



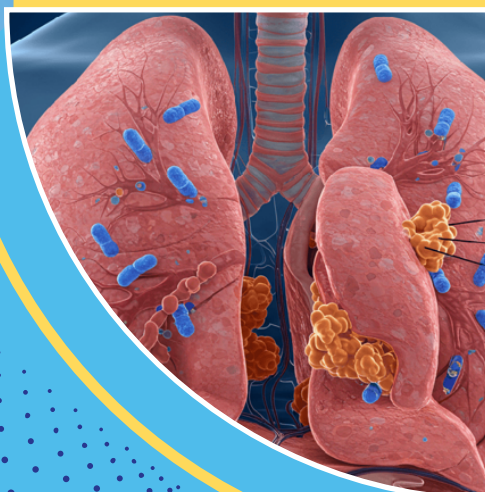
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

วารสาร

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 67 ฉบับที่ 2 เมษายน - มิถุนายน 2568 • Vol. 67 No. 2 April - June 2025



ISSN 3057-1286 (Print)

ISSN 3057-1308 (Online)

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จัดทำโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เพื่อเผยแพร่ผลงานวิชาการด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ทุกสาขา

[illegible]

ที่ปรึกษาด้านบริหาร	นพ.ยงยศ ธรรมวุฒิ	นพ.พิเชฐ บัญญัติ
	นพ.บัลลังก์ อุปพงษ์	นพ.วัชรพงษ์ คำหล้า

ที่ปรึกษาด้านวิชาการ	นางพิมพ์ใจ นัยโกวิท ดร.ปนัดดา ชิลวา ดร.สมล ปวีตรานนท์	ดร.บุษาวรรณ ศรีวรรณะ ดร.ประไพ วงศ์ลิ้นคณัน
----------------------	---	---

บรรณาธิการบริหาร ดร.สุภาพร ภูมิอมร

บรรณาธิการ ดร.เตือนถนอม พรหมขัติแก้ว

รองบรรณาธิการ	นางสิริภากร แสงกิจพร	ดร.นวลจันทร์ วิจักขณ์จินดา
	ดร.เกรียงศักดิ์ ฤชศาตวัต	ดร.สิริพรรณ แสงอรุณ

คณะบรรณาธิการ	ศ.เกียรติคุณ ดร.ไพโรจน์ พุฒินะ	มหาวิทยาลัยมหิดล
	ศ.ดร.นพ.ประเสริฐ เอื้อวรากุล	มหาวิทยาลัยมหิดล
	ดร.दनัย ทิวาเวช	มหาวิทยาลัยนเรศวร
	ภญ.สุวรรณา จารุสุข	มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
	ศ.ดร.นพ.เผด็จ สิริยะเสถียร	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
	ศ.ดร.พรพิมล กองทิพย์	มหาวิทยาลัยมหิดล
	รศ.ดร.ศรีสุรางค์ ต้นติมานิช	มหาวิทยาลัยมหิดล
	ดร.สุณี ศิริวิชัยกุล	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
	ศ.ดร.พญ.ชนิตรา ธูจิตต์	มหาวิทยาลัยมหิดล
	รศ.ดร.ภญ.พัฒนทิพย์ พงษ์เพชร	นักวิชาการอิสระ
	ดร.สลักจิต ชุตินพวิเวท	นักวิชาการอิสระ
	ดร.อุษาวดี ถาวระ	นักวิชาการอิสระ
	นายสุธน วงษ์ขีรี	นักวิชาการอิสระ
	นางวิษชุดา จิตตางกูร	นักวิชาการอิสระ
	ดร.สุภาณี ดวงธีรปรีชา	นักวิชาการอิสระ
	รศ.ดร.นวลนวี เวชประสิทธิ์	นักวิชาการอิสระ
	ดร.วันทนา ปวีณกิตติพร	นักวิชาการอิสระ
	ดร.อรุณกร จันทร์แสง	นักวิชาการอิสระ

ฝ่ายจัดการ	นางสาวน้ำฝน น้อยประเสริฐ	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
	นางสาวอภิมน จีรพงศ์ธร	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
	นายนาวิ ศรีวรรมย์	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
	นางสาวภาวิณี สุขเจริญ	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
	นางสาวอภิสรา โคมเตือน	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
	นางสาวชไมพร ชุมจันทร์	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

สำนักงานวารสาร สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
88/7 ซอยติวานนท์ 14 ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000
โทร. 0-2951-0000 ต่อ 99662 โทรสาร 0-2951-1297
E-mail : bull.dmsc@dmso.mail.go.th

พิมพ์ที่ บริษัท อนุธรรณการพิมพ์ 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 2 เมษายน - มิถุนายน 2568

Vol. 67 No. 2 April - June 2025

สารบัญ

หน้า

นิพนธ์ต้นฉบับ

- ความสัมพันธ์ระหว่างการลดลงของน้ำหนักกับความเจ็บปวดหลังผ่าตัดช่องท้องในหนูไมซ์
สายพันธุ์ BALB/c และ C57BL/6 163
ขวัญชนก เดชยง และ กฤตธี เดชยง
- การศึกษาการใช้งานเว็บแอปพลิเคชันสำหรับการบริหารเครื่องมือและวัสดุ
ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์: การยอมรับเทคโนโลยีและความพึงพอใจ 173
ณิชาธิ์ พรจิณพนันท์ เพชรรัตน์ พานทอง และ สมชาติ แตรตุลาการ
- การพัฒนาคุณภาพห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัยของโรงพยาบาลสังกัดกระทรวงสาธารณสุข
ในพื้นที่จังหวัดตรัง พัทลุง และสตูล 192
ศิริวรรณ บุญรัตน์ สุชาลี เชื้อมทาว์น และ จีราภรณ์ สงขาว
- การสำรวจติดตามสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผักและผลไม้จาก 77 จังหวัด
ของประเทศไทย ปี พ.ศ. 2565 210
วีรวิทย์ วิทยานันท์ พรรคพล ชะพลพรรค ขนิษฐา พุทธสุชา ศศิธร สุกรีทา
และ กิ่งแก้ว กาญจนรัตน์
- การค้นพบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างใหม่ของไวรัสหัดสายพันธุ์ D8 ครั้งแรก: 229
กรณีการระบาดในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย ปี พ.ศ. 2567
อัจฉริยา ลูกบัว กรรณิการ์ ขวัญชุม นราวรรณ ปันงาม เตือนเพ็ญ เชื้อผู้ดี ประสพชัย อารัมรุ่งโรจน์
ธนพนธ์ เปรมกมล สุธาทิพย์ ตรีพลอักษร ภาวินี ดั่งเงิน ฉัตรมงคล สัมแป้น
และ พิไลลักษณ์ อัครไพบุลย์ โอภาตะ
- การศึกษาการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของแอนติเจน *Mycobacterium tuberculosis* 247
ชนิด Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion ในหนูทดลอง
ปนัดดา เทพอัศร อภิชัย ประชาสุภาพ ณัฐธัญญ์ ภิญโญสุชี รัตนาวดี วิชาจารย์
ณรัตน์ชา ศรีเพ็ชร รุจิราพร พัทธสาลี อณิชา เลื่องชัยเชวง คชาภรณ์ เมฆขยาย
นลินี แสงทอง สมปอง ทรัพย์สุทธิภาสกร และ ภาณุพันธ์ ปัญญาใจ

นิพนธ์ต้นฉบับ

- การออกแบบและการวิเคราะห์คุณลักษณะเบื้องต้นของ *Ag85B-ESAT-6-Rv2660c* mRNA-Lipid Nanoparticles เพื่อการพัฒนาวัคซีนป้องกันวัณโรค 266
 ปนัดดา เทพอัศธร อภิชัย ประชาสุภาพ กษรรัตน์ จงปิติทรัพย์ พันธธิดา ตริยวง
 ศิริวิทย์ เวทโอสถ อณิชา เลื่องชัยเชวง รุจิราพร พัทธ์สาลี และ ภาณุพันธ์ ปัญญาใจ
- การจัดเตรียมแอนติบอดีมาตรฐานอ้างอิงต่อเชื้อ SARS-CoV-2 ชนิดแซ่เยือกแข็ง 283
 อัครรรย์ อาเมน สมปอง ทรัพย์สุทธิภาสตร์ ภูริต ทรงธนินิตย์ กนิษฐา ภูวนาถนรานูบาล
 และ สุภาพร ภูมิอมร
- การศึกษาปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์อิสระในกระบวนการผลิตหมักกรอบ 298
 นิรันดร์ แร่กาสินธุ์ จรรยา บุญวิจิตร และ เขมิกา เหมโลหะ
- การศึกษาแนวทางลดการปนเปื้อนในการเพาะเชื้อจากเลือด 308
 โรงพยาบาลพระอาจารย์ฝั้น อาจาโร
 ปราชญ์สกล ช่วยสุดสกุลชัย
- การพัฒนาและการประเมินประสิทธิภาพวิธี Real-Time PCR สำหรับการตรวจหาชิ้น 320
*HLA-A*31:01* ในการคัดกรองทางเภสัชพันธุศาสตร์
 นวลจันทร์ วัจักษณ์จินดา วิมาลา อินอุ้นโชติ ทิพย์รัตน์ โพธิพิทักษ์ สุกัญญา วัฒนาโกคยกิจ
 และ สุวัศเมธ มหาศิริมงคล

รายงานจากห้องปฏิบัติการ

- การตรวจประเมินห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองมาตรฐานสารพิษตกค้างในผักและผลไม้สด 331
 และผลไม้สดด้วยชุดทดสอบอย่างง่าย ระหว่างปี พ.ศ. 2563-2565
 วิลาวัลย์ ศรีสุชา สิริพรรณ แสงอรุณ ชุลีพร จันทระเสนา และ ภัทรวีร์ สร้อยสังวาลย์

บทความทั่วไป

- วิธีการเลือกในการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์สารเคมี 345
 ป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผักและผลไม้
 วีรฤติ วิทยานันท์
- โคนบีมซีที: ประโยชน์ที่ได้รับกับโอกาสเกิดโรคมะเร็งในยุคทันตกรรมดิจิทัล 369
 อรรถพล ยงวิกุล วิราภา เสนารักษ์ และ สัญญา เรืองสิทธิ์

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

BULLETIN OF THE DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 67 ฉบับที่ 2 เมษายน - มิถุนายน 2568

Vol. 67 No. 2 April - June 2025

CONTENTS

Page

Original Articles

- Correlation between Post-Laparotomy Weight Loss and Pain in BALB/c and C57BL/6 Mice** 163
Kwanchanok Dejjong and Krittee Dejjong
- Study of the Web-Based Application for Medical Laboratory Inventory and Supply Management: Technology Acceptance and Satisfaction** 173
Nicharas Phornjiranoppanan, Phetcharat Phanthong, and Somchat Taertulakarn
- Development of the Quality of Diagnostic Radiology Laboratories in Hospitals, Ministry of Public Health, in Trang, Phatthalung, and Satun Provinces, Thailand** 192
Siriwan Buncharat, Suchawalee Chuamahawan, and Jeeraporn Songkow
- Monitoring of Pesticide Residues in Vegetables and Fruits From 77 Provinces of Thailand in 2022** 210
Weerawut Wittayanan, Pakphon Chaphonpak, Khanittha Phutthasukha, Sasithorn Sukreeta, and Kingkaew Kanchanaratana
- First Identification of Novel Distinct Sequence Identifiers in Measles Virus Genotype D8 During the 2024 Outbreak in Southern Thailand** 229
Atchariya Lukebua, Kannikar Kwanchum, Narawan Punngam, Prasopchai Aramrungraj, Duanpen Chuapudee, Thanapol Preamkamon, Sutatip Treepolauksorn, Pawinee Doung-ngern, Chatmongkol Sompan, and Pilailuk Akkapaiboon Okada
- Immunogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* Antigens: Ag85B, ESAT-6, Rv2660c, and Ag85B-ESAT-6-Rv2660c Fusion in Mice** 247
Panadda Dhepakson, Apichai Prachasuphap, Nadthanan Pinyosukhee, Rattanawadee Wichajarn, Naratcha Sripetch, Rujiraporn Pitaksalee, Anicha Luengchaichaweng, Kachaporn Mekkhayai, Naline Sangthong, Sompong Sapsutthipas, and Parnuphan Panyajai

Original Articles

- Design and Preliminary Characterization of Ag85B-ESAT-6-Rv2660c mRNA-Lipid Nanoparticles for TB Vaccine Development** 266
Panadda Dhepakson, Apichai Prachasuphap, Kodcharad Jongpitisub, Pantida Treeyoung, Sirawit Wet-osot, Anicha Luengchaichaweng, Rujiraporn Pitaksalee, and Parnuphan Panyajai
- Preparation of Lyophilized Reference Standard Anti-SARS-CoV-2 Antibody** 283
Assajun Amen, Sompong Sapsutthipas, Bhurit Songthananit, Kanitta Phuwanartnaranubarn, and Supaporn Phumiamorn
- Study of Free Formaldehyde Content in Pickled Squid Production Process** 298
Nirundorn Raekasin, Janya Bunwichit, and Kheamikar Hemloha
- Study on Reducing Contamination in Hemoculture at Phra Ajan Fan Arjaro Hospital, Thailand** 308
Pradsakon Chouisudsakunchai
- Development and Validation of a Real-Time PCR Assay for HLA-A*31:01 Genotyping in Pharmacogenetic Screening** 320
Nuanjun Wichukchinda, Wimala Inunchot, Tiparat Potipitak, Sukanya Wattanapokayakit, and Surakameth Mahasirimongkol

Laboratory Finding

- Assessment of Accredited Laboratories for Pesticide Residue Screening in Fresh Vegetables and Fruits Using Simple Test Kits during 2020-2022** 331
Wilawan Srisuka, Siriphan Saeng-aroon, Chuleeporn Chantharasena, and Patravee Soisangwan

General article

- Alternatives in Estimation of Measurement Uncertainty in Analysis of Pesticide Residues in Vegetables and Fruits** 345
Weerawut Wittayanan
- Cone Beam Computed Tomography: Benefits and Cancer Risks in Digital Dentistry** 369
Atapol Yongvikul, Wirapha Senarak, and Sunya Ruangsitt

ความสัมพันธ์ระหว่างการลดลงของน้ำหนักกับ ความเจ็บปวดหลังผ่าตัดช่องท้องในหนูไมซ์สายพันธุ์ BALB/c และ C57BL/6

