกา (American National Standards Institute, ANSI) ได้เผยแพร่เอกสาร ANSI/NCSL Z540.3 กำหนดความน่าจะเป็นในการยอมรับผิดพลาด (Probability of False Acceptance, PFA) ไม่ควรเกินร้อยละ 2 การศึกษานี้เพื่อแสดงปัจจัยสำคัญต่อความเสี่ยงที่จะตัดสินใจยอมรับผิดพลาด ทำโดยสืบค้นข้อมูลที่เกี่ยวข้องจากเอกสารวิชาการที่เผยแพร่ ผลการศึกษาพบว่าปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดความเสี่ยงที่จะตัดสินใจยอมรับผิดพลาดมี 2 ปัจจัย คือ ความสามารถในการวัดของห้องปฏิบัติการและความสามารถของกระบวนการผลิต หากห้องปฏิบัติการมีค่าอัตราส่วนระหว่างค่ามาตรฐานกับความไม่แน่นอนในการวัด (Test Uncertainty Ratio, TUR) ตั้งแต่ 4.6:1 ขึ้นไป หรือกระบวนการผลิตมีค่าความน่าเชื่อถือที่ผลิตกันจะมีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน (End-of-Period-Reliability, EOPR) ตั้งแต่ร้อยละ 89 ขึ้นไป เพียงอย่างใดอย่างหนึ่ง จะทำให้ความเสี่ยงการตัดสินใจยอมรับผิดพลาดไม่เกินร้อยละ 2 ดังนั้นห้องปฏิบัติการทดสอบและสอบเทียบ ภายใต้การรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 สามารถกำหนดกฎการตัดสินใจ โดยพิจารณาเฉพาะปัจจัยด้านความสามารถในการวัดของห้องปฏิบัติการ ไม่พิจารณาปัจจัยด้านความสามารถของกระบวนการผลิตได้ หากห้องปฏิบัติการมีความสามารถในการวัดที่ดีเพียงพอ ทั้งนี้ห้องปฏิบัติการควรแน่ใจว่าการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดได้คำนึงถึงตัวแปรที่สำคัญอย่างครบถ้วน นอกจากนี้ผู้ปฏิบัติควรมีความรู้ ความเข้าใจ เรื่องธรรมชาติของการวัดและฟังก์ชันความหนาแน่นความน่าจะเป็น (Probability Density Function, PDF) เพื่อนำไปสู่การกำหนดกฎการตัดสินใจผลการทดสอบหรือสอบเทียบที่น่าเชื่อถือและเป็นที่ยอมรับทั้งสองฝ่าย คือ ห้องปฏิบัติการและผู้ใช้บริการ

คำสำคัญ: ความน่าจะเป็นในการยอมรับผิดพลาด, กฎการตัดสินใจ, อัตราส่วนระหว่างค่ามาตรฐานกับค่าความไม่แน่นอนในการวัด, ค่าความน่าเชื่อถือที่ผลิตกันจะมีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน

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

Received: 2 August 2024

Revised: 2 January 2025

Accepted: 17 January 2025

บทนำ

มาตรฐาน ISO/IEC 17025 คือมาตรฐานสากลว่าด้วยความสามารถของปฏิบัติการในการทดสอบ/สอบเทียบ ที่สามารถทวนสอบได้ไปถึงค่าความถูกต้องจากหน่วยมูลฐาน (SI Unit) ข้อกำหนดของมาตรฐานเป็นเครื่องมือที่จะช่วยสร้างความเชื่อมั่นในความแม่นยำและประสิทธิภาพของการวัด/การทดสอบของห้องปฏิบัติการ ดังนั้นห้องปฏิบัติการทดสอบ/สอบเทียบ ที่ผ่านการรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025 จากหน่วยรับรอง เป็นการยืนยันว่าห้องปฏิบัติการได้มีการดำเนินงานภายใต้ระบบคุณภาพ รายงานผลการทดสอบ/สอบเทียบที่ออกโดยห้องปฏิบัติการมีความถูกต้อง เชื่อถือได้ กรณีที่ตัวอย่างทดสอบเป็นสินค้านำเข้าหรือส่งออก ห้องปฏิบัติการผ่านการรับรอง ISO/IEC 17025 จะได้รับการยอมรับระหว่างประเทศต่างๆ โดยผลการทดสอบและใบรับรองจะได้รับการยอมรับจากประเทศหนึ่งไปยังอีกประเทศหนึ่ง โดยไม่ต้องทดสอบตัวอย่างซ้ำ เป็นการช่วยส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ⁽¹⁾

ปัจจุบันมาตรฐาน ISO/IEC 17025 มีการเปลี่ยนเวอร์ชันจาก ISO/IEC 17025:2015 เป็น ISO/IEC 17025:2017 สารสำคัญที่มีการเปลี่ยนแปลง คือข้อกำหนดในมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2015 ห้องปฏิบัติการสามารถรายงานผลการทดสอบ/สอบเทียบเป็นค่าที่วัดได้ และต้องรายงานค่าความไม่แน่นอนในการวัดเมื่อลูกค้าร้องขอ โดยห้องปฏิบัติการไม่จำเป็นต้องแปลผลการทดสอบ แต่ในมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 ข้อที่ 7.1.3 กำหนดว่า เมื่อลูกค้าร้องขอให้ห้องปฏิบัติการรายงานความสอดคล้องเกี่ยวกับผลการทดสอบหรือสอบเทียบกับคุณลักษณะ (specification) หรือเกณฑ์มาตรฐาน (standard) (เช่น ผ่าน/ตกอยู่ในช่วงมาตรฐาน/อยู่นอกช่วงมาตรฐาน เป็นต้น) คุณลักษณะหรือเกณฑ์มาตรฐานและกฎการตัดสิน (Decision Rule) ต้องกำหนดไว้ชัดเจน ห้องปฏิบัติการต้องแจ้งกฎการตัดสินและทำการตกลงกับลูกค้า และข้อที่ 7.8.6.1 กำหนดว่า หากมีการรายงานความสอดคล้องกับคุณลักษณะหรือมาตรฐาน ห้องปฏิบัติการต้องจัดทำเอกสารกฎการตัดสินที่ใช้ โดยคำนึงถึงระดับความเสี่ยง

(เช่น ความเสี่ยงในการยอมรับผิดพลาด การปฏิเสธผิดพลาด และสมมติฐานทางสถิติ) ที่เกี่ยวข้องกับกฎการตัดสินและการประยุกต์ใช้กฎการตัดสิน⁽²⁾ ดังนั้นความเข้าใจ เรื่อง ความน่าจะเป็นในการตัดสินยอมรับผิดพลาด จึงมีความสำคัญอย่างมากสำหรับห้องปฏิบัติการเพื่อการตัดสินผลการทดสอบและรายงานผลการตัดสินที่ถูกต้อง เนื่องจากผลการตัดสินจะส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคและผู้ผลิต กล่าวคือ หากห้องปฏิบัติการตัดสินยอมรับผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพต่ำกว่ามาตรฐาน เรียกว่าการยอมรับผิดพลาด (False Accept)⁽³⁾ เป็นความเสี่ยงของผู้บริโภค (Consumer's Risk) ในการที่จะบริโภคสินค้าที่มีคุณภาพต่ำหรือหากห้องปฏิบัติการตัดสินปฏิเสธผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพตามเกณฑ์ เรียกว่าการปฏิเสธผิดพลาด (False Reject)⁽³⁾ เป็นความเสี่ยงของผู้ผลิต (Producer's Risk) ในการที่จะต้องทำการปรับปรุงคุณภาพผลิตภัณฑ์โดยไม่จำเป็น