ขวัญชนก เดชขง¹ และ กฤตธี เดชขง²

¹ศูนย์บริการสัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90110

²คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90110

บทคัดย่อ การศึกษาวิจัยทางสรีรวิทยาที่ใช้สัตว์ทดลองสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดความเจ็บปวดอย่างมาก โดยเฉพาะสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมซึ่งมีการตอบสนองต่อความเจ็บปวดเช่นเดียวกับมนุษย์ ความเจ็บปวดส่งผลกระทบต่อพฤติกรรม ความอยากอาหาร และการสูญเสียน้ำหนักหลังการผ่าตัด วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อเปรียบเทียบผลของความเจ็บปวดต่อน้ำหนักก่อนและหลังการผ่าตัดช่องท้องในสัตว์ทดลองชนิดหนูไมซ์ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ BALB/c และ C57BL/6 ที่ได้รับการระงับความเจ็บปวดหลังการผ่าตัดด้วยยาอมอร์ฟิน รวมถึงเปรียบเทียบระดับความเจ็บปวดที่สัตว์แสดงออกทางใบหน้า (Facial Mouse Grimace Scale; fMGS) ในแต่ละช่วงเวลาหลังการผ่าตัดเปรียบเทียบกับก่อนผ่าตัดโดยให้คะแนนการแสดงออกของใบหน้าของสัตว์ทดลอง ที่เปลี่ยนแปลงไปตามระดับความเจ็บปวด แล้วหาความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนัก และความเจ็บปวดหลังผ่าตัด พบว่าน้ำหนักลดลง 5% ใน 3–4 วันแรกหลังการผ่าตัด และค่อยๆ เพิ่มขึ้นหลังจากนั้น ผลการทดลองแสดงว่ายาอมอร์ฟินสามารถบรรเทาอาการปวดได้แต่ไม่ทั้งหมด นอกจากนี้ความเจ็บปวดและการสูญเสียน้ำหนักมีความสัมพันธ์กัน โดยมีสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.82 และ $p = 0.0125$ สำหรับหนูไมซ์สายพันธุ์ BALB/c และ R^2 เท่ากับ 0.97 และ $p = 0.0004$ สำหรับหนูไมซ์สายพันธุ์ C57BL/6 จากการประเมินความเจ็บปวดด้วย Facial Mouse Grimace Scale พบว่าความเจ็บปวดยังคงอยู่ถึงวันที่ 5 หลังการผ่าตัด ดังนั้นแม้จะมีการให้ยาลดปวดประเภทโอปิออยด์ ยังพบการสูญเสีย น้ำหนักหลังผ่าตัดช่องท้อง จึงแนะนำให้การจัดการความเจ็บปวดควรพิจารณาการระงับความเจ็บปวดนานขึ้น และเพิ่มวิธีการจัดการความเจ็บปวด รวมถึงการให้ยาบรรเทาอาการปวดและลดการอักเสบที่ออกฤทธิ์ในกลไกที่แตกต่างกัน เพื่อบรรเทาอาการเจ็บปวดอย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: หนูไมซ์, สรีรวิทยาช่องท้อง, น้ำหนัก, ความเจ็บปวด

Corresponding author E-mail: kwanchanok.d@psu.ac.th

Received: 7 February 2024

Revised: 15 February 2025

Accepted: 17 February 2025

บทนำ

การศึกษาวิจัยทางศัลยกรรมที่ใช้สัตว์ทดลองสามารถเหนี่ยวนำให้สัตว์ทดลองเกิดความเจ็บปวด โดยกลไกการส่งสัญญาณให้เกิดความเจ็บปวดนั้นมี 4 ขั้นตอน เมื่อเกิดการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อจากการทำศัลยกรรม จะเกิดการฉีกขาดของเนื้อเยื่อร่วมกับกระบวนการอักเสบ จึงเกิดการกระตุ้นตัวรับความเจ็บปวดบริเวณปลายประสาทที่ทำหน้าที่รับความรู้สึก หากการกระตุ้นที่ตัวรับด้วยแรงที่มากเกินไปกว่าระดับ threshold จะเกิดการส่งกระแสประสาทความเจ็บปวดผ่านทางใยประสาทบริเวณนั้นไปยังไขสันหลัง เมื่อสัญญาณมาถึงไขสันหลังจะเกิดการปรับแต่งสัญญาณประสาทและส่งสัญญาณต่อไปยังสมอง เกิดการรับรู้ความเจ็บปวดภายในสมอง เมื่อมีสัญญาณความเจ็บปวดจะส่งสัญญาณตอบสนองกลับไปยังบริเวณที่บาดเจ็บเพื่อให้หลบเลี่ยง รวมทั้งส่งสัญญาณไปยังสมองส่วนลิมบิก (limbic) เพื่อให้เกิดการสร้างอารมณ์ตอบสนองต่อความเจ็บปวดที่เกิดขึ้น ดังนั้นในการผ่าตัดสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดความเจ็บปวดและการตอบสนองของร่างกายและอารมณ์ทางลบ ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมสามารถเกิดกลไกการตอบสนองต่อความเจ็บปวดเช่นเดียวกับมนุษย์⁽¹⁾

ความเจ็บปวดที่เกิดขึ้นส่งผลกระทบต่อพฤติกรรมของสัตว์ทดลอง ความอยากอาหาร พฤติกรรมการแต่งตัว และพฤติกรรมการมีปฏิสัมพันธ์กับตัวอื่น ๆ รวมทั้งพฤติกรรมก้าวร้าว หรือหลบหนีที่เป็นการตอบสนองตามกลไกของระบบประสาทซิมพาเทติก (sympathetic) ความเจ็บปวดและความเครียดจากการบาดเจ็บกระตุ้นให้ระบบซิมพาเทติกทำงานมากขึ้นส่งผลให้สรีระร่างกายของสัตว์ทดลองเปลี่ยนไปอยู่ในสภาวะพร้อมสู้หรือหนี ซึ่งเป็นกลไกธรรมชาติ อัตราการเต้นของหัวใจ อัตราการหายใจ รวมทั้งความดันโลหิตของสัตว์ทดลองจะสูงขึ้น หากมีการบรรเทาอาการความเจ็บปวดลง การตอบสนองของระบบซิมพาเทติกจะค่อย ๆ ลดลง ขณะที่ระบบพาราซิมพาเทติกจะทำงานมากขึ้นส่งผลให้สัตว์ทดลองมีความอยากอาหารมากขึ้นร่างกายจะฟื้นตัวดีขึ้น หากความเจ็บปวดนั้นไม่ได้รับการบรรเทาอาการความเจ็บปวดยังคงอยู่จะพัฒนาเป็นความเจ็บปวดเรื้อรัง ส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของสัตว์ทดลองเนื่องจากความเจ็บปวด

เรื้อรังจะกระตุ้นให้เกิดการหลั่งฮอร์โมนคอร์ติซอลมากขึ้น ซึ่งฮอร์โมนคอร์ติซอลมีผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกัน ระบบทางเดินอาหาร การตอบสนองทางอารมณ์ ระดับน้ำตาลในเลือด ความดันโลหิตสูงกว่าปกติ และอัตราการเต้นของหัวใจสูงกว่าปกติ เป็นต้น^(2,3)

การสูญเสียน้ำหนักหลังทำศัลยกรรมเป็นปัจจัยสำคัญที่ต้องพิจารณาในด้านสุขภาพและการพยากรณ์อัตราการฟื้นตัวของสัตว์ทดลอง เนื่องจากการสูญเสียน้ำหนักหลังการผ่าตัดสามารถเกิดขึ้นจากปัจจัยต่างๆ ที่สัมพันธ์ร่วมกัน เช่น การเพิ่มขึ้นของการใช้พลังงานของร่างกาย การสูญเสียน้ำ หรือการสูญเสียเลือดในระหว่างกระบวนการผ่าตัด รวมทั้งความไม่สบายหรืออาการเจ็บปวด นอกจากนี้การลดลงของน้ำหนักหลังผ่าตัดสามารถพยากรณ์อัตราการฟื้นตัวของสัตว์ทดลองเพื่อใช้ในการพิจารณาการยุติการทดลอง (Humane endpoint) ดังนั้นการติดตามน้ำหนักหลังการผ่าตัดในสัตว์ควรดำเนินการอย่างระมัดระวัง และมีความถี่ที่เหมาะสม โดยเฉพาะในกรณีของสัตว์ที่มีขนาดเล็ก เช่น หนูไมซ์ (mice) หรือ หนูแฮมสเตอร์ (hamster) เพื่อช่วยในการคาดการณ์ผลการศึกษาดทดลองและตรวจสอบสถานะสุขภาพของสัตว์ได้อย่างแม่นยำรวมถึงการกำหนดเกณฑ์การยุติความทรมานของสัตว์ทดลองระหว่างการทำการวิจัยโดยอาศัยความเมตตา (Humane endpoint)⁽³⁻⁵⁾

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อเปรียบเทียบผลของความเจ็บปวดต่อน้ำหนักก่อนและหลังการผ่าตัดช่องท้องในสัตว์ทดลองชนิดหนูไมซ์ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ BALB/c และ C57BL/6 ที่ได้รับการระงับความเจ็บปวดหลังการผ่าตัดด้วยยาอมอร์ฟิน รวมถึงเปรียบเทียบระดับความเจ็บปวดที่สัตว์แสดงออกทางใบหน้า (Facial Mouse Grimace Scale; fMGS) ในแต่ละช่วงเวลาหลังการผ่าตัดเปรียบเทียบกับก่อนผ่าตัด โดยให้คะแนนการแสดงออกของใบหน้าของสัตว์ทดลองที่เปลี่ยนแปลงไปตามระดับความเจ็บปวด แล้วหาความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนัก และความเจ็บปวดหลังผ่าตัด โดยสัตว์ทดลองทั้งสองสายพันธุ์เป็นสัตว์ที่ผสมเลือดชิดที่ได้รับความนิยมในการนำมาใช้ในการทดลองต่างๆ โดยเฉพาะงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับศัลยกรรม⁽⁶⁾

วัสดุและวิธีการ

การดูแลและเลี้ยงหนูไมซ์

การศึกษานี้ใช้หนูไมซ์ (mice) สายพันธุ์ BALB/c เพศเมีย อายุ 12 สัปดาห์ จำนวน 20 ตัว และหนูไมซ์ สายพันธุ์ C57BL/6 เพศเมีย อายุ 12 สัปดาห์ จำนวน 23 ตัว ซึ่งได้รับจากบริษัท โนมูระ สยาม อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด ประเทศไทย นำมาเลี้ยง ณ สถานสัตว์ทดลองภาคใต้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ภายใต้สภาวะควบคุมที่อุณหภูมิ $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ความชื้นสัมพัทธ์ $60 \pm 10\%$ ความยาวแสงสว่าง 12 ชั่วโมง และมีด 12 ชั่วโมงสลับกัน ได้รับอาหารและน้ำอย่างไม่จำกัด ตามมาตรฐานการเลี้ยงสัตว์ทดลอง ก่อนทำการศึกษานูหนูได้รับการปรับสภาพเพื่อให้เกิดความคุ้นชิน เป็นเวลา 7 วัน

ในการศึกษานี้หนูไมซ์จะได้รับการชั่งน้ำหนักทุกวัน ที่เวลา 8.00 นาฬิกา โดยใช้เครื่องชั่งน้ำหนักดิจิทัล ความละเอียด 0.01 กรัม (SPX222[®], Ohaus, New Jersey, USA)

การผ่าตัด

หนูไมซ์ได้รับยาดมสลบชนิดไอโซฟลูเรน (Isoflurane, USP Lot No. NOO3A226, Aerrane, Baxter Healthcare Corporation, USA) 1.5–2% ร่วมกับออกซิเจนปริมาณ 1.0–1.5 ลิตรต่อนาที เพื่อให้หมดสติและไม่รู้สึกเจ็บปวด ก่อนทำการผ่าตัดช่องท้องตัดขน และทำความสะอาดที่บริเวณหน้าท้องของหนูด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ และหนูทุกตัวจะได้รับยาลดปวดชนิดมอร์ฟีน (Morphine sulfate Lot No. 46HET, M&H Manufacturing, TH) ขนาด 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous) จากนั้นเปิดผ่าช่องท้องที่ตำแหน่งกึ่งกลาง (linea alba) เมื่อเปิดถึงช่องท้องตัดต่อลำไส้เล็กส่วนกลาง (jejunum) ขนาด 0.2 มิลลิเมตร เย็บด้วยไหมเย็บชนิด polyamide ขนาด 8-0 ยาว 45 เซนติเมตร (ETHILON[®], Ethicon, USA) จากนั้นเย็บปิดผนังช่องท้องและผิวหนังด้วยไหมเย็บชนิด polypropylene (Prolene[®], Ethicon, USA) ขนาด 6-0 โดยหนูจะมีแผลเย็บที่หน้าท้อง 5-6 เซม

การประเมินความเจ็บปวด

การประเมินความเจ็บปวดหลังผ่าตัดโดยใช้การแสดงออกทางใบหน้า (Facial Mouse Grimace Scale; fMGS)⁽⁷⁾ ก่อนการให้ยาลดปวดทุกวัน ที่เวลา 8.00 นาฬิกา โดยการให้คะแนนแบ่งเป็น 3 ระดับ ตามความรุนแรงของความเจ็บปวด ได้แก่ เจ็บปวดเล็กน้อย (0–3) เจ็บปวดปานกลาง (4–7) และเจ็บปวดมาก (8–10)⁽⁸⁾ และหนูได้รับยาลดปวดชนิดมอร์ฟีนขนาด 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ฉีดเข้าใต้ผิวหนังทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลในรูปของค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation, SD) ที่มีการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยมากกว่า 2 กลุ่ม โดยใช้สถิติ One-way ANOVA เพื่อเปรียบเทียบน้ำหนักก่อนและหลังการผ่าตัดช่องท้อง (วันที่ 1–6) ของหนูไมซ์ 2 สายพันธุ์ BALB/c และ C57BL/6 ที่ได้รับการระงับความเจ็บปวดหลังผ่าตัดด้วยยามอร์ฟีน และการเปรียบเทียบการแสดงออกทางสีหน้าในแต่ละช่วงเวลาหลังผ่าตัด (วันที่ 1–6) ของหนูไมซ์ 2 สายพันธุ์ (BALB/c และ C57BL/6) การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยมากกว่า 2 กลุ่ม เมื่อมีการวัดซ้ำโดยใช้สถิติ Repeated measured ANOVA สำหรับวิเคราะห์ระดับความเจ็บปวดของหนู โดยมีระดับนัยสำคัญที่ p น้อยกว่า 0.05 หรือที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยวิเคราะห์จากค่าเฉลี่ย และหาความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนัก (กรัม) และระดับความเจ็บปวด (fMGS) เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักตัวและความเจ็บปวดหลังผ่าตัด (วันที่ 1–6) โดยใช้สถิติ Pearson Correlation ที่ระดับความมั่นใจ (Confidence Interval) 95% โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ GraphPad Prism 10.1.0 (GraphPad Software, MA, USA)

จริยธรรมการวิจัย

การศึกษานี้ผ่านการรับรองจริยธรรมการใช้สัตว์จากคณะกรรมการกำกับดูแลการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (หมายเลขการรับรองโครงการ 2563-05-025) เมื่อวันที่ 25 มกราคม พ.ศ. 2566

ผล

ในการศึกษานี้พบว่าน้ำหนักก่อน (วันที่ 0 ของการผ่าตัด) และหลังผ่าตัดใน 24 ชั่วโมงของหนูไมซ์ทั้งสองสายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกัน โดยมีน้ำหนักลดลงประมาณร้อยละ 5 ในวันที่ 3-4 หลังการผ่าตัด และพบว่า

น้ำหนักหลังผ่าตัดในวันที่ 4-6 ของสัตว์ทดลองทั้งสองสายพันธุ์ค่อยๆ เพิ่มขึ้นตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งแสดงว่ายามอร์ฟีนสามารถบรรเทาอาการปวดได้อย่างมีประสิทธิภาพ สัตว์ทดลองสามารถกลับมากินอาหารและน้ำได้รวมถึงระดับของน้ำหนักค่อยๆ เพิ่มขึ้น

ตารางที่ 1 น้ำหนักหลังการผ่าตัดช่องท้องของหนูไมซ์สายพันธุ์ BALB/C และ C57BL/6

วันที่หลังการผ่าตัด							
	0	1	2	3	4	5	6
น้ำหนักหลังการผ่าตัดช่องท้องของหนูไมซ์สายพันธุ์ BALB/C (กรัม)							
Minimum	18.97	16.81	18.44	18.58	19.46	20.96	20.94
Maximum	24.42	23.64	23.47	23.22	23.51	23.81	23.87
Mean±SD	22.55 ±1.32	21.42 ±1.62	21.56 ±1.54	21.48 ±1.52	21.62 ±1.36	22.47 ±0.84	22.60 ±1.06
Mean %*	100	95.27	95.84	95.04	95.66	99.42	100.00
น้ำหนักหลังการผ่าตัดช่องท้องของหนูไมซ์สายพันธุ์ C57BL/6 (กรัม)							
Minimum	15.64	14.89	14.92	15.21	15.70	15.88	16.11
Maximum	23.18	20.94	21.35	21.86	22.16	22.30	23.40
Mean±SD	19.14 ±2.07	17.98 ±1.71	18.12 ±1.74	18.47 ±1.76	18.73 ±1.70	19.13 ±1.77	19.40 ±1.90
Mean %*	100	94.53	95.03	95.73	96.79	97.74	97.44

หมายเหตุ: *ร้อยละของความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 ของการผ่าตัด

การประเมินความเจ็บปวดของหนูไมซ์โดยใช้การแสดงออกทางใบหน้า (fMGS)^(4,8) พบว่าหนูไมซ์ทั้งสองสายพันธุ์มีคะแนนของการประเมินความเจ็บปวดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) ภายใน 24-120 ชั่วโมงหลังการผ่าตัด และมีระดับความเจ็บปวดสูงสุดที่ 24 ชั่วโมงหลังผ่าตัด เมื่อเปรียบเทียบกับ

คะแนนประเมินก่อนการผ่าตัด โดยคะแนนความเจ็บปวดเฉลี่ย (mean) เพิ่มขึ้นเป็นระดับปานกลางในวันที่ 3.5 (84 ชั่วโมง) และวันที่ 4 (96 ชั่วโมง) หลังการผ่าตัดในหนูไมซ์สายพันธุ์ BALB/C และสายพันธุ์ C57BL/6 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การประเมินความเจ็บปวดหลังการผ่าตัดช่องท้องในหนูไมซ์ด้วยวิธี Facial Mouse Grimace Scale (fMGS)

เวลาหลังจากการผ่าตัด (ชั่วโมง)									
	0	24	36	48	72	84	96	108	120
คะแนนการประเมินความเจ็บปวดหลังการผ่าตัดช่องท้องในหนูไมซ์สายพันธุ์ BALB/C									
Minimum	0	6	4	3	3	3	3	1	1
Maximum	0	8	7	7	9	6	4	3	3
Mean±SD	0.00 ±0.00	6.80 ±0.75	6.00 ±0.74	5.40 ±1.07	4.90 ±1.32	4.30 ±0.75	3.80 ±0.45	2.30 ±0.87	2.10 ±1.05

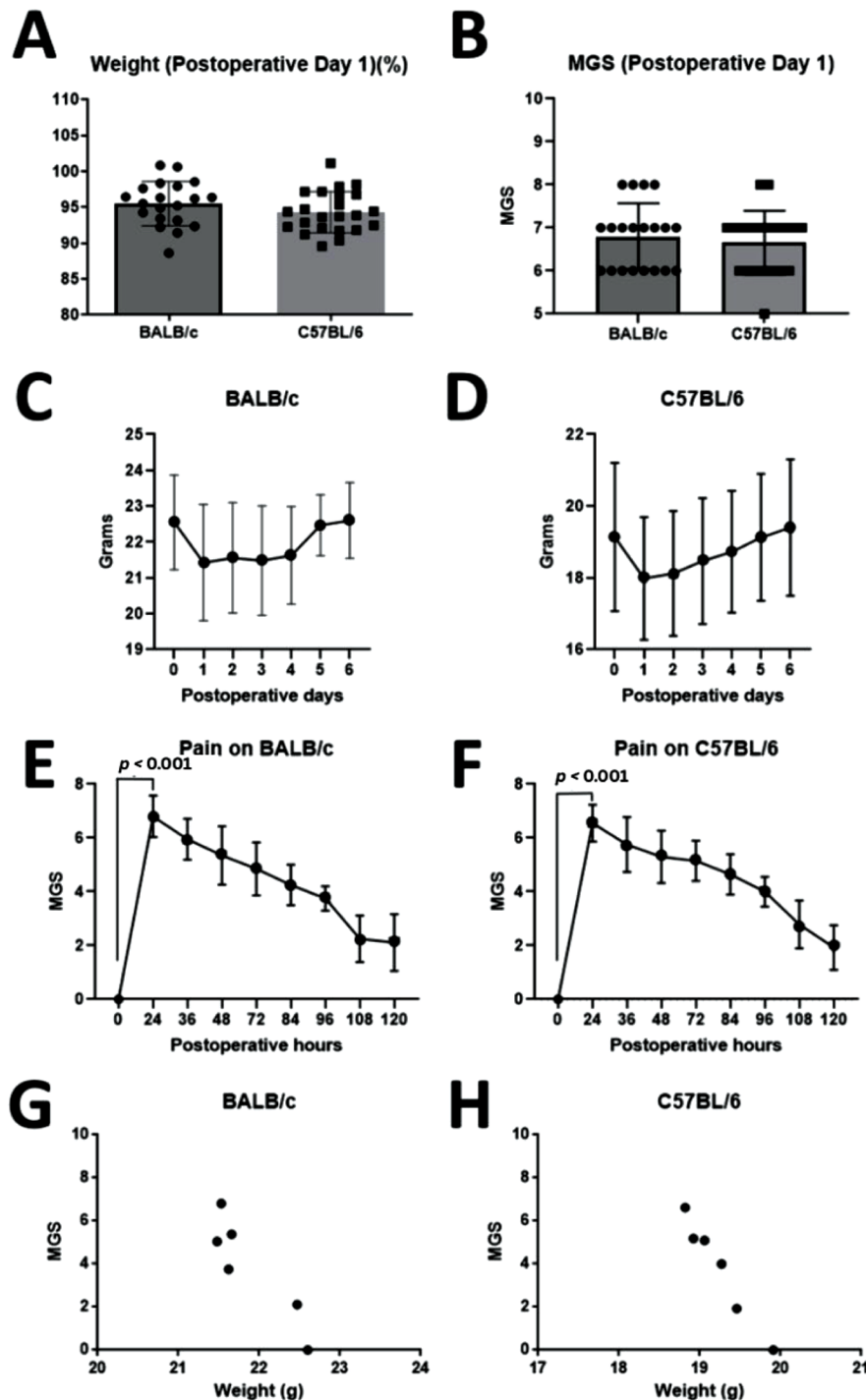
ตารางที่ 2 การประเมินความเจ็บปวดหลังการผ่าตัดช่องท้องในหนูไมซ์ด้วยวิธี Facial Mouse Grimace Scale (fMGS) (ต่อ)

คะแนนการประเมินความเจ็บปวดหลังการผ่าตัดช่องท้องในหนูไมซ์สายพันธุ์ C57BL/6									
Minimum	0	5	4	3	4	4	3	2	1
Maximum	0	8	7	7	6	6	5	5	3
Mean±SD	0.00 ±0.00	6.55 ±0.69	5.75 ±1.02	5.3 ±1.08	5.15 ±0.75	4.64 ±0.75	4.00 ±0.56	2.79 ±0.89	1.93 ±0.82

การวิเคราะห์เปรียบเทียบน้ำหนักตัวหลังการผ่าตัดวันแรกเมื่อเทียบกับน้ำหนักตัวก่อนผ่าตัด (%) (ภาพที่ 1A) และระดับความเจ็บปวดหลังผ่าตัดวันแรก (fMGS) (ภาพที่ 1B) ของหนูไมซ์สายพันธุ์ BALB/c และ C57BL/6 พบว่าไม่มีความแตกต่างของการลดลงของน้ำหนัก และระดับความเจ็บปวด ระหว่างหนูไมซ์ทั้งสองสายพันธุ์ และเมื่อบันทึกการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักร่างกาย (Grams) หลังการผ่าตัด พบว่า น้ำหนักตัวของหนูไมซ์สายพันธุ์ BALB/c เพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ในช่วง 4 วันแรกหลังลดลงจากการผ่าตัด (ภาพที่ 1C) ซึ่งแตกต่างจากหนูไมซ์สายพันธุ์ C57BL/6 ที่พบการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักอย่างต่อเนื่องหลังลดลงอย่างฉับพลันของน้ำหนักในวันแรกหลังการผ่าตัด (ภาพที่ 1D) อย่างไรก็ตาม น้ำหนักของหนูไมซ์ทั้งสองสายพันธุ์เพิ่มขึ้นเป็นลำดับใกล้เคียงกับก่อนผ่าตัดในวันที่ 5 หลังการผ่าตัด โดยสอดคล้องกับข้อมูลระดับความเจ็บปวดหลังผ่าตัดที่ลดลงเหลือระดับต่ำ

ใน 108 ชั่วโมง หรือ 4 วันหลังการผ่าตัด ในหนูไมซ์สายพันธุ์ BALB/c (ภาพที่ 1E) และ 120 ชั่วโมง หรือ 5 วันหลังการผ่าตัดในหนูไมซ์สายพันธุ์ C57BL/6 (ภาพที่ 1F) ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักตัว และระดับความเจ็บปวดของหนูไมซ์ทั้งสองสายพันธุ์พบว่าระดับความเจ็บปวดแปรผกผันกับน้ำหนักตัวของหนูไมซ์ (ภาพที่ 1G และภาพที่ 1H)

พบความสัมพันธ์ทางสถิติที่มีนัยสำคัญของความสัมพันธ์ (Correlation) การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักเฉลี่ย (กรัม) และคะแนนความเจ็บปวด (fMGS) ของหนูเมาส์สายพันธุ์ BALB/c และ C57BL/6 มีความสัมพันธ์ในระดับสูง โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.82 ($p = 0.0125$) และ 0.97 ($p = 0.0004$) ตามลำดับ แสดงให้เห็นถึงแนวโน้มความรุนแรงของความเจ็บปวดลดลงหลังผ่าตัด อย่างเป็นลำดับ ซึ่งตรงข้ามกับความสัมพันธ์ของน้ำหนักตัวในระยะฟื้นตัว ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 กราฟแสดงการเปรียบเทียบน้ำหนักตัวหลังการผ่าตัดวันแรกเมื่อเทียบกับน้ำหนักตัวก่อนผ่าตัด (%) (A) และระดับความเจ็บปวดหลังผ่าตัดวันแรก (fMGS) (B) ของหนูไมซ์ 2 สายพันธุ์ (BALB/c และ C57BL/6) กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักร่างกาย (Grams) ของหนูไมซ์สายพันธุ์ BALB/c (C) และหนูไมซ์สายพันธุ์ C57BL/6 (D) กราฟแสดงข้อมูลระดับความเจ็บปวดหลังผ่าตัดในหนูไมซ์สายพันธุ์ BALB/c (E) และสายพันธุ์ C57BL/6 (F) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักตัวและระดับความเจ็บปวดของหนูไมซ์ ทั้งสองสายพันธุ์ (BALB/c และ C57BL/6) (G และ H)

วิจารณ์

การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างความเจ็บปวดที่เกิดขึ้นหลังการผ่าตัดช่องท้องและน้ำหนักตัวของสัตว์ทดลองที่ลดลง เนื่องจากความเจ็บปวดนั้นส่งผลกระทบต่อการสูญเสียน้ำในร่างกาย ความไม่สบายกาย และยังส่งผลต่อความอยากอาหารในหนูไมซ์ ซึ่งเป็นภาวะที่ผิดปกติจากธรรมชาติของสัตว์ทดลองชนิดนี้ เมื่อได้รับยามอร์ฟินซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มโอปิออยด์ที่ออกฤทธิ์ที่ตัวรับโอปิออยด์ เพื่อยับยั้งการส่งสัญญาณความเจ็บปวดจากเส้นประสาทไปยังไขสันหลัง และสมองทำให้สามารถระงับความเจ็บปวดได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อสัตว์ทดลองได้รับการผ่าตัดมีการบาดเจ็บและเกิดความเจ็บปวด สัญญาณความเจ็บปวดจากบาดแผลถูกระงับไม่สามารถส่งสัญญาณไปยังระบบประสาทส่วนกลางทำให้สัตว์ทดลองมีอาการเจ็บปวดลดลง และสามารถดำเนินชีวิต กินอาหารและน้ำได้⁽⁹⁾ การลดลงของน้ำหนักหลังการผ่าตัดของหนูไมซ์ทั้งสองสายพันธุ์ (BALB/c และ C57BL/6) ไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักเริ่มต้นใน 24 ชั่วโมงแรกหลังการผ่าตัด ในวันที่ 2-4 น้ำหนักของหนูทั้งสองสายพันธุ์ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักก่อนผ่าตัดและค่อยๆ เพิ่มขึ้นใกล้เคียงน้ำหนักก่อนผ่าตัดในวันที่ 5-6 (ตารางที่ 1) บ่งชี้ว่าการฟื้นตัวของสัตว์ทดลองจะใช้เวลาอย่างน้อย 6 วัน ระดับของน้ำหนักจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นในกรณีที่มีการบรรเทาความเจ็บปวดอย่างเหมาะสมในขณะที่การประเมินความเจ็บปวดของสัตว์ทดลอง โดยใช้การแสดงออกทางใบหน้า (fMGS) พบระดับของความเจ็บปวดเพิ่มสูงหลังการผ่าตัดใน 24 ชั่วโมงเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนผ่าตัด และระดับของความเจ็บปวดค่อยๆ ลดลงตามลำดับในวันที่ 2-5 เนื่องจากการได้รับยาลดปวดชนิดมอร์ฟิน