ห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่มักใช้เกณฑ์การยอมรับแบบง่าย (Simple Acceptance)⁽⁴⁾ ในการรายงานความสอดคล้องกับเกณฑ์หรือมาตรฐานที่กำหนดไว้ คือการพิจารณาค่าที่วัดได้ หากอยู่ในช่วงเกณฑ์มาตรฐาน (Tolerance Limit) จะตัดสินยอมรับ (accept) และหากค่าที่วัดได้อยู่นอกช่วงเกณฑ์มาตรฐาน จะตัดสินปฏิเสธ (reject) แต่ผู้ปฏิบัติงานทดสอบทางห้องปฏิบัติการทราบดีว่าทุกการวัดอาจมีข้อผิดพลาด และการตัดสินแบบง่ายมักจะมาพร้อมกับคำถามที่ว่า “คุณภาพการวัดนั้นดีเพียงพอหรือไม่” โดยเฉพาะเมื่อผลการวัดอยู่ใกล้ค่าเกณฑ์ยอมรับ ดังนั้นเพื่อให้การรายงานความสอดคล้องมีความถูกต้องมากที่สุด ในปี ค.ศ. 2006 สถาบันมาตรฐานแห่งชาติอเมริกา (ANSI) ได้ออกเอกสาร ANSI/NCSL Z540.3 American National Standard for Calibration-Requirements for the Calibration of Measuring and Test Equipment ข้อกำหนดที่ 5.3 กำหนดให้ความน่าจะเป็นที่ห้องปฏิบัติการจะตัดสินยอมรับผิดพลาดต้องไม่เกินร้อยละ 2 เพื่อคุ้มครองผู้บริโภค⁽⁴⁾ และ ILAC G8-09/2019 Guidelines on Decision Rules and Statements of Conformity

เสนอกฎการตัดสินใจผลการทดสอบ/สอบเทียบ โดยใช้ แถบป้องกัน (Guard Band, w) เพื่อให้ความน่าจะเป็นในการตัดสินใจยอมรับผิดพลาดน้อยกว่าร้อยละ 2⁽⁵⁾

เห็นได้ว่าห้องปฏิบัติการภายใต้การรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 ต้องเปิดช่องทางให้ลูกค้าสามารถร้องขอให้ห้องปฏิบัติการรายงานความสอดคล้องระหว่างผลการทดสอบที่ได้กับเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ เพื่อสามารถนำรายงานผลการทดสอบไปใช้ประโยชน์ได้สะดวก ดังนั้นห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องทำความเข้าใจและเตรียมกฎการตัดสินใจให้ชัดเจน โดยความเสี่ยงในการตัดสินใจยอมรับผิดพลาดไม่ควรเกินร้อยละ 2 ดังนั้นบทวิจารณ์นี้เพื่อแสดงปัจจัยสำคัญต่อความเสี่ยงที่จะทำให้เกิดการตัดสินใจยอมรับผิดพลาด

วิธีการสืบค้นข้อมูล

เรียบเรียงจากเอกสารหลักฐานทางวิชาการที่เกี่ยวข้องที่เผยแพร่ทั่วไป ได้แก่ ข้อกำหนดมาตรฐานสากล (International Standard) ข้อกำหนดมาตรฐานระดับประเทศ (National Standard) แนวทาง (Guideline) การศึกษาวิจัยที่ได้รับการเผยแพร่ในการประชุมสัมมนาเชิงวิชาการนานาชาติ (International Workshop and Symposium) เอกสารที่นำเสนอข้อมูลและรายละเอียดต่างๆ จากเจ้าของผลงานวิชาการ (White Paper) รวมถึงบทความวิชาการที่เผยแพร่ในเว็บไซต์ขององค์กร แล้วทำการวิเคราะห์ เปรียบเทียบ และยกตัวอย่างประกอบโดยมุ่งเน้นให้สอดคล้องกับบริบทห้องปฏิบัติการทดสอบในประเทศไทย

เนื้อหา

มาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 กำหนดให้กฎการตัดสินใจของห้องปฏิบัติการ ต้องคำนึงถึงความเสี่ยงในการตัดสินใจผิดพลาด โดยกฎการตัดสินใจที่ห้องปฏิบัติการใช้ต้องได้รับความเห็นชอบจากลูกค้า⁽²⁾ โดยทั่วไปความน่าจะเป็นในการตัดสินใจยอมรับผิดพลาด ไม่ควรเกินร้อยละ 2 ซึ่งการตัดสินใจยอมรับผิดพลาด หมายถึง การที่ห้องปฏิบัติการทำการวัด/ทดสอบ ตัวอย่างที่คุณภาพต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานแล้วตัดสินใจยอมรับ ข้อกำหนดนี้

จึงให้ความสำคัญกับตัวอย่างภายใต้การทดสอบ/สอบเทียบที่มีคุณภาพต่ำกว่าเกณฑ์

การทดสอบทางห้องปฏิบัติการ เริ่มจากกระบวนการสุ่มตัวอย่าง (sampling) เพื่อให้ได้ตัวอย่าง (sample) ที่เป็นตัวแทนประชากรของผลิตภัณฑ์ทั้งหมดในล็อตการผลิตเดียวกัน โดยมีกระบวนการสุ่มตามหลักวิชาการที่เชื่อถือได้ ดังนั้นมีความเป็นไปได้ 2 สถานการณ์ก. ผู้ผลิตมีกระบวนการผลิตที่มีคุณภาพ ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้จะมีคุณภาพตามเกณฑ์มาตรฐานในสัดส่วนที่มาก มีผลิตภัณฑ์คุณภาพต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานในสัดส่วนที่น้อยกว่า ดังนั้นโอกาสที่จะสุ่มได้ตัวอย่างที่มีคุณภาพต่ำมาทดสอบทางห้องปฏิบัติการมีน้อย หมายถึง โอกาสที่ห้องปฏิบัติการที่จะทำการตัดสินใจยอมรับผิดพลาดมีน้อยลง และ ข. ผู้ผลิตมีกระบวนการผลิตที่ไม่มีคุณภาพ มีผลิตภัณฑ์คุณภาพต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานในสัดส่วนที่มาก ดังนั้นโอกาสที่จะสุ่มได้ตัวอย่างที่มีคุณภาพต่ำมาทดสอบทางห้องปฏิบัติการมีมาก หมายถึง โอกาสที่ห้องปฏิบัติการจะทำการตัดสินใจยอมรับผิดพลาดสูงขึ้น

เมื่อห้องปฏิบัติการทำการทดสอบ/สอบเทียบ และต้องมีความสอดคล้องระหว่างผลการทดสอบ/สอบเทียบกับเกณฑ์มาตรฐานมีความเป็นไปได้ 2 ประการคือ ก. ตัดสินได้ถูกต้อง และ ข. ตัดสินผิดพลาด ซึ่งเป็นไปได้ทั้งการยอมรับผิดพลาดและปฏิเสธผิดพลาด โดยโอกาสที่ห้องปฏิบัติการตัดสินใจผิดพลาดจะเพิ่มมากขึ้นหากความสามารถในการวัดของห้องปฏิบัติการมีน้อยหรือไม่เพียงพอ ซึ่งส่งผลให้โอกาสที่จะตัดสินใจผิดพลาดสูงขึ้นด้วย

ข้อมูลนี้ทำให้ทราบว่าปัจจัยที่ส่งผลต่อการตัดสินใจยอมรับผิดพลาด 2 ปัจจัย คือ ความน่าจะเป็นที่ผู้ผลิตจะผลิตสินค้าที่มีคุณภาพต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐาน และความสามารถของห้องปฏิบัติการ⁽⁶⁾

ความสามารถในการวัด

ปี ค.ศ. 1950 มีการเผยแพร่มาตรฐานทางทหารของประเทศสหรัฐอเมริกา หรือ MIL-STD-120 Gage Inspection⁽⁷⁾ ระบุว่าเครื่องมือวัดที่ใช้ควรมีความแม่นยำเพียงพอ เหมาะสมกับค่าเกณฑ์มาตรฐานของสิ่งที่วัด การใช้เครื่องมือวัดที่มีความแม่นยำน้อยเกินไปจะทำให้

เกิดข้อผิดพลาด และเสียเวลาที่ต้องทำการวัดซ้ำ ในทำนองเดียวกัน การใช้เครื่องมือวัดที่มีความแม่นยำมากเกินไปจะทำให้เกิดค่าใช้จ่ายและเสียเวลาในการวัดที่เกินความจำเป็น โดยได้กำหนดค่าความแม่นยำ (accuracy) ของเครื่องมือที่ใช้ในการวัดควรน้อยกว่า 20% ของค่าเกณฑ์มาตรฐาน (tolerance) และควรใช้เครื่องมือวัดที่มีความแม่นยำ 10% ของค่ามาตรฐานของเกจ (gauge) โดยต้องไม่เสียเวลาในการวัดมากเกินไป หากผลการวัดยอมรับไม่ได้ เนื่องจากอยู่ใกล้ขีดจำกัดของค่ามาตรฐาน อาจมีการตรวจสอบเกจนั้นซ้ำอีกครั้ง ด้วยเครื่องมือวัดที่มีความแม่นยำมากกว่า⁽⁷⁾ กฎนี้เรียกว่า กฎ 10:1 หรือ Gagemaker's Rule⁽⁸⁾ การกำหนดคุณภาพของการวัด เรียกว่า TAR (Test Accuracy Ratio) คือ อัตราส่วนระหว่างค่ามาตรฐานอ้างอิงกับความแม่นยำของเครื่องมือที่ใช้วัด⁽⁸⁾ ห้องปฏิบัติการทางมาตรวิทยา จะกำหนดค่า TAR อย่างน้อย 4:1 หมายถึง ความแม่นยำของเครื่องมือวัดจะไม่เกิน 25% ของเกณฑ์มาตรฐาน⁽⁷⁾ ยกตัวอย่างเช่น มาตรฐานของมาตรวัดแรงดันขนาด 100 psi ต้องมีความแม่นยำไม่เกิน ± 4 psi (96-104 psi) ผู้ผลิตใช้เครื่องมือวัดที่มีความแม่นยำ ± 1 psi เพื่อควบคุมคุณภาพการผลิต (TAR 4:1) ทำให้มาตรวัดแรงดันที่ผ่านการผลิตนี้สามารถอ่านค่าได้ช่วง 99-101 psi อยู่ในช่วงเกณฑ์มาตรฐาน ดังนั้นค่า TAR ยิ่งสูง ยิ่งลดจำนวนผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐาน⁽⁹⁾

ปี ค.ศ. 2006 สถาบันมาตรฐานแห่งชาติอเมริกา (ANSI) ได้ออกเอกสาร ANSI/NCSL Z540.3 American National Standard for Calibration-Requirements for the Calibration of Measuring and Test Equipment โดยข้อกำหนดที่ 5.3 กำหนดให้ความน่าจะเป็นที่ห้องปฏิบัติการจะตัดสินใจยอมรับผิดพลาดต้องไม่เกิน $\leq 2\%$ และการคำนวณนี้ต้องจัดทำเป็นเอกสารไว้ หากไม่สามารถประมาณความน่าจะเป็นนี้ได้ ในทางปฏิบัติห้องปฏิบัติการต้องมีอัตราส่วนระหว่างค่ามาตรฐานกับความไม่แน่นอนในการวัด เท่ากับหรือมากกว่า 4:1 (Test Uncertainty Ratio, TUR $\geq 4:1$)⁽⁴⁾

ISO/IEC 17025:2017 ข้อที่ 3.7 ได้นิยามกฎการตัดสินใจ (decision rule) ว่าเป็นกฎที่อธิบายค่าความ

ไม่แน่นอนในการวัด (Measurement Uncertainty) ของห้องปฏิบัติการประกอบการรายงานความสอดคล้อง ซึ่งเปรียบเทียบระหว่างผลการวัดทางห้องปฏิบัติกับคุณลักษณะหรือเกณฑ์มาตรฐาน⁽²⁾ และในปี ค.ศ. 2019 องค์การระหว่างประเทศเพื่อการรับรองระบบงานตามมาตรฐาน ISO/IEC 17011 หรือ ILAC ได้ออกเอกสารแนวทางปฏิบัติเรื่องกฎการตัดสินใจและการรายงานความสอดคล้อง ILAC-G8:09/2019 Guideline on Decision Rule and Statements of Conformity เพื่อเป็นแนวทางปฏิบัติสำหรับห้องปฏิบัติการในการกำหนดกฎการตัดสินใจผลการทดสอบหรือสอบเทียบ โดยห้องปฏิบัติการสามารถเลือกกฎการตัดสินใจที่เหมาะสมที่สุดโดยคำนึงถึงความเสี่ยงจากการยอมรับผิดพลาดและการปฏิเสธผิดพลาด หากห้องปฏิบัติการมีค่า TUR มากพออาจกำหนดกฎการตัดสินใจโดยใช้แถบป้องกัน แต่หากไม่ใช่ ห้องปฏิบัติการอาจกำหนดกฎการตัดสินใจโดยใช้แถบป้องกัน เพื่อให้ความน่าจะเป็นที่จะตัดสินใจยอมรับผิดพลาดไม่เกินร้อยละ 2⁽⁵⁾

จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่า มีความพยายามที่จะกำหนดความสามารถในการวัด และได้มีการปรับปรุงข้อแนะนำอย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้เพื่อป้องกันการตัดสินใจที่ผิดพลาด

อัตราส่วนระหว่างค่ามาตรฐานกับความไม่แน่นอนในการวัด (TUR)

TUR เป็นดัชนีความสามารถในการวัดของห้องปฏิบัติการ สามารถประมาณได้จากอัตราส่วนระหว่างค่าเกณฑ์มาตรฐานกับค่า TUR คำนวณโดย^(5,10)

กรณีที่เกณฑ์มาตรฐานกำหนดด้านเดียว

$$TUR = \frac{TL}{U}$$

กรณีที่เกณฑ์มาตรฐานกำหนดสองด้าน

$$TUR = \frac{Tupper - Tlower}{2U}$$

กรณีที่เกณฑ์มาตรฐานกำหนดค่าสูงสุด (Maximum Permissible Error, MPE or Emax)

$$TUR = \frac{2(MPE)}{2U} = \frac{MPE}{U}$$

เมื่อ U คือ ค่าความไม่แน่นอนขยาย (Expanded uncertainty)

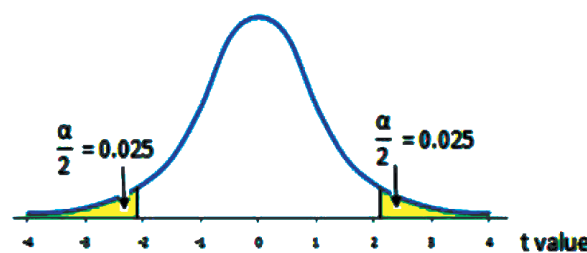
$$U = k \cdot u_c(y)$$

เมื่อ $u_c(y)$ คือ ค่าความไม่แน่นอนในการวัด y (Combined Standard Measurement Uncertainty)

k คือ coverage factor ที่ระดับความเชื่อมั่นต่าง ๆ เมื่อข้อมูลเป็นการแจกแจงแบบปกติ ILAC G8-09:2019 และ JCGM-106:2012 แนะนำให้ใช้ $k = 2$ (ระดับความเชื่อมั่นประมาณร้อยละ 95)⁽⁵⁾ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่า coverage factor ที่ระดับความเชื่อมั่นต่าง ๆ

Confidence level (%)	Significance level (α)	Coverage factor, k
90.00	0.1000	1.645
95.00	0.0500	1.960
95.45	0.0455	2.000
99.00	0.0100	2.576
99.73	0.0027	3.000



หมายเหตุ: ศึกษาเพิ่มเติมได้จากตารางการแจกแจงแบบที (T-Table for two-tailed tests)^(11,12)

ยกตัวอย่าง เกณฑ์มาตรฐานกำหนดให้รายการทดสอบความเป็นกรด-ด่าง ในตัวอย่างน้ำบริโภคน้ำในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท อยู่ในช่วง 6.5–8.5 ห้องปฏิบัติการมีค่า Combined Standard Uncertainty เท่ากับ 0.20 ดังนั้นที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($k = 2$) ค่า TUR ของห้องปฏิบัติการจะเท่ากับเท่าไร

$$\begin{aligned} \text{TUR} &= \frac{(\text{Tupper} - \text{Tlower})}{2U} \\ &= \frac{8.5 - 6.5}{2(2 \times 0.20)} \\ &= 2.5 \end{aligned}$$