ในการศึกษานี้ไม่ได้บรรเทาการอักเสบหลังการผ่าตัด พบว่าภาวะการอักเสบของเนื้อเยื่อที่เกิดการบาดเจ็บจากการผ่าตัดส่งผลกระทบให้เกิดความเจ็บปวดและพฤติกรรมต่ออาการบาดเจ็บที่เกิดขึ้นดังกล่าวแม้ว่าบาดแผลภายนอกหายดีแล้วก็ตาม จากการศึกษาแสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของความเจ็บปวดที่ขยายมากกว่า 72 ชั่วโมงของระยะเวลาการอักเสบของเนื้อเยื่อหลังการ

ผ่าตัด ซึ่งความเจ็บปวดนั้นสามารถคงอยู่นานถึง 5 วันหลังผ่าตัด การอักเสบของเนื้อเยื่อหลังการผ่าตัดจะอยู่ที่ 48-72 ชั่วโมงแรก⁽¹⁰⁾ หลังจากนั้นจะมีการแพร่ของเซลล์อักเสบในระหว่างการแพร่กระจาย (proliferative phase) ซึ่งจะเกิดขึ้นในระยะ 5 วันหลังเกิดการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ⁽¹⁰⁾ ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Chen D และคณะ⁽⁹⁾ ที่พบว่าการตอบสนองต่อการอักเสบและการจัดการความเจ็บปวดมีความสำคัญอย่างยิ่งในระยะฟื้นตัวหลังการผ่าตัด แม้ว่าจะใช้ยาลดปวดโอปิออยด์ชนิดรุนแรง (High intensity opioids) ก็ไม่สามารถจัดการความเจ็บปวดได้ดีในช่วง 3-5 วันแรกของการฟื้นตัวหลังผ่าตัด

ดังนั้นการพิจารณาการบรรเทาอาการความเจ็บปวดในสัตว์ทดลองอาจต้องเพิ่มระยะเวลาในการให้ยาลดปวดรวมถึงการให้ยาบรรเทาอาการปวดและลดการอักเสบที่ออกฤทธิ์ในกลไกที่แตกต่างกันเพื่อบรรเทาอาการเจ็บปวดอย่างมีประสิทธิภาพ เช่นการให้ยาระงับการอักเสบชนิดไม่ใช้สเตียรอยด์ร่วมกับมอร์ฟิน เป็นต้น และเฝ้าติดตามอาการของสัตว์ทดลองรวมทั้งน้ำหนักที่ลดลง เพื่อพิจารณาประสิทธิภาพการบรรเทาอาการปวดในสัตว์ทดลอง^(9,11) ในกรณีที่การบรรเทาความเจ็บปวดไม่สามารถบรรเทาให้ความเจ็บปวดที่เกิดขึ้นทุเลาลงจนสัตว์ทดลองสามารถดำเนินชีวิตได้จะพบว่าอัตราการกินอาหารลดลง ซึ่งในการศึกษานี้ไม่ได้ติดตามอัตราการกินอาหารและน้ำของสัตว์ทดลอง แต่จากการติดตามน้ำหนักของสัตว์ทดลองสามารถทำนายอัตราการกินอาหารและน้ำของสัตว์ทดลองได้โดยการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักสามารถประเมินได้ว่าสัตว์ทดลองมีอัตราการกินอาหารและน้ำเพิ่มขึ้น หากน้ำหนักของสัตว์ทดลองลดลงสามารถประเมินได้ว่าอัตราการกินอาหารของสัตว์ทดลองลดลง ปัจจัยอื่นๆ นอกจากความเจ็บปวดของการผ่าตัดแล้ว สาเหตุจากปัญหาทางทันตกรรม ปัญหาของการกลืน ปัญหาระบบทางเดินอาหาร หรือโรคทางระบบอื่นๆ เช่น ภาวะไทรอยด์เป็นพิษ มะเร็ง โรคเบาหวาน การอักเสบเรื้อรัง หรือโรคที่กระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายสามารถกระทบต่อการฟื้นตัวหลังผ่าตัดของหนูไมซ์สายพันธุ์ BALB/c และ C57BL/6 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ผสมแบบเลือดชิดเหล่านี้⁽¹²⁾

นอกจากความสัมพันธ์ของการลดลงของน้ำหนักสัตว์ทดลองต่อระดับความเจ็บปวดแล้ว การแสดงออกของพฤติของสัตว์ทดลองที่สามารถบ่งชี้ถึงภาวะความเจ็บปวดหรือความไม่สบายกาย เช่น การแสดงออกของสีหน้าที่เปลี่ยนไป การแยกตัวออกจากกลุ่ม หรือการเคลื่อนไหวของร่างกายที่ลดลง เป็นต้น สามารถบ่งชี้ถึงความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับสัตว์ทดลอง^(4,13,14) การศึกษานี้พบว่ายามอร์ฟินสามารถลดระดับความเจ็บปวดได้ประมาณหนึ่งเท่านั้น โดยสามารถลดคะแนนประเมินความเจ็บปวดจากคะแนนประมาณ 7–8 ลดลง โดยมีค่าเฉลี่ยประมาณ 5–6 ใน 24–48 ชั่วโมงหลังผ่าตัด และสอดคล้องกับน้ำหนักตัวของสัตว์ทดลองที่ลดลงหลังผ่าตัด ผลของการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานของ Matsumiya LC และคณะ⁽⁴⁾ ที่ศึกษาผลของการผ่าตัดทำหัตถ์เพศเมียในหนูไมซ์ โดยพบว่า Buprenorphine ซึ่งจัดเป็นยาระงับปวดอยู่ในกลุ่มโอปิออยด์และอยู่ในกลุ่มยาเดียวกับยามอร์ฟินมีประสิทธิภาพในการระงับความเจ็บปวดดีกว่ายาในกลุ่มยาระงับการอักเสบชนิดไม่ใช้สเตียรอยด์เพียงอย่างเดียว การศึกษาของ Furumoto K และคณะ⁽¹⁵⁾ ได้ศึกษาผลของการระงับปวดด้วยยาบรรเทาอาการปวดมากกว่า 1 ชนิดในการระงับอาการปวดหลังการผ่าตัดลำไส้ เปรียบเทียบการบรรเทาอาการโดยใช้ยา Meloxicam และ Meloxicam ร่วมกับ Buprenorphine พบว่าการใช้ยาบรรเทาปวด Meloxicam ร่วมกับ Buprenorphine สามารถบรรเทาอาการความเจ็บปวดได้ดีกว่าการใช้ยาเพียงชนิดเดียว

ดังนั้นแนวทางการระงับปวดนี้มีประสิทธิภาพสามารถลดความรุนแรงของอาการปวดของหนูไมซ์หลังผ่าตัด เพิ่มคุณภาพชีวิต และความอยากอาหารของสัตว์ทดลอง การติดตามอาการและประเมินความเจ็บปวดรวมทั้งประเมินน้ำหนักของสัตว์ทดลองหลังผ่าตัดอย่างใกล้ชิด เป็นการประเมินประสิทธิภาพในการบรรเทาอาการปวดหลังการผ่าตัด⁽¹⁵⁾

การศึกษาต่อไปควรทดสอบการใช้ยาบรรเทาความเจ็บปวดแบบผสมผสาน (Multimodal analgesia)

เช่น ยาโอปิออยด์ร่วมกับยาระงับการอักเสบชนิดไม่ใช้สเตียรอยด์ (NSAIDs) เพื่อประเมินประสิทธิภาพในการบรรเทาความเจ็บปวดหลังการผ่าตัดเพิ่มเติม นอกจากนี้ควรวัดระดับความเจ็บปวดและการฟื้นตัวของหนูไมซ์โดยใช้เครื่องมือหลากหลาย และศึกษาผลของการบรรเทาความเจ็บปวดในสัตว์ชนิดอื่นๆ ติดตามผลข้างเคียงจากการใช้ยาหลายชนิดร่วมกันและสำรวจปัจจัยอื่นๆ ที่อาจมีผลต่อการฟื้นตัวหลังการผ่าตัด การศึกษาเหล่านี้จะช่วยให้สามารถเข้าใจและพัฒนาแนวทางการบรรเทาความเจ็บปวดหลังการผ่าตัดได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น และเพิ่มคุณภาพชีวิตของสัตว์ทดลองในอนาคต

สรุป

การศึกษานี้แสดงให้เห็นผลของการผ่าตัดช่องท้องในหนูไมซ์สายพันธุ์ C57BL/6 และ BALB/c เพศเมีย ทั้ง 2 สายพันธุ์ มีน้ำหนักตัวลดลงประมาณ 5% ใน 24 ชั่วโมงหลังการผ่าตัด และจะฟื้นตัวสู่ระดับน้ำหนักก่อนการผ่าตัดในวันที่ 5 จากการประเมินความเจ็บปวดจากไบหน้ (fMGS) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการลดน้ำหนักของร่างกาย แม้จะมีการให้ยาลดปวดชนิดมอร์ฟิน แต่ความเจ็บปวดยังคงมีอยู่เกินกว่าที่คาดโดยเฉพาะใน 3 วันหลังการผ่าตัด ผลการศึกษานี้เน้นย้ำถึงความจำเป็นในการขยายเวลาการจัดการความเจ็บปวดหลังการผ่าตัดและการพิจารณาแนวทางหลายรูปแบบในการจัดการความเจ็บปวด (Multimodal analgesia)

การศึกษาวิจัยนี้มีข้อจำกัดหลายประการ คือ การใช้หนูไมซ์ในการทดลอง ซึ่งอาจทำให้ผลลัพธ์ไม่สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับสัตว์อื่นหรือมนุษย์ได้โดยตรง การวัดความเจ็บปวดด้วย fMGS อาจไม่ครอบคลุมทุกมิติของความเจ็บปวด การใช้ยามอร์ฟินเพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอสำหรับการจัดการความเจ็บปวดทั้งหมด การศึกษามุ่งเน้นเฉพาะช่วงเวลาสั้นๆ หลังการผ่าตัดเพียง 5 วัน และการลดน้ำหนักถูกใช้เป็นตัวบ่งชี้หลักของความเจ็บปวด ซึ่งอาจไม่ครอบคลุมพฤติกรรมและสัญญาณทางสรีรวิทยาอื่นๆ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของศูนย์บริการสัตว์ทดลอง
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่กรุณา
ดูแลสัตว์ทดลองระหว่างการทำวิจัย และขอขอบคุณ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ให้ทุนสนับสนุนในการทำ
วิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Khera T, Rangasamy V. Cognition and pain: a review. *Front Psychol* 2021; 12: 673962. (11 pages).
2. Bourne S, Machado AG, Nagel SJ. Basic anatomy and physiology of pain pathways. *Neurosurg Clin* 2014; 25(4): 629-38.
3. Schaible HG, Richter F. Pathophysiology of pain. *Langenbeck's Arch Surg* 2004; 389(4): 237-43.
4. Matsumiya LC, Sorge RE, Sotocinal SG, Tabaka JM, Wieskopf JS, Zaloum A, et al. Using the Mouse Grimace Scale to reevaluate the efficacy of postoperative analgesics in laboratory mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2012; 51(1): 42-9.
5. Morton DB, Griffiths PH. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet Rec* 1985; 116(16): 431-6.
6. Langford DJ, Bailey AL, Chanda ML, Clarke SE, Drummond TE, Echols S, et al. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat Methods* 2010; 7(6): 447-9.
7. NC3Rs. Grimace scale: mouse. [online]. 2015; [cited 2024 Jun 22]; [8 screens]. Available from: URL: <https://nc3rs.org.uk/3rs-resources/grimace-scales/grimace-scale-mouse>.
8. Miller AL, Leach MC. The mouse grimace scale: a clinically useful tool?. *PloS one* 2015; 10(9): e0136000. (10 pages).
9. Chen D, Li X, Chen Y, Zeng H, Liu J, Li Q. Opioid dose, pain, and recovery following abdominal surgery: a retrospective cohort study. *J Clin Med* 2022; 11(24): 7320. (14 pages).
10. Peña OA, Martin P. Cellular and molecular mechanisms of skin wound healing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2024; 25(8): 599-616.
11. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res* 2009; 37(5): 1528-42.
12. NHS. Unintentional weight loss. [online]. 2019; [cited 2024 Jun 22]; [1 screen]. Available from: URL: <https://www.nhs.uk/conditions/unintentional-weight-loss>.
13. Vidal A, Jha S, Hassler S, Price T, Busso C. Face detection and grimace scale prediction of white furred mice. *Mach Learn Appl* 2022; 8: 100312. (9 pages).
14. Cho C, Michailidis V, Lecker I, Collymore C, Hanwell D, Loka M, et al. Evaluating analgesic efficacy and administration route following craniotomy in mice using the grimace scale. *Sci Rep* 2019; 9(1): 359. (9 pages).
15. Furumoto K, Sasaki Y, Nohara M, Takenaka N, Maeta N, Kanda T. Effects of a multimodal approach using buprenorphine with/without meloxicam on food intake, body weight, nest consolidating behavior, burrowing behavior, and gastrointestinal tissues in postoperative male mice. *Vet Sci* 2022; 9(11): 589. (13 pages).

Correlation between Post-Laparotomy Weight Loss and Pain in BALB/c and C57BL/6 Mice

Kwanchanok Dejoyong¹ and Krittee Dejoyong²

¹*Laboratory Animals Service Center, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkla 90110, Thailand*

²*Department of Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Prince of Songkla University, Songkla 90110, Thailand*

ABSTRACT The use of animal models in surgical research can induce significant pain, particularly in mammals, which respond to pain similarly to humans. Pain affects behavior, appetite, and weight loss after surgery. This study aimed to compare the effects of pain on pre- and post-operative weight in two strains of laboratory mice, BALB/c and C57BL/6, which received morphine for post-operative pain relief. The study also aimed to compare the level of pain expression through facial indicators (Facial Mouse Grimace Scale; fMGS) at various post-operative time points, relative to pre-operative conditions. The facial expressions of the mice were scored to assess changes corresponding to pain levels, and the correlation between weight loss and post-operative pain was evaluated. The results showed a 5% weight loss during the first 3–4 days post-surgery, followed by gradual weight gain thereafter. The findings indicated that while morphine alleviated pain, it did not provide complete relief. Furthermore, there was a correlation between pain and weight loss, with a coefficient of determination (R^2) of 0.82 and $p = 0.0125$ for BALB/c mice, and R^2 of 0.97 and $p = 0.0004$ for C57BL/6 mice. The pain assessment using the facial mouse grimace scale revealed that pain persisted until day 5 post-surgery. Therefore, despite the administration of opioid analgesics, post-operative weight loss was observed following abdominal surgery. It is recommended that pain management should be considered for prolonged pain relief including other analgesics and anti-inflammatory drugs that act through different mechanisms to relieve pain more effectively.