TUR ของห้องปฏิบัติการ คือ 2.5:1

ความน่าจะเป็นในการยอมรับผิดพลาด (Probability of False Acceptance, PFA)

ความน่าจะเป็นที่ห้องปฏิบัติการจะตัดสินใจยอมรับผิดพลาด ได้จากฟังก์ชันความหนาแน่นความน่าจะเป็น (Probability Density Function, PDF) การทดสอบทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งได้จากการวัดใดๆ ที่สามารถวัดค่าได้ และมีความไม่แน่นอนในการวัด มักมีการแจกแจงข้อมูลแบบต่อเนื่องและมีรูปแบบการกระจายข้อมูล

แบบปกติ (normal distribution) การประมาณความน่าจะเป็นที่จะตัดสินใจยอมรับผิดพลาด สามารถประมาณได้จากฟังก์ชันการคำนวณ ซึ่งศึกษาเพิ่มเติมได้จากเอกสาร JCM 106:2012⁽¹⁰⁾ หรือประมาณได้จากการเปิดตาราง Z (Z-table)^(13,14)

ยกตัวอย่าง ห้องปฏิบัติการได้ทำการทดสอบความเป็นกรด-ด่าง ตัวอย่างน้ำบริโภคน้ำในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท ได้ผลการทดสอบเท่ากับ 6.8 ความไม่แน่นอนของการวัดเท่ากับ 0.2 มาตรฐานน้ำดื่มกำหนดให้น้ำดื่มมีค่าความเป็นกรด-ด่าง ไม่เกิน 7.5 ± 1.0 (6.5–8.5) ห้องปฏิบัติการตัดสินใจผลการทดสอบ “ยอมรับ” ความน่าจะเป็นที่ห้องปฏิบัติการจะตัดสินใจยอมรับผิดพลาดคิดเป็นร้อยละเท่าไร

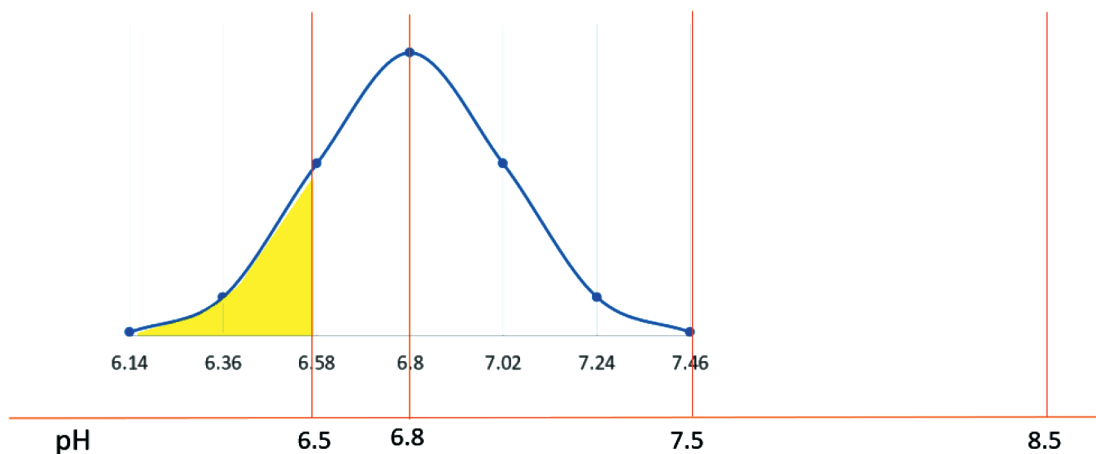
จากโจทย์สามารถแปลเป็นข้อมูลได้ดังนี้

ผลการทดสอบความเป็นกรด-ด่าง 6.8

ความไม่แน่นอนของการวัด 0.2

เกณฑ์ยอมรับ pH 6.5–8.5

จากข้อมูลสามารถสร้างกราฟแสดงการกระจายข้อมูลการทดสอบความเป็นกรด-ด่าง ของห้องปฏิบัติการได้ ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 การกระจายข้อมูลแบบปกติของการวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่มีผลการวัดเท่ากับ 6.8 ความไม่แน่นอนในการวัด 0.2 เทียบกับช่วงเกณฑ์มาตรฐาน 6.5–8.5

จากภาพที่ 1 เห็นได้ว่ามีพื้นที่บางส่วนของกราฟอยู่นอกพื้นที่เกณฑ์มาตรฐาน (พื้นที่ที่แรเงา) ซึ่งเป็นความเสี่ยงที่ห้องปฏิบัติการจะตัดสินใจผิดพลาด เกิดจาก

ความไม่แน่นอนในการวัด ความน่าจะเป็นที่ห้องปฏิบัติการจะตัดสินใจผิดพลาดประมาณได้จาก

$$Z = \frac{6.14 - 6.5}{0.2} = -1.8 \text{ เปิดตาราง Z ได้เท่ากับ } 0.0359$$

ดังนั้นความน่าจะเป็นที่ห้องปฏิบัติการจะตัดสินใจผิดพลาดเท่ากับร้อยละ 3.59

การประมาณค่า PFA สามารถประมาณได้ 2 แบบ⁽¹⁰⁾ คือ ประมาณจากความจะเป็นของการกระจายข้อมูลการทดสอบของห้องปฏิบัติการเพียงด้านเดียว เรียกว่า Specific Consumer's Risk และประมาณจากความน่าจะเป็นของการกระจายข้อมูลการทดสอบของห้องปฏิบัติการ ร่วมกับการกระจายข้อมูลของกระบวนการผลิต เรียกว่า Global Consumer's Risk

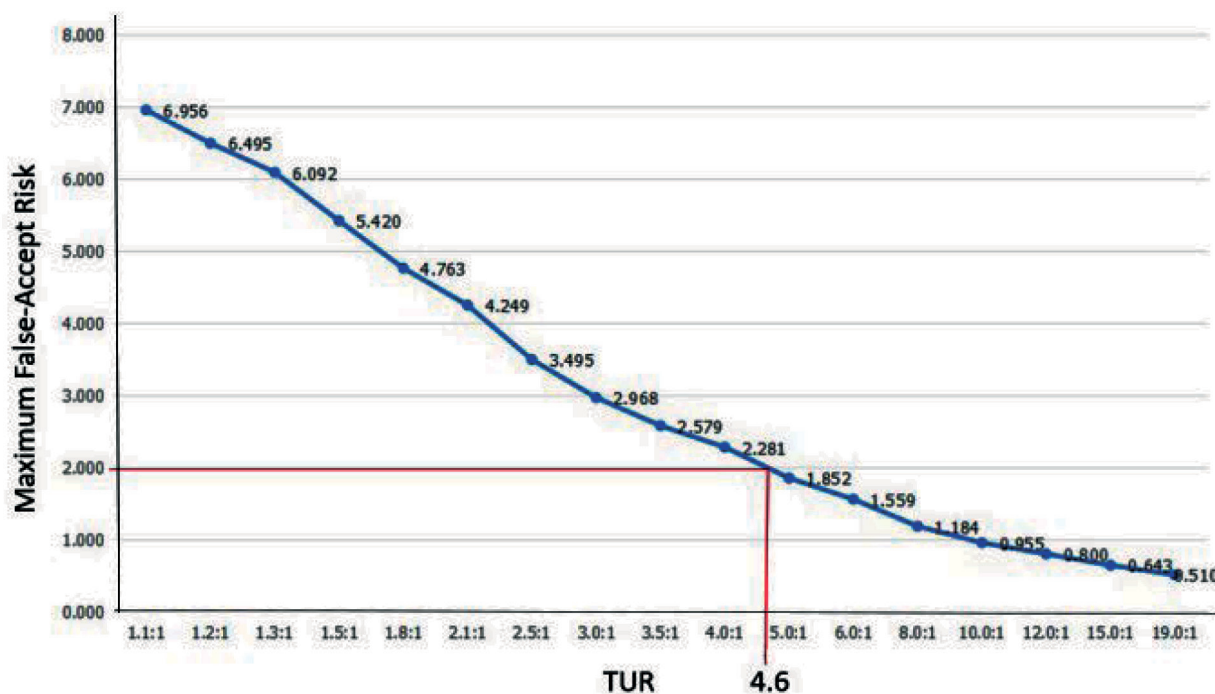
ความสัมพันธ์ระหว่าง กับ PFA และ TUR

ปี ค.ศ. 2008 Michael Dobbert ได้ทำการศึกษากลยุทธ์การใช้แถบป้องกันเพื่อบริหารความเสี่ยงที่จะยอมรับผิดพลาด (A Guard-Band Strategy for Managing False-accept Risk) การพัฒนาสมการที่จะได้ค่าแถบป้องกันบริหารความเสี่ยงในการตัดสินใจยอมรับผิดพลาด ได้จากข้อมูลความเสี่ยงที่ได้จากการจัดการแบบขยาย (Extended managed risk data) แต่ละ TUR กับความเสี่ยงที่จะตัดสินใจผิดพลาด

สูงสุด (Maximum of false-accept risk)⁽¹⁵⁾ เมื่อนำข้อมูลดังกล่าวเขียนเป็นกราฟ ดังแสดงในภาพที่ 2 เมื่อพิจารณาพร้อมกับ ANSI/NCSL Z540.3 พบว่าค่า TUR อย่างน้อย 4.6:1 ขึ้นไป จะทำให้ PFA ไม่เกินร้อยละ 2

ความน่าเชื่อถือที่ผลิตภัณฑ์จะมีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน (In-Tolerance Reliability)

ในกระบวนการผลิตสินค้าหรือผลิตภัณฑ์ใด ๆ ที่มีเกณฑ์มาตรฐานหรือกฎหมายกำหนดคุณภาพของสินค้าไว้ ผู้ผลิตจำเป็นต้องมีกระบวนการเพื่อทดสอบ/สอบเทียบคุณภาพของสินค้า เพื่อให้แน่ใจว่าสินค้าที่ผลิตได้ตลอดช่วงถือการผลิต มีคุณภาพตามเกณฑ์ในสัดส่วนที่ยอมรับได้ เรียกว่า ความน่าเชื่อถือที่ผลิตภัณฑ์จะมีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน (In-Tolerance Reliability หรือ End-of-Period-Reliability, EOPR) ค่า EOPR จึงแสดงถึงความสามารถของกระบวนการผลิตในการสร้างผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพตามเกณฑ์มาตรฐาน⁽⁶⁾ คำนวณโดย



ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเสี่ยงในการตัดสินใจยอมรับผิดพลาดสูงสุดกับ TUR⁽¹⁵⁾

$$EOPR = \frac{\text{จำนวนผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพผ่านเกณฑ์มาตรฐาน}}{\text{จำนวนผลิตภัณฑ์ที่ทดสอบหรือสอบเทียบทั้งหมด}}$$

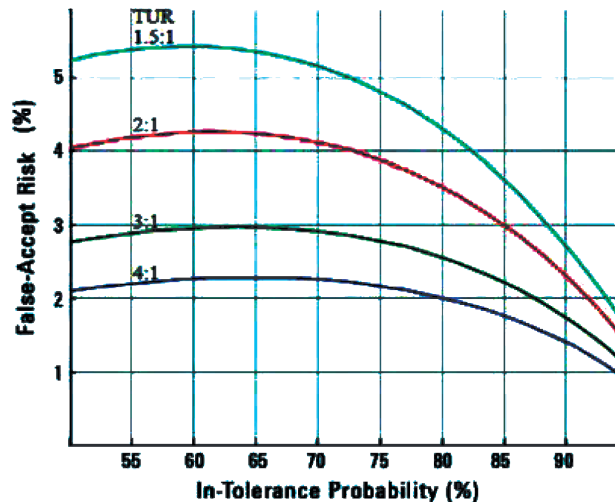
EOPR เป็นข้อมูลเชิงประจักษ์ ประกอบด้วย ข้อมูลจริงเกี่ยวกับการทดสอบหรือสอบเทียบผลิตภัณฑ์ และการใช้งานตลอดรอบการทดสอบหรือสอบเทียบของการผลิตสินค้าแต่ละล็อต เป็นข้อมูลที่สะท้อนถึงประสิทธิภาพของกระบวนการผลิตที่จัดเก็บไว้ก่อนหน้า และใช้อนุมานผลการดำเนินงานในอนาคต ข้อมูล EOPR จะถูกเก็บรวบรวมตามระยะเวลาสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์ย่อย/รุ่นเดียวกัน ด้วยกระบวนการสุ่มตัวอย่าง และเครื่องมือทดสอบหรือสอบเทียบที่เชื่อถือได้ หากกระบวนการเก็บข้อมูลทำได้ถูกต้อง น่าเชื่อถือ จะทำให้การอนุมานประสิทธิภาพการผลิตในอนาคตมีความน่าเชื่อถือ⁽⁶⁾

ยกตัวอย่าง ในการผลิตสินค้ามาตรฐานวัดแรงดัน รุ่น A001 ผู้ผลิตทำการสุ่มตัวอย่างที่ผลิตได้ด้วยระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 90 ได้จำนวนตัวอย่างสอบเทียบ 22 ตัวอย่าง ผลการสอบเทียบ พบตัวอย่างที่มีคุณภาพตามเกณฑ์มาตรฐาน จำนวน 22 ตัวอย่าง คำนวณค่า EOPR หรือ

In-Tolerance จำนวน reliabilities เท่ากับร้อยละ 100 แต่หากมีการสุ่มตัวอย่างลำดับที่ 23 และพบว่ามีการสอบเทียบไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานจะทำให้ค่า EOPR หรือ In-Tolerance Reliabilities เท่ากับร้อยละ 95.7 เป็นต้น

ความสัมพันธ์ระหว่าง In-Tolerance Probability กับ TUR และ PFA

Michael Dobbert ได้ทำการศึกษาความเสี่ยงที่จะยอมรับผิดพลาด (PFA) จากปัจจัยความสามารถในการวัดของห้องปฏิบัติการ (TUR) กับความน่าจะเป็นที่พบตัวอย่างที่มีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน (In-Tolerance Probability) ซึ่งเป็นปัจจัยความสามารถในการผลิต พบว่าสำหรับห้องปฏิบัติการที่มีค่า TUR ใดๆ จะมีความเสี่ยงในการยอมรับผิดพลาดลดลง และเข้าใกล้ร้อยละ 0 เมื่อความน่าจะเป็นที่พบตัวอย่างที่มีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน เข้าใกล้ร้อยละ 100⁽¹⁵⁾ ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างความเสี่ยงในการยอมรับผิดพลาดกับความน่าจะเป็นที่ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้ จะมีคุณภาพตามเกณฑ์มาตรฐาน (In-Tolerance Probability)⁽¹⁵⁾ (กรณีที่ยอมรับผลิตภัณฑ์ (Tolerance Limit) เท่ากับเกณฑ์ที่ยอมรับ (Acceptance Limit))

เมื่อจินตนาการถึงสินค้าที่ผลิตขึ้นหากสินค้าที่ผลิตได้มีคุณภาพตามเกณฑ์มาตรฐานทุกชิ้น (In-Tolerance เท่ากับร้อยละ 100) ทำการสุ่มตัวอย่างทดสอบจะไม่มีตัวอย่างใดถูกตัดสินยอมรับผิดพลาด เนื่องจากการตัดสินยอมรับผิดพลาด คือ การสุ่มได้ตัวอย่างที่มีคุณภาพต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานมาทำการทดสอบแล้วตัดสินยอมรับ⁽¹⁵⁾