Keywords: Mice, Post-enterotomy, Weight, Pain

การศึกษาการใช้งานเว็บแอปพลิเคชันสำหรับการบริหาร เครื่องมือและวัสดุห้องปฏิบัติการทางการแพทย์: การยอมรับเทคโนโลยีและความพึงพอใจ

นิชาร์คม์ พรจิรณพนันท์^{1,2} เพชรรัตน์ พานทอง³ และ สมชาติ แตรตุลาการ⁴

¹บัณฑิตศึกษาศาสาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ปทุมธานี 12120

²ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 4 สระบุรี กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อำเภอมวกเหล็ก สระบุรี 18180

³ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร 10400

⁴ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ปทุมธานี 12120

บทคัดย่อ การบริหารเครื่องมือและวัสดุของห้องปฏิบัติการทางการแพทย์นั้นสำคัญในงานพัฒนาคุณภาพ ประเทศไทยมีระบบบริหารดังกล่าวที่พัฒนาขึ้นภายในประเทศอยู่น้อย การศึกษานี้นำเว็บแอปพลิเคชันสำหรับการบริหารเครื่องมือและวัสดุของห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ที่พัฒนามาก่อนหน้านี้ แต่ขาดการทดลองใช้งานในสถานพยาบาลและขาดการทดสอบการยอมรับเทคโนโลยี วัดอุปสรรคของการศึกษาเพื่อทดสอบการใช้งานและการยอมรับเทคโนโลยีของเว็บแอปพลิเคชันฯ ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ หลังทดลองใช้ให้ตอบแบบสอบถามเพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์เส้นทาง (β) ที่มีผลต่อการยอมรับเทคโนโลยี รวมถึงประเมินความพึงพอใจและข้อเสนอแนะ ผลพบค่าเฉลี่ยการยอมรับเทคโนโลยีและความพึงพอใจในระดับมาก (3.51–3.52) ค่าสถิติสมการโครงสร้างพบและความคาดหวังในการใช้งานและอิทธิพลทางสังคมมีความสัมพันธ์เชิงบวกและมีอิทธิพลโดยตรงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับความตั้งใจในการใช้งาน ที่ $\beta = 0.39$ และ 0.52 ตามลำดับ (ยอมรับเมื่อ $\beta > 0.10$ และ $p < 0.05$) โดยความคาดหวังในการใช้งานส่งผลผ่านอิทธิพลทางสังคม (Total Effect = 0.78 , $p < 0.05$) แสดงว่าทั้งความคาดหวังในการใช้งานและอิทธิพลทางสังคมเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการยอมรับเทคโนโลยีของระบบที่ทดสอบ ส่วนผู้ใช้งานเห็นวาระบบเว็บแอปพลิเคชันฯ ช่วยในการบริหารคลังน้ำยา วัสดุ และเครื่องมือได้อย่างเป็นระบบ แต่ควรปรับปรุงให้ใช้งานง่ายขึ้น ดังนั้นปัจจัยของอิทธิพลทางสังคมและความง่ายต่อการใช้งานมีส่วนผลักดันในการนำเว็บแอปพลิเคชันฯ มาใช้ เพื่อพัฒนาคุณภาพห้องปฏิบัติการทางการแพทย์และทำให้ทราบแนวทางการพัฒนาระบบต่อไป

คำสำคัญ: เว็บแอปพลิเคชัน, การบริหารเครื่องมือและวัสดุ, ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์, การประเมินการยอมรับเทคโนโลยี

Corresponding author E-mail: nicharas.ph@gmail.com

Received: 21 October 2024

Revised: 31 March 2025

Accepted: 31 March 2025

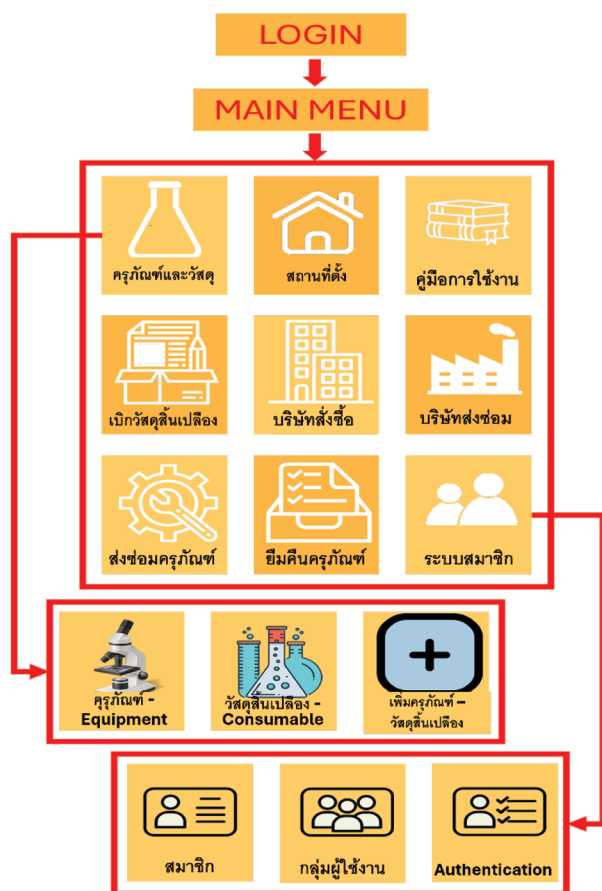
บทนำ

ในระบบการรับรองกระบวนการคุณภาพตามมาตรฐานโรงพยาบาลและบริการสุขภาพ (Healthcare Accreditation)⁽¹⁾ กล่าวถึงเครื่องมือและวัสดุทางการแพทย์ที่องค์กรต้องสร้างความมั่นใจว่า มีเครื่องมือที่จำเป็น พร้อมใช้งาน ทำหน้าที่ได้เป็นปกติ และต้องมีแผนบริหารเครื่องมือที่ได้ผล ปลอดภัย เชื่อถือได้ มีการคัดเลือก จัดทำ บัญชีรายการทดสอบก่อนการใช้งานครั้งแรก ตรวจสอบ ทดสอบ และบำรุงรักษาให้พร้อมใช้งาน ปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยีมาใช้ในการพัฒนาระบบบริหารจัดการข้อมูลในส่วนต่าง ๆ ทางห้องปฏิบัติการ เพื่อจัดการข้อมูลพื้นฐานที่เกี่ยวข้องให้เป็นระบบ รวดเร็ว ในการค้นหา ลดภาระงานของบุคลากร เพิ่มสมรรถนะในการทำงาน จึงมีผู้คิดค้นพัฒนาระบบเทคโนโลยีในรูปแบบต่าง ๆ มาใช้ในการพัฒนางานให้มีความเหมาะสม ทันสมัย และลดค่าใช้จ่าย ประเทศไทยมีการศึกษาและพัฒนาระบบสารสนเทศ เพื่อการจัดการเครื่องมือของห้องปฏิบัติการทางการแพทย์หรือโรงพยาบาล เช่น ระบบ Microsoft Access^(2,3) ระบบเว็บแอปพลิเคชันเครือข่าย WepMEt ในการจัดการเครื่องมือ อุปกรณ์ทางการแพทย์ในโรงพยาบาล^(4,5) เป็นต้น ซึ่งเป็นระบบเกี่ยวกับการบริหารจัดการเครื่องมือเพียงอย่างเดียว ในส่วนของงานที่เกี่ยวข้องกับระบบสารสนเทศในการจัดการคลังพัสดุ ส่วนใหญ่ในโรงพยาบาลมีการนำไปประยุกต์ใช้กับการบริหารคลังเวชภัณฑ์⁽⁶⁾ ซึ่งเป็นการนำเทคโนโลยีเครือข่าย (Network) มากำกับดูแล ผลการศึกษาพบว่า หลังจากการนำระบบดังกล่าวมาใช้งาน สามารถลดภาระงานของบุคลากรวิชาชีพด้านสาธารณสุข นำยากลับมาหมุนเวียนใช้ และทำให้มีข้อมูลในการจัดทำรายงานการเงินที่ถูกต้องครบถ้วนตามการใช้งานจริง นอกจากนี้ สุรียัน นิลทะราช และ สมบูรณ์ ชาวชายโขง⁽⁷⁾ ได้ศึกษาพัฒนาระบบสารสนเทศการบริหารงานพัสดุ เพื่อการควบคุมวัสดุภายในมหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร โดยวิเคราะห์กระบวนการทำงานและควบคุมพัสดุภายในหน่วยงาน พบว่าระบบการบริหารจัดการวัสดุและเครื่องมือของห้องปฏิบัติการทางการแพทย์แบบองค์รวมที่พัฒนาภายในประเทศนั้นมีอยู่อย่างจำกัดและมีใช้งานเฉพาะภายในหน่วยงาน อีกทั้ง

มีบริบทที่แตกต่างจากห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ทำให้ Sritart H. และคณะ⁽⁸⁾ ได้พัฒนาระบบเว็บแอปพลิเคชันสำหรับการบริหารเครื่องมือและวัสดุแบบองค์รวม ซึ่งต่อไปนี้เรียกว่า “เว็บแอปพลิเคชัน” โดยเปรียบเสมือนโปรแกรมจัดเก็บฐานข้อมูลของเครื่องมือและวัสดุที่ใช้งานภายในหน่วยงานหรือห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีหลักการใช้งานที่สำคัญ ได้แก่ 1) ระบบสมาชิกและสิทธิ์การใช้งาน เพื่อการสร้างและกำหนดสิทธิ์บัญชีของผู้ใช้งาน 2) ระบบทะเบียนวัสดุอุปกรณ์ น้ยา ซึ่งผู้ใช้งานต้องทำการลงทะเบียนสถานที่ตั้งของการจัดเก็บวัสดุสิ้นเปลืองก่อนจึงทำการลงทะเบียนเพิ่มวัสดุสิ้นเปลือง 3) ระบบทะเบียนครุภัณฑ์ เครื่องมือ โดยผู้ใช้งานต้องทำการลงทะเบียนสถานที่ตั้งของการจัดเก็บครุภัณฑ์หรือเครื่องมือก่อน จึงจะสามารถทำการลงทะเบียนเพิ่มครุภัณฑ์หรือเครื่องมือได้ 4) ระบบการสั่งซื้อ ผู้ใช้งานต้องทำการลงทะเบียนบริษัทสั่งซื้อ เพิ่มเอกสารการสั่งซื้อ และเพิ่มรายการครุภัณฑ์ วัสดุสิ้นเปลืองตามใบสั่งซื้อ 5) ระบบการเบิกวัสดุสิ้นเปลือง โดยระบบนี้ผู้ใช้งานสามารถสร้างเอกสารและลงรายการเบิกวัสดุสิ้นเปลืองได้ 6) ระบบซ่อมบำรุงครุภัณฑ์ เครื่องมือ ซึ่งผู้ใช้งานสามารถลงทะเบียนบริษัทซ่อมบำรุงครุภัณฑ์หรือเครื่องมือ เพิ่มเอกสารซ่อมบำรุงครุภัณฑ์หรือเครื่องมือ และเพิ่มรายการครุภัณฑ์ตามใบส่งซ่อม 7) ระบบยืม/คืนครุภัณฑ์ เครื่องมือ โดยระบบนี้สามารถสร้างเอกสารลงรายการยืมหรือคืนครุภัณฑ์หรือเครื่องมือได้ 8) ระบบคู่มือ และเอกสารบำรุงรักษา เป็นระบบที่ให้ผู้ใช้งานสามารถบันทึกข้อมูลของคู่มือและเอกสารบำรุงรักษาเก็บไว้ในรูปแบบเอกสารอิเล็กทรอนิกส์ได้ 9) ระบบการสืบค้นข้อมูล โดยผู้ใช้งานสามารถสืบค้นข้อมูลของสถานที่ตั้ง/เก็บ ชื่อ เลขรหัสสินค้า หรือยี่ห้อ/รุ่น ของเครื่องมือหรือวัสดุอุปกรณ์สิ้นเปลืองได้ และ 10) ระบบสรุปและรายงาน เพื่อให้ผู้ใช้งานสามารถดูสรุปและรายงานข้อมูลของทะเบียนครุภัณฑ์และวัสดุสิ้นเปลืองได้ โดยเว็บแอปพลิเคชันที่พัฒนาขึ้นใหม่นี้แตกต่างจากโปรแกรมฐานข้อมูลหรือสินค้าคงคลังอื่น คือ พัฒนาให้สามารถใช้งานกับอุปกรณ์หรือระบบปฏิบัติการที่หลากหลายมากขึ้นเพราะสามารถใช้งานได้ทั้งบนคอมพิวเตอร์ โทรศัพท์เคลื่อนที่หรือแท็บเล็ต และเป็นระบบภาษาไทย

ที่ครอบคลุมความต้องการพื้นฐานในบริบทของห้องปฏิบัติการทางแพทย์ทั้งด้านการจัดเก็บ จัดซื้อ การยืมคืน การซ่อมบำรุงรักษา และการรวบรวมสรุปข้อมูลของ ครุภัณฑ์ เครื่องมือ และวัสดุสิ้นเปลืองที่รวมกันเป็นเว็บแอปพลิเคชัน

การใช้งานเว็บแอปพลิเคชันฯ ผู้ใช้งานต้องได้รับการสร้างสมาชิกในระบบเพื่อลงชื่อเข้าใช้ (Log in) และเข้าสู่เมนูหลัก (Main Menu) ประกอบด้วย ครุภัณฑ์ และวัสดุ (มีเมนูย่อยคือ ครุภัณฑ์ (Equipment), วัสดุสิ้นเปลือง (Consumable), และเพิ่มครุภัณฑ์-วัสดุสิ้นเปลือง) กลุ่มผู้ใช้งาน การกำหนดสิทธิ์ (Authentication) สถานที่ตั้ง คู่มือการใช้งาน เบิกวัสดุสิ้นเปลือง บริษัทส่งซื้อ บริษัทส่งซ่อม ส่งซ่อมครุภัณฑ์ ยืมคืนครุภัณฑ์ และระบบสมาชิก (มีเมนูย่อย คือ สมาชิก กลุ่มผู้ใช้งาน และการกำหนดสิทธิ์ (Authentication)) ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้างของเว็บแอปพลิเคชันฯ และลำดับการใช้งาน⁽⁸⁾

อย่างไรก็ตามระบบเว็บแอปพลิเคชันที่ถูกพัฒนาขึ้นมาแล้วในปัจจุบันนี้ ยังขาดการทดสอบระบบในสถานะหรือสถานที่ปฏิบัติงานจริงซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญในการทดสอบซอฟต์แวร์ที่พัฒนา⁽⁹⁾ เพราะการทดสอบซอฟต์แวร์โดยผู้ใช้งานจริงนั้นเป็นปรากฏการณ์สุดท้ายที่สามารถประเมินคุณภาพและสามารถระบุข้อผิดพลาดในทางปฏิบัติได้ นอกจากนี้การทดสอบการยอมรับของผู้ใช้งานเป็นขั้นตอนหนึ่งของการทดสอบซอฟต์แวร์⁽⁹⁾ ในการศึกษาเลือกใช้ทฤษฎีการรวมกันของการยอมรับเทคโนโลยีสารสนเทศ (Unified Theory of Acceptance and Use of Technology, UTAUT)⁽¹⁰⁾ เนื่องจากเป็นทฤษฎีที่ใช้ศึกษาพฤติกรรมการยอมรับการใช้เทคโนโลยีและนวัตกรรมใหม่ ๆ ที่พัฒนาขึ้นจากการวิเคราะห์และนำจุดเด่นของแต่ละทฤษฎีหรือแนวคิดที่เกี่ยวข้องกับการยอมรับเทคโนโลยี 8 ทฤษฎีมารวมกัน ประกอบด้วยทฤษฎีการกระทำตามหลักเหตุผล (The Theory of Reasoned Action, TRA) แบบจำลองการยอมรับเทคโนโลยี (Technology Acceptance Model, TAM) แบบจำลองแรงจูงใจ (Motivation Model, MM) ทฤษฎีพฤติกรรมตามแบบแผน (Theory of Planned Behavior, TPB) ทฤษฎีความสัมพันธ์ TAM และ TPB (Combined TAM and TPB, c-TAM-TPB) แบบจำลองการใช้คอมพิวเตอร์ส่วนบุคคล (Model of Personal Computer Utilization, MPCU) และทฤษฎีการเผยแพร่วัตกรรม (Diffusion of Innovation Theory, DOI) ได้ข้อสรุปว่า ความตั้งใจการใช้งานมีอิทธิพลโดยตรงกับพฤติกรรมการใช้งาน (Use Behavior) และขึ้นอยู่กับ 3 ปัจจัยหลัก คือ 1) ความคาดหวังในประสิทธิภาพ 2) ความคาดหวังในการใช้งาน และ 3) อิทธิพลทางสังคม ส่วนสิ่งอำนวยความสะดวก (Facilitating Conditions) เป็นปัจจัยที่มีผลโดยตรงต่อพฤติกรรมการใช้งาน ทฤษฎี UTAUT มีประสิทธิภาพเหนือกว่าทฤษฎีทั้ง 8 มีค่า adjusted R² ประมาณ 70%⁽¹⁰⁾ ประกอบกับ UTAUT มีการนำมาใช้ในการศึกษาหลายด้าน เช่น การศึกษา⁽¹¹⁾ การเงินและธนาคาร⁽¹²⁾ ระบบสารสนเทศ^(13,14) และระบบบริการสุขภาพ^(15,16) เป็นต้น การศึกษาที่ใช้ทฤษฎีนี้ในระบบบริการสุขภาพ ได้แก่ การแพทย์ทางไกล^(17,18) สารสนเทศ

ในระบบสุขภาพ^(8,19,20) อุปกรณ์และสื่ออินเทอร์เน็ตทางการแพทย์⁽²¹⁾ งานเวชระเบียน⁽²²⁾ เป็นต้น ซึ่งสอดคล้องกับบริบทในการศึกษาครั้งนี้ที่เป็นห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ในโรงพยาบาล และสุดท้ายผู้วิจัยทำการประเมินความพึงพอใจของผู้ใช้งานจริงในโรงพยาบาลที่เข้าร่วมวิจัย โดยประเมินในด้านการใช้งาน ความน่าเชื่อถือ การออกแบบ และความยืดหยุ่น ซึ่งการประเมินการยอมรับเทคโนโลยีและความพึงพอใจจะเป็นการประเมินความน่าเชื่อถือและคุณภาพของเว็บแอปพลิเคชันฯ โดยสามารถนำผลการศึกษาที่ได้ไปใช้ในการพัฒนาหรือแก้ไขข้อผิดพลาดและปัญหาต่างๆ ที่พบในผู้ใช้งานจริง เพื่อให้ได้ระบบที่มีความสมบูรณ์เหมาะสมและตรงกับความต้องการตามบริบทของผู้ใช้งานในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์มากที่สุด รวมทั้งเป็นข้อมูลเชิงประจักษ์ของการยอมรับเทคโนโลยี และความพึงพอใจต่อคุณลักษณะด้านต่างๆ ที่นำไปมุ่งเน้นพัฒนาคุณลักษณะด้านนั้นๆ ให้ดียิ่งขึ้น เหมาะแก่การใช้ประโยชน์ในการพัฒนาคุณภาพระบบห้องปฏิบัติการทางการแพทย์

ดังนั้นในการศึกษานี้จึงทำการประเมินการยอมรับเทคโนโลยีและความพึงพอใจในการใช้งานจริงในโรงพยาบาลด้วย ซึ่งคณะผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบการใช้งานเว็บแอปพลิเคชันฯ และทำการวิเคราะห์การยอมรับเทคโนโลยีเพื่อศึกษาอิทธิพลของปัจจัยด้านความคาดหวังในประสิทธิภาพ (Performance Expectancy) ความคาดหวังในการใช้งาน (Effort Expectancy) อิทธิพลทางสังคม (Social Influence) และความปลอดภัย (Security) ต่อความตั้งใจในการใช้งาน (Behavioral Intention) ที่เป็นตัวแปรที่แสดงถึงการยอมรับเทคโนโลยี

วัสดุและวิธีการ

อาสาสมัคร

อาสาสมัคร คือ บุคลากรห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ทั้งหมดของโรงพยาบาลในภาคกลางของประเทศไทย ที่ได้รับความยินยอมและสมัครใจเข้าร่วมการทดสอบ จำนวน 10 แห่ง ได้แก่ โรงพยาบาลเจ้าพระยาอภัยภูเบศร โรงพยาบาลสระบุรี โรงพยาบาลภูมิพลอดุลยเดช โรงพยาบาลพหลพลพยุหเสนา โรงพยาบาล

ปทุมธานี โรงพยาบาลอ่างทอง โรงพยาบาลหนองแค โรงพยาบาลมวกเหล็ก โรงพยาบาลนพรัตนราชธานี และโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ โดยกลุ่มตัวอย่างเป็นบุคลากรห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ที่ตรงกับเกณฑ์คัดเลือก คือ เป็นบุคลากรห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ของโรงพยาบาลหรือสถาบันที่สมัครใจเข้าร่วมวิจัย และสามารถใช้คอมพิวเตอร์หรือมือถือได้อ่าน เขียน และเข้าใจภาษาไทยได้ เกณฑ์การคัดออก คือ บุคลากรที่ไม่สนใจหรือไม่สามารถเข้าร่วมการวิจัยได้ตามระยะเวลาการทดสอบหรือไม่สามารถใช้เว็บแอปพลิเคชันฯ ได้ การวิจัยครั้งนี้ทำการทดสอบการใช้งานและการยอมรับเทคโนโลยีของเว็บแอปพลิเคชันฯ โดยใช้การวิเคราะห์ตามสถิติสมการโครงสร้าง (Structural Equation Model) ด้วยวิธี Partial Least Square หรือ PLS-SEM และเนื่องด้วยข้อจำกัดของเว็บแอปพลิเคชันฯ ในการศึกษาครั้งนี้เป็นระบบที่พัฒนาขึ้นในขั้นต้นเพื่อการศึกษาวิจัยเท่านั้นและเป็นระบบปิด มิได้เผยแพร่เป็นระบบสาธารณะ อีกทั้งต้องมีการฝึกและทดลองใช้งานเป็นเวลานานอย่างน้อย 2 เดือน ทำให้จำนวนผู้ใช้งานหรือกลุ่มตัวอย่างที่เป็นบุคลากรในห้องปฏิบัติการทางแพทย์มีอยู่อย่างจำกัด จึงเลือกใช้วิธีการคำนวณตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ PLS-SEM วิธี Inverse Square Root Method⁽²³⁾ โดยกำหนดค่าระดับนัยสำคัญ $\alpha = 0.05$ หรือความเชื่อมั่น 95% และเพื่อให้เห็นจากการศึกษาของทฤษฎี UTAUT มีค่าสัมประสิทธิ์เส้นทางความสัมพันธ์ (Path Coefficients หรือ β) ของตัวแปรต้น (ความคาดหวังในประสิทธิภาพ ความคาดหวังในการใช้งาน อิทธิพลทางสังคม) ต่อตัวแปรตาม (ความตั้งใจในการใช้งาน) เฉลี่ย 0.31⁽¹⁰⁾ จากตารางขนาดตัวอย่าง⁽²⁴⁾ โดยวิธี Inverse Square Root Method ที่ระดับค่าสัมประสิทธิ์เส้นทางความสัมพันธ์ 0.31 และระดับนัยสำคัญ $\alpha = 0.05$ ต้องใช้ตัวอย่างจำนวน 39 ตัวอย่าง แต่เมื่อคิดรวมโอกาสที่ผู้ร่วมวิจัยจะถอนตัวที่ 15% จึงมีจำนวนตัวอย่างที่เก็บจากทุกโรงพยาบาลรวมกัน 45 คน

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

ระบบสารสนเทศ คือ เว็บแอปพลิเคชันฯ

แบบสอบถามที่ผู้วิจัยสร้างขึ้นจากการทบทวนวรรณกรรม ทฤษฎี มาตรฐานของการทดสอบซอฟต์แวร์

การยอมรับเทคโนโลยี และความพึงพอใจ แบ่งออกเป็น 4 ส่วน ได้แก่

ส่วนที่ 1 ข้อมูลพื้นฐานของผู้ตอบแบบสอบถาม ได้แก่ เพศ อายุ ระดับการศึกษา ตำแหน่ง ห้องปฏิบัติการ ประสบการณ์การใช้งานโปรแกรมด้านฐานข้อมูล การบันทึกการจัดการเครื่องมือหรือวัสดุสิ้นเปลือง และสถานะของผู้ใช้งานระบบ (ผู้ใช้งานทั่วไป ผู้ดูแลระบบ ผู้บริหาร) เพื่อนำมาใช้วิเคราะห์ปัจจัยหรือความสัมพันธ์ด้านประชากรศาสตร์ต่อการยอมรับเทคโนโลยีและความพึงพอใจ

ส่วนที่ 2 การประเมินการยอมรับเทคโนโลยี (Technology Acceptance) ของเว็บแอปพลิเคชัน^๖ โดยมีข้อคำถามเกี่ยวกับตัวแปรความคาดหวังในประสิทธิภาพ (Performance Expectancy, PE) คือ ผู้ใช้งานระบบมีความคาดหวังว่า ระบบจะมีประโยชน์ในการบริหารเครื่องมือและวัสดุ ทำให้ปฏิบัติงานสำเร็จได้รวดเร็วมากขึ้น และทำงานได้มากขึ้น (Productivity) ในระดับใด ตัวแปรความคาดหวังในการใช้งาน (Effort Expectancy, EE) คือ ผู้ใช้งานระบบมีความคาดหวังว่า ระบบจะมีการใช้งานที่ง่าย สามารถเรียนรู้การใช้งานได้ง่าย และสามารถใช้งานได้อย่างคล่องแคล่วในระดับใด ตัวแปรอิทธิพลทางสังคม (Social Influence, SI) คือ ผู้ใช้งานระบบตั้งสมมติฐานว่า เพื่อนร่วมงาน หัวหน้างาน และผู้บริหารองค์กร มีผลต่อการนำระบบนี้มาใช้งานในระดับใด ตัวแปรความปลอดภัย (Security, S) คือ ผู้ใช้งานระบบคิดว่า โปรแกรมมีความปลอดภัยในการป้องกันการเข้าใช้งานโดยไม่ได้รับอนุญาต มีการแบ่งประเภทและจำกัดสิทธิ์ผู้ใช้งานเพื่อให้ระบบมีความปลอดภัยทั้งรูปแบบออนไลน์และออฟไลน์มีความปลอดภัยในระดับใด และตัวแปรความตั้งใจในการใช้งาน (Behavioral Intention, BI) คือ ผู้ใช้งานระบบคิดว่าถ้าหากมีระบบนี้ให้เลือกใช้ในการปฏิบัติงาน คาดว่า จะใช้งานระบบหรือตั้งใจที่จะใช้งานระบบในระดับใด โดยปรับรายการข้อคำถามอ้างอิงตามทฤษฎีของ UTAUT⁽¹⁰⁾ และงานวิจัยของ Huser V และคณะ⁽²²⁾

ส่วนที่ 3 การประเมินความพึงพอใจต่อการใช้งานเว็บแอปพลิเคชัน^๖ มีการประเมินด้านการใช้งาน ความน่าเชื่อถือ การออกแบบ และความยืดหยุ่น

ส่วนที่ 4 คำถามปลายเปิดเพื่อสอบถามความต้องการที่ผู้ทดลองใช้งานอยากให้ปรับปรุง แก้ไข และความคิดเห็นหรือข้อเสนอแนะเพิ่มเติม

แบบสอบถามทุกส่วนมีค่าดัชนีความตรงตามเนื้อหา (Index of Item-objective Congruence, IOC)⁽²⁵⁾ ที่ประเมินโดยผู้เชี่ยวชาญ 3 ท่าน (มีความเชี่ยวชาญในด้านระบาดวิทยา ระบบคุณภาพและการบริหารจัดการห้องปฏิบัติการ และจุลชีววิทยา) อยู่ระหว่าง 0.67-1 แบบสอบถามส่วนที่ 2 และ 3 เป็นระดับความคิดเห็นตามมาตรวัดเจตคติแบบลิเคิร์ต (Likert Scale)⁽²⁶⁾ แบ่งเป็น 5 ระดับ คือ 1-5 ซึ่งแปลผลเป็นช่วงคะแนนเฉลี่ย โดยคะแนน 4.51-5.00 หมายถึง ระดับความคิดเห็นหรือพึงพอใจมากที่สุด คะแนน 3.51-4.50 หมายถึง ระดับความคิดเห็นหรือพึงพอใจมาก คะแนน 2.51-3.50 หมายถึง ระดับความคิดเห็นหรือพึงพอใจปานกลาง คะแนน 1.51-2.50 หมายถึง ระดับความคิดเห็นหรือพึงพอใจน้อย และคะแนน 1.00-1.50 หมายถึง ระดับความคิดเห็นหรือพึงพอใจน้อยที่สุด⁽²⁷⁾ แบบสอบถามส่วนที่ 2 และ 3 มีค่าความเชื่อมั่นสัมประสิทธิ์อัลฟาของครอนบาค (Cronbach's Alpha Coefficient)⁽²⁸⁾ เท่ากับ 0.93 และ 0.95 ตามลำดับ