สิ่งที่น่าสนใจ คือ เมื่อความน่าจะเป็นที่พบตัวอย่างที่มีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน เข้าใกล้ร้อยละ 0 ความเสี่ยงในการตัดสินยอมรับผิดพลาดลดลงเช่นกัน อธิบายได้ว่าเมื่อผู้ผลิตทำการผลิตสินค้าที่มีคุณภาพต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานจำนวนมาก ความน่าจะเป็นที่พบตัวอย่างที่มีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานลดลง ประชากรตัวอย่างที่กระจายอยู่ใกล้เกณฑ์มาตรฐานลดลง ทำให้การสุ่มเจอตัวอย่างที่มีคุณภาพใกล้เกณฑ์มาตรฐานลดลงด้วย เมื่อกระจายถึงจุดที่ตัวอย่างส่วนใหญ่ไม่อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน การตัดสินยอมรับผิดพลาด เนื่องจากความไม่แน่นอนในการวัดไม่เกิดขึ้นได้⁽¹⁵⁾

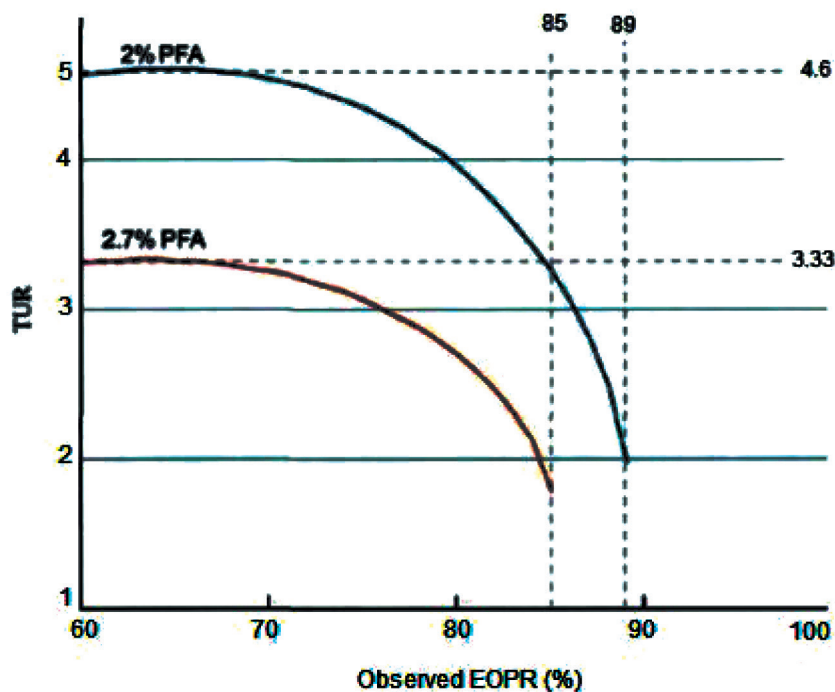
เนื่องจากความเสี่ยงยอมรับผิดพลาดลดลงและเข้าใกล้ร้อยละ 0 เมื่อความน่าจะเป็นที่พบตัวอย่างที่มีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานเข้าใกล้ร้อยละ 100 ดังนั้น ความเสี่ยงยอมรับผิดพลาดสูงสุดสำหรับ TUR ใดๆ

จึงอยู่ช่วงกลางของระดับความน่าจะเป็นที่พบตัวอย่างที่มีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน⁽¹⁵⁾ (จากภาพที่ 3 อยู่ที่ประมาณร้อยละ 60)

ปี ค.ศ. 2011 โครงการมาตรวิทยาและการสอบเทียบขององค์การนาซา (NASA Metrology and Calibration Program) ได้ทำการศึกษาโดยสร้างแบบจำลองข้อมูลเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง PFA และ EOPR พบว่า EOPR ตั้งแต่ร้อยละ 89 ขึ้นไปจะทำให้ PFA ไม่เกินร้อยละ 2 ไม่ว่าห้องปฏิบัติการจะมีความไม่แน่นอนของกระบวนการวัดใดๆ⁽⁶⁾ ดังแสดงในภาพที่ 4

จากภาพที่ 4 อธิบายได้ว่าค่า PFA ร้อยละ 2 มีส่วนโค้งสูงสุดที่ TUR 4.6:1 และค่า EOPR สั้นสุดที่ร้อยละ 89 ขณะที่ PFA ร้อยละ 2.7 มีส่วนโค้งสูงสุดที่ TUR 3.33:1 และค่า EOPR สั้นสุดที่ร้อยละ 85 ข้อมูลนี้บ่งชี้ว่าค่าความไม่แน่นอนของการวัดเป็นตัวแปรหลักสำหรับค่า PFA และการเลือกค่า EOPR ที่ร้อยละ 85 อาจทำให้ไม่บรรลุข้อกำหนด ANSI/NCSL Z540.3⁽⁶⁾

การศึกษาของโครงการมาตรวิทยาและการสอบเทียบขององค์การนาซา แสดงให้เห็นว่า TUR และ EOPR เป็นตัวแปรสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อ PFA ซึ่งเมื่อตัวแปรใดมีค่าที่มากพอจะทำให้ PFA น้อยกว่าร้อยละ 2 ได้โดยไม่จำเป็นต้องคำนึงถึงตัวแปรอีกตัว⁽⁶⁾



ภาพที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า TUR และค่า EOPR เพื่อประมาณค่า PFA⁽⁶⁾

ตัวอย่างเช่น เมื่อ TUR ของกระบวนการทดสอบอยู่ที่ 4.6:1 หรือมากกว่า ค่า PFA จะไม่เกินร้อยละ 2 โดยไม่ขึ้นกับความน่าเชื่อถือของกระบวนการผลิตที่จะผลิตสินค้ามีคุณภาพผ่านเกณฑ์มาตรฐาน หรือหากผู้ผลิตมีกระบวนการผลิตที่ดีมาก โดยค่า EOPR ไม่น้อยกว่าร้อยละ 89 จะทำให้ PFA ไม่เกินร้อยละ 2 โดยไม่ขึ้นกับความสามารถในการวัดของห้องปฏิบัติการเช่นกัน

วิจารณ์

ผลการวิเคราะห์นี้บ่งชี้ว่ามีปัจจัยสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อความเสี่ยงในการตัดสินใจยอมรับผิดพลาดคือ ปัจจัยคุณภาพการวัดของห้องปฏิบัติการและปัจจัยคุณภาพของกระบวนการผลิต โดยกฎการตัดสินใจสามารถพิจารณาจากปัจจัยใดปัจจัยหนึ่ง หากมีค่าที่โดดเด่นมากพอ แต่สิ่งที่สำคัญที่ควรพิจารณา คือ คุณภาพของข้อมูลที่ได้มาเพื่อแสดงคุณภาพของปัจจัยนั้น หากไม่มีคุณภาพเพียงพอจะส่งผลต่อการกำหนดกฎการตัดสินใจของห้องปฏิบัติการ ซึ่งจะกระทบโดยตรงต่อทั้งผู้บริโภคและผู้ผลิต โดยห้องปฏิบัติการอาจจะต้องมีส่วนในความรับผิดชอบต่อผลกระทบที่เกิดขึ้นด้วย ยกตัวอย่างเช่น หากห้องปฏิบัติการหรือลูกค้าประสงค์จะใช้ค่า EOPR

ซึ่งเป็นตัวแปรแสดงความสามารถของกระบวนการผลิตในการประมาณความเสี่ยงในการตัดสินใจยอมรับผิดพลาดห้องปฏิบัติการควรตรวจสอบที่มาของค่า EOPR ที่ลูกค้าแสดงว่าได้มาอย่างไร มีกระบวนการสุ่มตัวอย่างที่น่าเชื่อถือหรือไม่ วิธีการทดสอบ/สอบเทียบของผู้ผลิตเชื่อถือได้หรือไม่ และตัวอย่างที่สุ่มสามารถเป็นตัวแทนของประชากรสินค้าที่ผลิตได้ตลอดช่วงการผลิตของสินค้าทั้งล็อตหรือไม่ เป็นต้น โดยเฉพาะกรณีตัวอย่างนั้นมีข้อกำหนดคุณลักษณะที่ต้องทดสอบหลายรายการ เช่น ตัวอย่างผลิตภัณฑ์สุขภาพ (อาหาร น้ำ เครื่องดื่ม ยา สมุนไพร เครื่องสำอาง ฯลฯ) การเก็บรวบรวมข้อมูลจะมีความซับซ้อนมากยิ่งขึ้น สอดคล้องกับที่ Scott M. Mimbs แห่ง NASA's Kennedy Space Center ได้แนะนำเพื่อให้แน่ใจว่าข้อมูล EOPR มีความถูกต้อง ผู้ผลิตจะต้องมีนโยบายการรวบรวมข้อมูลที่เหมาะสมและมีการควบคุมที่ดี โดยมีข้อกำหนดพื้นฐานในการรวบรวมข้อมูลที่จำเป็น กล่าวคือ กระบวนการทดสอบ/สอบเทียบต้องได้รับการบันทึก ตรวจสอบ และยืนยัน กระบวนการทดสอบ/สอบเทียบต้องมีความเสถียรตลอดช่วงระยะเวลาที่รวบรวมข้อมูล ผู้ผลิตต้องจัดทำเอกสารนโยบายการรวบรวมข้อมูล EOPR โดยระบุเงื่อนไข