ขั้นตอนการเก็บรวบรวมข้อมูล

บุคลากรในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ของโรงพยาบาลที่เข้าร่วมวิจัยได้รับการติดตั้งระบบเว็บแอปพลิเคชัน^๖ จากคณะผู้วิจัย และได้รับการชี้แจงวัตถุประสงค์ ขั้นตอนและวิธีการใช้งานระบบ และขั้นตอนการวิจัย โดยไม่มีการระบุตัวบุคคล อาสาสมัครผู้ใช้งานระบบสามารถปฏิเสธการเข้าร่วมวิจัยหรือถอนตัวโดยไม่มีผลกระทบใดๆ ต่ออาสาสมัคร หลังจากการติดตั้งระบบเว็บแอปพลิเคชัน^๖ โดยมีการสร้างบัญชีผู้ใช้ตามบทบาทหน้าที่ของผู้ใช้แต่ละบุคคลที่ร่วมทดสอบ ผู้ใช้งานมีระยะเวลาการทดลองใช้งานระบบ 2 เดือน จากนั้นจึงทำแบบสอบถามการยอมรับเทคโนโลยีและความพึงพอใจด้วยตนเอง และเก็บรวบรวมข้อมูล บันทึกข้อมูลลงโปรแกรม Microsoft Excel เพื่อนำไปวิเคราะห์ผลการวิจัยในภาพรวม

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติพรรณนา (Descriptive Statistics) ได้แก่ ร้อยละ ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เพื่อแสดงข้อมูลเกี่ยวกับลักษณะทางประชากรศาสตร์ การยอมรับเทคโนโลยี และความพึงพอใจ การทดสอบการกระจายตัวของข้อมูลแบบปกติ (Normality Test) ของคะแนนระดับความคิดเห็น ถูกวิเคราะห์ด้วยสถิติ Shapiro-Wilk Test นอกจากนี้ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติอนุมาน (Inferential Statistics) โดยทดสอบความสัมพันธ์ของตัวแปรด้วยสถิติ Spearman's Correlation การทดสอบการยอมรับเทคโนโลยีด้วยการวิเคราะห์สถิติสมการโครงสร้างวิธี PLS-SEM ซึ่งเป็นเทคนิคสำหรับการสร้างและการทดสอบโมเดลสมการโครงสร้างที่มีความซับซ้อน มักใช้ในการวิจัยที่มุ่งเน้นการทำนายและไม่จำเป็นต้องมีการกระจายตัวของข้อมูลแบบปกติ สามารถใช้กับขนาดตัวอย่างที่เล็ก เหมาะสำหรับการวิเคราะห์ที่มีตัวแปรที่ไม่สามารถวัดได้โดยตรงหรือตัวแปรแฝง (Latent Variables)⁽²⁹⁾ ซึ่ง PLS-SEM สามารถบอกขนาดอิทธิพลของปัจจัยหรือตัวแปรต้นที่มีต่อตัวแปรตามด้วยค่าสัมประสิทธิ์เส้นทางความสัมพันธ์ (Path Co-efficients หรือ β) นอกจากนี้ยังบอกความสัมพันธ์และความสามารถทำนายค่าของตัวแปรตามจากตัวแปรต้นด้วยค่า R^2 ซึ่งจากรายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ UTAUT มีการใช้สถิติ PLS-SEM^(19,20,30-34) ในการวิเคราะห์ข้อมูล โดยงานวิจัยนี้เลือกใช้โปรแกรม Smart-PLS 4⁽³⁵⁾ ในการวิเคราะห์ PLS-SEM และสถิติอื่นๆ วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Jamovi 2.5⁽³⁶⁾ โดยกำหนดค่านัยสำคัญทางสถิติเมื่อ $p < 0.05$ ที่ระดับนัยสำคัญ $\alpha = 0.05$ ความแตกต่างของความตั้งใจในการใช้งานหรือความพึงพอใจต่อตัวแปร เพศ อายุ ประสบการณ์ และขนาดโรงพยาบาลสถานะของผู้ใช้งาน ทดสอบโดยใช้สถิติ Mann-Whitney U ถ้าตัวแปรแบ่งเป็น 2 กลุ่ม และใช้สถิติ Kruskal Wallis test ถ้ามากกว่า 2 กลุ่ม

จริยธรรมการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงสำรวจ (Survey Research) และเชิงพรรณนา (Descriptive Research) ได้รับการพิจารณาและรับรองจาก

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์ โครงการเลขที่ COA No. 108/2566

ผล

ส่วนที่ 1 ข้อมูลพื้นฐาน

คุณลักษณะทางประชากรศาสตร์ของอาสาสมัคร

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่าอาสาสมัครผู้ใช้งานระบบและตอบแบบสอบถามทั้งหมด จำนวน 45 คน โดยเป็นเพศหญิง ร้อยละ 71.11% เพศชาย ร้อยละ 28.89% มีค่าเฉลี่ยอายุอยู่ที่ 36.11 ± 10.55 ปี มีการศึกษาอยู่ในระดับปริญญาตรี ร้อยละ 73.33 รองลงมาอยู่ในระดับสูงกว่าปริญญาตรี ร้อยละ 17.78 และน้อยสุดอยู่ในระดับต่ำกว่าปริญญาตรี ร้อยละ 8.89 โดยปฏิบัติงานในตำแหน่งนักเทคนิคการแพทย์ ร้อยละ 57.78 มากที่สุด รองลงมา เป็นหัวหน้าห้องปฏิบัติการหรือส่วนงาน ร้อยละ 22.22 ที่เหลือเป็นนักวิทยาศาสตร์ ร้อยละ 11.11 และตำแหน่งอื่นๆ ร้อยละ 8.89

ผู้ตอบแบบสอบถามส่วนใหญ่มีประสบการณ์ในการใช้งานโปรแกรมฐานข้อมูล เช่น Microsoft Access หรือ Excel ตั้งแต่ 3 ปีขึ้นไป ร้อยละ 88.89 ที่เหลือมีประสบการณ์น้อยกว่า 3 ปี ร้อยละ 11.11 ลักษณะงานที่ปฏิบัติอยู่ในกลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ ร้อยละ 11.11 จุลชีววิทยาคลินิก ร้อยละ 6.67 เคมีคลินิก ร้อยละ 15.56 ภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก ร้อยละ 8.89 ธนาคารเลือด ร้อยละ 24.44 โลหิตวิทยา ร้อยละ 13.33 และห้องปฏิบัติการอื่นๆ เช่น อนุชีวโมเลกุล ผู้ป่วยนอก ฯลฯ ร้อยละ 20.00

การบันทึกข้อมูลของการจัดการคลังวัสดุและเครื่องมือส่วนใหญ่เป็นการจดบันทึกลงสมุดหรือแฟ้มข้อมูล ร้อยละ 33.33 มีการใช้โปรแกรมสำเร็จรูปของ Laboratory Information System (LIS) หรือ Hospital Information System (HIS) ร้อยละ 26.67 ที่เหลือเป็นการบันทึกด้วยโปรแกรมตั้งแต่ 2 รูปแบบขึ้นไป เช่น Microsoft Excel หรือ Microsoft Access ร้อยละ 28.89 หรือโปรแกรมที่พัฒนาขึ้นเอง ร้อยละ 11.11 ในส่วนของฐานะผู้ใช้งานเว็บแอปพลิเคชันฯ เป็นผู้ใช้งานในหน้าที่มากที่สุด ร้อยละ 71.11 รองลงมาเป็นผู้ดูแลระบบ ร้อยละ 17.78 และผู้บริหาร ร้อยละ 11.11 ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 คุณลักษณะทางประชากรศาสตร์ของอาสาสมัคร

คุณลักษณะ	จำนวน (คน)	ร้อยละ
เพศ		
ชาย	13	28.89
หญิง	32	71.11
อายุ เฉลี่ย 36.11 ± 10.55 ปี		
การศึกษา		
ต่ำกว่าปริญญาตรี	4	8.89
ปริญญาตรี	33	73.33
สูงกว่าปริญญาตรี	8	17.78
ตำแหน่ง		
นักวิทยาศาสตร์	5	11.11
นักเทคนิคการแพทย์	26	57.78
หัวหน้าห้องปฏิบัติการหรือส่วนงาน	10	22.22
อื่นๆ	4	8.89
ประสบการณ์การใช้งานโปรแกรมฐานข้อมูล		
น้อยกว่า 3 ปี	5	11.11
ตั้งแต่ 3 ปีขึ้นไป	40	88.89
ห้องปฏิบัติการ		
กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์	5	11.11
จุลชีววิทยาคลินิก	3	6.67
เคมีคลินิก	7	15.56
ภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก	4	8.89
ธนาคารเลือด	11	24.44
โลหิตวิทยา	6	13.33
อื่นๆ	9	20.00
การบันทึกข้อมูล		
บันทึกลงโปรแกรมที่พัฒนาขึ้นเอง	5	11.11
บันทึกลงโปรแกรมสำเร็จรูปที่มากับระบบ LIS/HIS	12	26.67
บันทึกลงสมุดหรือแฟ้มข้อมูล	15	33.33
มีการบันทึกข้อมูลตั้งแต่ 2 ระบบขึ้นไป เช่น Microsoft Excel หรือ Microsoft Access	13	28.89
สถานะผู้ใช้งานระบบ		
ผู้ดูแลระบบ	8	17.78
ผู้บริหาร	5	11.11
ผู้ใช้งานในหน้าที่	32	71.11
จำนวนอาสาสมัครทั้งหมด	45	100.00

ส่วนที่ 2 การประเมินการยอมรับเทคโนโลยีของเว็บแอปพลิเคชัน

เมื่ออาสาสมัครใช้งานเว็บแอปพลิเคชันเป็นเวลา 2 เดือน จึงทำแบบสอบถามการยอมรับเทคโนโลยี ผลการวิเคราะห์ข้อมูลจากสถิติพรรณนา ดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่าผู้ใช้งานมีความตั้งใจในการใช้งานเฉลี่ยที่ระดับ 3.52 ± 0.99 ความคาดหวังในประสิทธิภาพเฉลี่ยที่ระดับ 3.81 ± 0.787 ความคาดหวังในการใช้งานเฉลี่ยที่ระดับ 3.67 ± 0.911 อิทธิพลทางสังคมเฉลี่ยที่ระดับ 3.58 ± 0.872 และความปลอดภัยเฉลี่ยที่ระดับ 3.96 ± 0.638 ซึ่งเมื่อแปลผลระดับความคิดเห็นตามมาตรวัดเจตคติแบบลิเคิร์ต ได้ความได้ว่า ผู้ใช้งานระบบมีระดับความเห็นด้วยมากในทุกด้าน เมื่อวิเคราะห์จากทฤษฎี UTAUT โดยความตั้งใจในการใช้งานเป็นปัจจัยโดยตรงต่อการยอมรับเทคโนโลยี และปัจจัยที่มีอิทธิพลโดยตรงต่อความตั้งใจในการใช้งาน ได้แก่ ความคาดหวังในประสิทธิภาพ ความคาดหวังในการใช้งาน และอิทธิพลทางสังคม ดังนั้นผู้วิจัยจึงนำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ตามสมการโครงสร้างด้วยวิธี PLS-SEM โดยมีตัวแปรแฝง (Latent Variable) ซึ่งเป็นปัจจัยที่ต้องการทดสอบ ได้แก่ ความตั้งใจในการใช้งาน ความคาดหวังในประสิทธิภาพ ความคาดหวังในการใช้งาน อิทธิพลทางสังคม และความปลอดภัย โดยตัวแปรแฝงนี้เป็นตัวแปรที่สะท้อนมาจากตัวแปรสังเกตได้ (Observed Variable) ซึ่งเป็นรายการข้อคำถาม (ตารางที่ 2) จากนั้นทำการทดสอบความปกติของข้อมูล (Normality Test) ของตัวแปรแฝงและตัวแปรสังเกตด้วยสถิติ Shapiro-Wilk Test ซึ่งให้ค่า $p < 0.05$ ($< 0.001 - 0.039$) ทั้งหมดยกเว้นอิทธิพลทางสังคมเท่านั้นที่มีค่ามากกว่า 0.05 ($p = 0.069$) ซึ่งแสดงว่ามีเพียงอิทธิพลทางสังคมเท่านั้นที่มีการกระจายตัวที่ปกติ ($p > 0.05$)

เมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของตัวแปรแฝง จึงใช้ Spearman's Correlation (ρ) ซึ่งเป็นสถิติ Non-parametric ดังแสดงในตารางที่ 3 โดยพบว่าความตั้งใจในการใช้งานมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับ ความคาดหวังในประสิทธิภาพ ($\rho = 0.64$) ความคาดหวังในการใช้งาน ($\rho = 0.73$) และอิทธิพลทางสังคม ($\rho = 0.79$) แต่ไม่มีความสัมพันธ์

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) กับความปลอดภัย ($\rho = 0.27$)

ผลของการตรวจสอบโมเดลการวัด (Measurement Model) ก่อนที่ทำการวิเคราะห์สมการโครงสร้าง พบว่าค่าน้ำหนักองค์ประกอบ (Factor Loadings) ของตัวแปรสังเกตได้หรือรายการคำถาม (ตารางที่ 2) ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงความเชื่อมั่นของดัชนีวัด มีค่าอยู่ระหว่าง 0.88–0.98 ($p < 0.05$, ภาพที่ 2) โดยค่านี้ต้องมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 0.7 และมีนัยสำคัญทางสถิติ⁽²⁴⁾ จึงถือว่ายอมรับได้ แสดงว่าทุกรายการข้อคำถามในแบบสอบถามมีความแม่นยำในการสะท้อนถึงตัวแปรแฝงแต่ละตัว นอกจากนี้ค่าความเชื่อมั่นของรายการข้อคำถามยังสามารถบอกได้จากค่า Cronbach's Alpha ค่าความเชื่อมั่นเชิงองค์ประกอบ (Composite Reliability, CR) โดยแบ่งเป็น CR ρ_A ซึ่งแสดงถึงความสัมพันธ์ของรายการข้อคำถามแต่ละข้อภายใต้ตัวแปรแฝงเดียวกัน และ ρ_C ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ของรายการข้อคำถามทุกข้อรวมกันกับตัวแปรแฝง การศึกษาครั้งนี้พบว่าทุกตัวแปรแฝงมีค่า Cronbach's Alpha อยู่ในช่วง 0.86 – 0.96 มีค่า CR ρ_A อยู่ในช่วง 0.90–0.96 และมีค่า CR ρ_C อยู่ในช่วง 0.90–0.98 (ตารางที่ 2) ซึ่งทุกค่าตรงกับเงื่อนไขการยอมรับตามเกณฑ์ที่มากกว่า 0.70⁽²⁴⁾ ส่วนค่าความเที่ยงตรงเชิงเหมือน (Convergent Validity) เป็นการตรวจสอบว่าตัวแปรสังเกตได้ที่เราใช้ในการวัดตัวแปรแฝงนั้นมีความสัมพันธ์กันเพียงใด โดยความเที่ยงตรงเชิงเหมือนสามารถใช้ค่าเฉลี่ยของความแปรปรวนที่ถูกสกัดได้ (Average Variance Extracted, AVE) เป็นตัวบ่งชี้และต้องมีค่ามากกว่า 0.5⁽²⁴⁾ จากการวิเคราะห์ค่า AVE (ตารางที่ 2) พบว่าทุกตัวแปรแฝงที่นำมาทดสอบมีค่าอยู่ในช่วง 0.70–0.96 แสดงว่าทุกรายการข้อคำถามหรือตัวแปรสังเกตได้ของตัวแปรแฝงมีความสัมพันธ์กันและสามารถวัดตัวแปรแฝงได้อย่างแม่นยำ การประเมินความเที่ยงตรงเชิงจำแนก (Discriminant Validity) โดยใช้ค่า Heterotrait-Monotrait Ratio of Correlations (HTMT) พบว่าทุกคู่ความสัมพันธ์ของตัวแปรแฝงมีค่าอยู่ในช่วง 0.25–0.84 ซึ่งต่ำกว่า 0.85 ตามเกณฑ์ยอมรับได้⁽³⁷⁾ แสดงว่าทุกตัวแปรแฝงแต่ละตัวมีความแตกต่างกันหรือมีความเที่ยงตรงเชิงจำแนกนั่นเอง