กฎการยอมรับและปฏิเสธ รวมถึงค่าเกณฑ์ยอมรับและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน กำหนดขนาดตัวอย่างขั้นต่ำสำหรับประชากรสินค้าที่ผลิต ขั้นตอนวิธีการสุ่มตัวอย่าง ที่มีความสม่ำเสมอ⁽⁶⁾

หากห้องปฏิบัติการประสงค์จะใช้ตัวแปรความสามารถในการวัดของห้องปฏิบัติการ ในการประมาณความเสี่ยงในการตัดสินใจยอมรับผิดพลาด ห้องปฏิบัติการควรพิจารณาที่มาของการประมาณค่าความไม่แน่นอนในการวัดว่ามีความถูกต้องมากน้อยเพียงใด ได้คำนึงถึงตัวแปรที่สำคัญและนำมาเป็นปัจจัยนำเข้าในการคำนวณความไม่แน่นอนในการวัดอย่างครบถ้วนแล้วหรือไม่ โดยแนะนำให้ศึกษาการประมาณความไม่แน่นอนในการวัดเพิ่มเติมจากเอกสารที่กำหนดกฎทั่วไปสำหรับการประเมินและการแสดงความไม่แน่นอนในการวัด (Guide to Expression of Uncertainty in Measurement, GUM)⁽¹⁶⁾ และประเด็นที่ห้องปฏิบัติการอาจรับไว้พิจารณา เพื่อประโยชน์ของผู้บริโภคและการนำรายงานผลการทดสอบ/สอบเทียบทางห้องปฏิบัติการไปใช้ประโยชน์ คือ ห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่มีนโยบายไม่สุ่มตัวอย่าง โดยจะถือว่าตัวอย่างที่ได้รับจากลูกค้าผ่านกระบวนการสุ่มมาแล้ว ดังนั้นรายงานผลการทดสอบทางห้องปฏิบัติการจะมีข้อความกำกับไว้ว่า “รายงานนี้รับรองผลเฉพาะตัวอย่างที่ได้รับเท่านั้น” หรือ “การทดสอบนี้รับรองผลเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทำการทดสอบเท่านั้น” กรณีนี้อาจมีความเหมาะสมหากเป็นตัวอย่างส่งตรวจเพื่อเฝ้าระวังคุณภาพ เช่น การสุ่มเก็บตัวอย่างที่วางจำหน่ายในร้านค้าต่าง ๆ มาทำการทดสอบเพื่อเฝ้าระวังคุณภาพสินค้าหลังการวางจำหน่าย (post-marketing) การรายงานความสอดคล้องจะเป็นการตัดสินคุณภาพเฉพาะตัวอย่างภายใต้การทดสอบเท่านั้น แต่หากตัวอย่างที่ส่งตรวจเป็นตัวอย่างก่อนวางจำหน่าย (pre-marketing) มีวัตถุประสงค์การส่งตรวจเพื่อขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์ตามกฎหมาย หากห้องปฏิบัติการมีนโยบายไม่สุ่มตัวอย่าง การรายงานความสอดคล้องของผลการทดสอบกับเกณฑ์มาตรฐาน อาจไม่สะท้อนคุณภาพของผลิตภัณฑ์ทั้งล็อตการผลิต นอกจากนี้รายงานการทดสอบที่ห้องปฏิบัติการทำการทดสอบต้องสอดคล้องกับเกณฑ์

มาตรฐานกำหนดทุกรายการทดสอบ กรณีที่ห้องปฏิบัติการไม่สามารถดำเนินการทดสอบได้ครบถ้วนตามรายการเกณฑ์มาตรฐานกำหนด การรายงานความสอดคล้องของผลการทดสอบกับเกณฑ์มาตรฐานจะทำได้เฉพาะรายการทดสอบเท่านั้น ไม่สามารถตัดสินคุณภาพผลิตภัณฑ์ตามกฎหมายได้ หากห้องปฏิบัติการเริ่มกระบวนการทดสอบตั้งแต่กระบวนการสุ่มตัวอย่าง จำเป็นต้องนำปัจจัยการสุ่มตัวอย่างมาเป็นตัวแปรหนึ่งในการประมาณค่าความไม่แน่นอนในการวัดด้วย เห็นได้ชัดว่ากรณีนี้ยังมีประเด็นที่ห้องปฏิบัติการและหน่วยงานที่จะนำรายงานผลการทดสอบทางห้องปฏิบัติการไปดำเนินการตามกฎหมายควรหารือร่วมกัน เพื่อหาทางออกที่เหมาะสมและเป็นที่ยอมรับของทุกฝ่าย ได้แก่ ผู้บริโภค ผู้ผลิต ห้องปฏิบัติการ และหน่วยงานที่มีหน้าที่รับผิดชอบตามกฎหมาย เช่น สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ซึ่งมีวัตถุประสงค์ขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์เพื่อสร้างความมั่นใจให้แก่ผู้บริโภคด้านความปลอดภัย (safety) คุณภาพ (quality) ประสิทธิภาพ (efficacy) และการกล่าวอ้าง (claim)⁽¹⁷⁾

ห้องปฏิบัติการทดสอบหรือสอบเทียบ ภายใต้การรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 จำเป็นต้องมีความรู้ ความเข้าใจ เรื่อง ความน่าจะเป็นในการตัดสินใจยอมรับผิดพลาด ซึ่งมีความรู้เรื่องธรรมชาติของการวัด และฟังก์ชันความหนาแน่นความน่าจะเป็น (PDF) เป็นพื้นฐาน ความรู้ความเข้าใจที่ถูกต้องจะนำไปสู่การกำหนดกฎการตัดสินผลการทดสอบหรือสอบเทียบที่น่าเชื่อถือ ความเสี่ยงในการตัดสินใจยอมรับผิดพลาดไม่เกินร้อยละ 2 ตามข้อกำหนด และเป็นที่ยอมรับทั้งสองฝ่าย คือ ห้องปฏิบัติการและผู้ให้บริการ

สรุป

ปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดความเสี่ยงที่จะตัดสินใจยอมรับผิดพลาดมี 2 ปัจจัย คือ ความสามารถในการวัดของห้องปฏิบัติการและความสามารถของกระบวนการผลิต หากห้องปฏิบัติการมีค่า TUR ตั้งแต่ 4.6:1 ขึ้นไป หรือกระบวนการผลิตมีค่า EOPR ตั้งแต่ร้อยละ 89 ขึ้นไป เพียงอย่างเดียวหนึ่ง จะทำให้ความเสี่ยงในการตัดสินใจยอมรับผิดพลาดไม่เกินร้อยละ 2 ดังนั้น เมื่อ

ต้องการรายงานความสอดคล้องของผลการทดสอบหรือสอบเทียบกับเกณฑ์มาตรฐาน ห้องปฏิบัติการภายใต้การรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 ควรพิจารณาข้อกำหนด ANSI/NCSL Z540.3 โดยห้องปฏิบัติการที่มีความสามารถในการวัดที่ดีเพียงพอสามารถกำหนดกฎการตัดสินใจผลการทดสอบหรือสอบเทียบจากความสามารถในการวัดของห้องปฏิบัติการเพียงฝ่ายเดียว (Specific Consumer's Risk) โดยไม่จำเป็นต้องพิจารณาปัจจัยความสามารถของกระบวนการผลิต ทั้งนี้การประมาณค่าความไม่แน่นอนการวัดของห้องปฏิบัติการ ควรได้รับการตรวจสอบให้แน่ใจว่ามีความน่าเชื่อถือและครอบคลุมทุกตัวแปรที่สำคัญ

เอกสารอ้างอิง

1. International Organization for Standardization. ISO/IEC 17025 Testing and calibration laboratories. [online]. [cited 2024 Dec 26]; [1 screen]. Available from: URL: <https://www.iso.org/ISO-IEC-17025-testing-and-calibration-laboratories.html>.
2. ISO/IEC 17025:2017(E). General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. 3rd ed. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2017.
3. สุพล พรหมมาพันธุ์. การพิสูจน์ตัวตนด้วยเทคโนโลยีชีวมาตรกับความเสี่ยงในการละเมิดสิทธิส่วนบุคคล. การพิสูจน์ตัวตนด้วยเทคโนโลยีชีวมาตรกับความเสี่ยงในการละเมิดสิทธิส่วนบุคคล. ว แพทยสารทหารอากาศ. [วารสารออนไลน์]. 2020; [สืบค้น 26 ธ.ค. 2024]; 66(1): [14 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: <https://he02.tci-thaijo.org/index.php/rtafm/article/view/242341/164857>.
4. ANSI/NCSL Z540.3:2006. Requirements for the calibration of measuring and test equipment. America: American National Standard for Calibration; 2006. p. 5.
5. Guidelines on decision rules and statements of conformity: ILAC-G8:09/2019. Australia: International Laboratory Accreditation Cooperation; 2019.
6. Mimbs SM, Kennedy JF. Using reliability to meet Z540.3's 20/0 rule. 2011 NCSL International Workshop and Symposium. [online]. 2011; [cited 2024 Jul 15]: [21 screens]. Available from: URL: <https://ntrs.nasa.gov/api/citations/20110014475/downloads/20110014475.pdf>.
7. Military standard gage inspection: MIL-STD-120. Washington, DC: United States Government Printing Office. [online]. 1951; [cited 2024 Jun 12]: [216 screens]. Available from: URL: https://elsmar.com/pdf_files/Military%20Standards/MIL-STD-120.pdf.
8. Mitutoyo America Corporation. Decision rules, TAR, and TUR. [online]. 2018; [cited 2024 Oct 8]; [2 screens]. Available from: URL: <https://www.mitutoyo.com/webfoo/wp-content/uploads/15005A.pdf>.
9. Griess S. Aircraft tool calibration: What is test accuracy ratio? Lincoln, NE: Duncan Aviation Calibration Services. [online]. 2024; [cited 2024 Aug 8]: [1 screen]. Available from: URL: <https://www.duncanaviation.aero/intelligence/aircraft-tool-calibration-what-is-test-accuracy-ratio>.
10. Joint Committee for Guides in Metrology. Evaluation of measurement data—the role of measurement uncertainty in conformity assessment: JCGM 106:2012:2012. Sèvres: BIPM; 2012.
11. Hogan R. Expanded uncertainty and coverage factors or calculating uncertainty. [online]. 2015; [cited 2024 Sep 2]: [12 screens]. Available

- from: URL: <https://www.isobudgets.com/expanded-uncertainty-and-coverage-factors-for-calculating-uncertainty>.
12. Turney S. Critical values of t for two-tailed tests. [online]. 2023; [cited 2024 Sep 2]: [2 screens]. Available from: URL: <https://www.scribbr.com/statistics/students-t-table>.
 13. Z Table. Z score table, normal distribution table, standard normal table. [online]. [cited 2024 Oct 12]. [13 screens]. Available from: URL: <https://www.ztable.net>.
 14. Z-core calculator. [online]. [cited 2024 Oct 12]. [3 screens]. Available from: URL: <https://www.calculator.net/z-score-calculator.html?c1raw=1499.8&c1mean=1500&c1sd=.12&calctype=zscore&x=Calculate>.
 15. Dobbert M. A guard-band strategy for managing false-accept risk. NCSLI Measure. [online]. 2008; [cited 2024 Jun 4]: [11 screens]. Available from: URL: <https://keysight.zinfi.net/concierge/OEMs/keysight/wwwcontent/Syndication/pdf/MeasurementFundamentalsKR/5991-1267.pdf>.
 16. ISO/IEC Guide 98-3:2008. Uncertainty of measurement-Part 3: guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM:1995). Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2008.
 17. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.). แนวทางการการขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์กับสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.). [ออนไลน์]. 2562; [สืบค้น 26 ธ.ค. 2567]; [25 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://www.nstda.or.th/rqm/images/20190812-_ver3-ap.pdf.

Consideration of Key Factors Affecting the Probability of False Acceptance of Testing and Calibration Laboratories

Lomsalai Wongchanta

Regional Medical Science Center 3 Nakhonsawan, Department of Medical Sciences, Muang District, Nakhonsawan 60000, Thailand

ABSTRACT The decision on laboratory test results is important because it affects consumers and manufacturers. It is well known that all measurements contain errors. In 2006, the American National Standards Institute (ANSI) issued ANSI/NCSL Z540.3 which specifies that the Probability of False Acceptance (PFA) should not exceed 2%. This study aims to elucidate the key factors affecting a false acceptance risk. The study was conducted by searching for academic information from widely published documents. The reviews found two important factors affecting the risk of false acceptance: 1) the capability of the laboratory measurements and 2) the capability of the product manufacturing process. If the laboratory has a Test Uncertainty Ratio (TUR) of 4.6:1 or higher, or the production process has an End-of-Period-Reliability (EOPR) of 89% or higher, the risk of false acceptance will not exceed 2%. Therefore, a testing and calibration laboratory accredited with ISO/IEC 17025:2017 can set the decision rule that considers only the laboratory measurement capability factors, without considering the production process capability factors, if the laboratory has sufficient measurement capability. The laboratory should ensure that the estimation of measurement uncertainty takes into account all important variables. In addition, practitioners should have knowledge and understanding of the nature of measurement and Probability Density Function (PDF) to determination of reliable and acceptable decision rules for both the laboratories and the customers.

Keywords: Probability of false acceptance, Decision rule, Test uncertainty ratio, End-of-period-reliability

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	Yongyot Thammawut Ballang Uppapong	Phichet Banyati
Technical Advisor	Pimjai Naigowit Panadda Silva Sumol Pavitranon	Busarawan Sriwanthana Prapai Wongsinkongman
Executive Editor	Supaporn Phumiamorn	
Editor	Duanthanorm Promkhatkaew	
Assistant Editor	Siripakorn Sangkitporn Kriangsak Ruchusatsawat	Nuanjun Wichukchinda Siriphan Saeng-Aroon
Editorial Board	Pilaipan Puthavathana Prasert Auewarakul Danai Tiwawech Suwanna Charunut Padet Siriyasatien Pornpimol Kongtip Srisurang Tantimavanich Sunee Sirivichayakul Chanitra Thuwajit Pintip Pongpech Salakchit Chutipongvivate Usavadee Thavara Suthon Vongsheree Wichuda Chittangkura Supanee Duangteraprecha Nuanchawee Wetprasit Wantana Paveenkittiporn Uryakorn Chansang	Mahidol University Mahidol University Naresuan University Huachiew Chalermprakiet University Chulalongkorn University Mahidol University Mahidol University Chulalongkorn University Mahidol University Independent Scholar Independent Scholar Independent Scholar Independent Scholar Independent Scholar Independent Scholar Independent Scholar Independent Scholar
Administration	Numfon Noiprasert Aphimon Jiraphongsathorn Navy Srivarom Pawinee Sukcharoen Apisara Khomduean	Department of Medical Sciences Department of Medical Sciences Department of Medical Sciences Department of Medical Sciences 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.dmssc@dmssc.mail.go.th	
Printed by	Thanaroongkarnpim Co., Ltd. 457/6-7 Phra Sumen Road, Bangkok 10200 Tel. 0-2282-6033-4	



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences



 <https://bit.ly/BullDmsc>