ตารางที่ 2 การประเมินการยอมรับเทคโนโลยีของเว็บแอปพลิเคชันฯ โดยการวิเคราะห์ตัวแปรแฝงและตัวแปรสังเกตได้ของการยอมรับเทคโนโลยี

ตัวแปรแฝงและตัวแปรสังเกตได้ของการยอมรับเทคโนโลยีของเว็บแอปพลิเคชันฯ		$\bar{X}$	SD	การแปลผล	Cronbach's Alpha	$CR \rho_A$	$CR \rho_C$	AVE
ความคาดหวังในประสิทธิภาพ (PE)	ระบบมีประโยชน์ในการบริหารเครื่องมือและวัสดุ (PE1)	3.82	0.79	มาก	0.91	0.91	0.94	0.84
	ระบบทำให้ท่านปฏิบัติงานสำเร็จได้รวดเร็วมากขึ้น (PE2)	4.02	0.78	มาก				
	ระบบทำให้ท่านปฏิบัติงานได้มากขึ้น (PE3)	3.67	0.93	มาก				
	ระบบทำให้ท่านทำงานได้มากขึ้น (PE3)	3.76	0.86	มาก				
ความคาดหวังในการใช้งาน (EE)	ระบบมีการใช้งานที่ง่าย (EE4)	3.67	0.91	มาก	0.93	0.94	0.95	0.87
	การเรียนรู้การใช้งานระบบเป็นเรื่องง่ายสำหรับท่าน (EE5)	3.53	1.16	มาก				
	ท่านจะสามารถใช้งานระบบได้อย่างคล่องแคล่ว (EE6)	3.84	0.90	มาก				
	ท่านจะสามารถใช้งานระบบได้อย่างคล่องแคล่ว (EE6)	3.64	0.86	มาก				
อิทธิพลทางสังคม (SI)	ท่านคิดว่าเพื่อนร่วมงานเห็นด้วยว่าควรนำระบบนี้มาใช้งาน (SI7)	3.58	0.87	มาก	0.90	0.91	0.93	0.83
	ท่านคิดว่าหัวหน้างานเห็นด้วยว่าควรนำระบบนี้มาใช้งาน (SI8)	3.44	1.01	ปานกลาง				
	ท่านคิดว่าผู้บริหารองค์กรเห็นถึงประโยชน์ในการใช้งานระบบ (SI9)	3.64	0.91	มาก				
	ท่านคิดว่าผู้บริหารองค์กรเห็นถึงประโยชน์ในการใช้งานระบบ (SI9)	3.64	0.96	มาก				
ความปลอดภัย (S)	โปรแกรมมีความปลอดภัยในการป้องกันการเข้าใช้งานโดยไม่ได้รับอนุญาต (S10)	3.96	0.64	มาก	0.86	0.90	0.90	0.70
	การแบ่งประเภทและจำกัดสิทธิ์ผู้ใช้งาน ทำให้ระบบมีความปลอดภัย (S11)	3.98	0.78	มาก				
	ท่านคิดว่าระบบใช้งานแบบออนไลน์ มีความปลอดภัยในระดับใด (S12)	4.04	0.67	มาก				
	ท่านคิดว่าระบบใช้งานแบบออนไลน์ มีความปลอดภัยในระดับใด (S13)	3.87	0.79	มาก				
ความตั้งใจในการใช้งาน (BI)	ท่านตั้งใจในการใช้งาน (BI)	3.93	0.81	มาก				
	ถ้าหากมีระบบนี้ให้ท่านเลือกใช้ในการปฏิบัติงานท่านตั้งใจที่จะใช้งานระบบ (BI14)	3.52	0.99	มาก	0.96	0.96	0.98	0.96
	ถ้าหากมีระบบนี้ให้ท่านเลือกใช้ในการปฏิบัติงานท่านคิดว่าท่านจะใช้งานระบบ (BI15)	3.49	0.99	ปานกลาง				
	ถ้าหากมีระบบนี้ให้ท่านเลือกใช้ในการปฏิบัติงานท่านคิดว่าท่านจะใช้งานระบบ (BI15)	3.56	1.04	มาก				

หมายเหตุ: $\bar{X}$ คือ ค่าเฉลี่ย, SD คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน, Cronbach's Alpha คือ ค่าความเชื่อมั่นสัมประสิทธิ์ Cronbach's Alpha, $CR \rho_A$ คือ ค่าความเชื่อมั่นเชิงองค์ประกอบของรายการข้อคำถามแต่ละข้อภายใต้ตัวแปรแฝงเดียวกัน, $CR \rho_C$ คือ ค่าความเชื่อมั่นเชิงองค์ประกอบรายการข้อคำถามทุกข้อรวมกันกับตัวแปรแฝง (ค่าที่ยอมรับได้ควรมากกว่า 0.70), AVE (Average Variance Extracted) คือ ค่าเฉลี่ยของความแปรปรวนที่ถูกสกัดได้ โดยค่าที่ยอมรับได้ของ Cronbach's Alpha, $CR \rho_A$, $CR \rho_C$ ควรมากกว่า 0.70 และ AVE ควรมากกว่า 0.50

ตารางที่ 3 ค่าความสัมพันธ์ (Spearman's Correlation, ρ) ของตัวแปร

ตัวแปร	ความคาดหวัง ในประสิทธิภาพ	ความคาดหวัง ในการใช้งาน	อิทธิพล ทางสังคม	ความปลอดภัย	ความตั้งใจ ในการใช้งาน
ความคาดหวังในประสิทธิภาพ	1.00 (0.00*)				
ความคาดหวังในการใช้งาน	0.73 ($< 0.001^*$)	1.00 (0.000*)			
อิทธิพลทางสังคม	0.77 ($< 0.00^*$)	0.80 ($< 0.00^*$)	1.00 (0.000*)		
ความปลอดภัย	0.23 (0.12)	0.38 (0.01*)	0.40 (0.01*)	1.00 (0.00*)	
ความตั้งใจในการใช้งาน	0.64 ($< 0.00^*$)	0.73 ($< 0.00^*$)	0.79 ($< 0.00^*$)	0.27 (0.08)	1.00 (0.00*)

หมายเหตุ: ค่าในวงเล็บแทน p และ * แทน มีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า $p < 0.05$

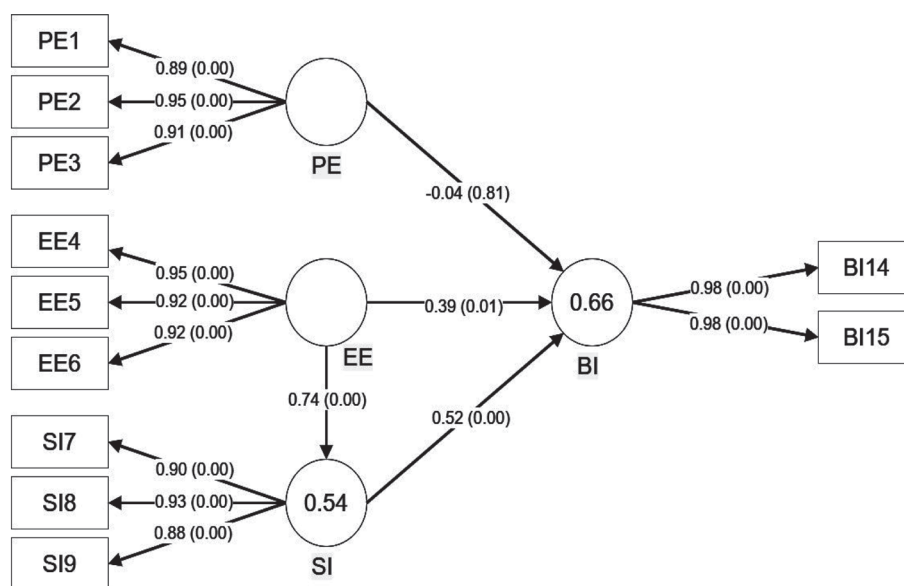
ดังนั้นจากการตรวจสอบโมเดลการวัดโดยค่าความเชื่อมั่นและความเที่ยงพบว่ารายการข้อคำถามหรือตัวแปรสังเกตได้และตัวแปรแฝงหรือปัจจัยที่ต้องการทดสอบการยอมรับเทคโนโลยีสามารถนำไปวิเคราะห์ด้วยสถิติสมการโครงสร้างได้อย่างน่าเชื่อถือ

การวิเคราะห์สมการโครงสร้างชนิด PSL-SEM เริ่มต้นโดยการประเมินภาวะร่วมเส้นตรงพหุ (Multi-collinearity) โดยใช้ค่าปัจจัยการขยายความแปรปรวน (Variance Inflation Factor, VIF) เป็นตัวบ่งชี้ระดับของ Multi-collinearity จากการวิเคราะห์ค่า VIF ของตัวแปรสังเกตได้และตัวแปรแฝงทุกตัวแปรมีค่าน้อยกว่า 10 และยอมรับได้⁽³⁸⁾ แสดงว่าโมเดลสมการโครงสร้างที่ใช้แบบจำลองตามทฤษฎี UTAUT สามารถใช้อธิบายความสัมพันธ์และอิทธิพลของตัวแปรแฝงและตัวแปรสังเกตได้อย่างน่าเชื่อถือ โดยเมื่อนำตัวแปรทุกตัวคือ ความคาดหวังในประสิทธิภาพ (PE) ความคาดหวังในการใช้งาน (EE) อิทธิพลทางสังคม (SI) ความปลอดภัย (S) และความตั้งใจในการใช้งาน (BI) มาสร้างโมเดลสมการโครงสร้าง พบว่าค่าสัมประสิทธิ์เส้นทางความสัมพันธ์ (Path Co-efficient, β) ของความคาดหวังในประสิทธิภาพ ความคาดหวังในการใช้งาน อิทธิพลทางสังคม และความปลอดภัยต่อความตั้งใจในการใช้งาน มีค่า -0.068 ($p = 0.67$), 0.43 ($p = 0.01$), 0.57 ($p = 0.00$) และ -0.09 ($p = 0.47$) ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าความปลอดภัยและความคาดหวังในประสิทธิภาพไม่มีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญกับความตั้งใจในการใช้งาน

ดังนั้นจึงทำการวิเคราะห์สมการโครงสร้างใหม่ โดยไม่นำความปลอดภัยมาวิเคราะห์ด้วย แต่ยังคงความคาดหวังในประสิทธิภาพไว้เพราะเป็นตัวแปรหลักในทฤษฎี UTAUT หลังจากทำการปรับแบบจำลอง ซึ่งได้ผล ดังแสดงในภาพที่ 2 และวิเคราะห์คุณภาพของแบบจำลองรวม (Model Fit) พบว่าค่ามาตรฐานรากที่สองของความคลาดเคลื่อนกำลังสอง (Standardized Root Mean Squared Residual) เท่ากับ 0.08 แสดงว่ามีความสัมพันธ์กันของข้อมูลเชิงประจักษ์กับสมการโครงสร้างที่ได้จากการประมาณ (Estimate Model) หรือสามารถใช้สมการโครงสร้างนี้ในการทำนายขนาดของอิทธิพลหรือความสัมพันธ์ของตัวแปรแฝงได้⁽³⁵⁾ ผลการวิเคราะห์พบว่าเมื่อพิจารณาตัวแปรแฝงความคาดหวังในประสิทธิภาพ (PE) ความคาดหวังในการใช้งาน (EE) อิทธิพลทางสังคม (SI) ร่วมกัน สามารถอธิบายความแปรปรวนของตัวแปรแฝงความตั้งใจในการใช้งาน (BI) ได้ 66% (ค่า $R^2 = 0.66$) ซึ่งถือว่าอยู่ในระดับปานกลาง⁽³⁹⁾ หรือไม่สามารถอธิบายได้ทั้งหมด ทั้งนี้อาจมีปัจจัยหรือตัวแปรอื่นที่เกี่ยวข้องแต่ไม่ได้ศึกษาในการวิจัยครั้งนี้ที่อาจมีผลต่อการยอมรับเทคโนโลยี เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์เส้นทางความสัมพันธ์ (Path Co-efficient, β) ซึ่งแสดงถึงขนาดของอิทธิพลของตัวแปรต้นและตัวแปรตาม พบว่าความคาดหวังในประสิทธิภาพที่มีต่อความตั้งใจในการใช้งานที่มีค่า $\beta = -0.04$ ที่ค่า $p = 0.81$ จึงแปลผลได้ว่าความคาดหวังในประสิทธิภาพไม่มีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญต่อความตั้งใจในการใช้งาน

($p > 0.05$) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับความคาดหวังในการใช้งานและอิทธิพลทางสังคมกลับมีอิทธิพลต่อความตั้งใจในการใช้งานมากกว่า และมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยความคาดหวังในการใช้งานนั้นมีทั้งผลกระทบทางตรง (Direct Effect = 0.39) และทางอ้อม (In-direct Effect = 0.38) ผ่านอิทธิพลทางสังคม ($R^2 = 0.54$) ต่อความตั้งใจในการใช้งาน ส่วนอิทธิพลทางสังคมมีค่า $\beta = 0.52$ และค่า $p = 0.00$ ดังแสดงในตารางที่ 4 พบว่าการใช้งานเว็บแอปพลิเคชันฯ ที่ได้พัฒนาขึ้นนั้นในบริบทของกลุ่มงานต่างๆ ทางด้านเทคนิคการแพทย์

มีปัจจัยที่มีอิทธิพลทางตรงมากที่สุด คือ อิทธิพลทางสังคม และรองลงมา คือ ความคาดหวังในการใช้งาน ซึ่งในที่นี้สื่อถึงความง่ายต่อการใช้งานของระบบ แต่ในมุมมองของอิทธิพลทั้งหมด ความคาดหวังในการใช้งานนับว่าเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลที่สุดต่อความตั้งใจในการใช้งานเพราะส่งอิทธิพลผ่านอิทธิพลทางสังคมด้วย ผลของตัวแปรด้านเพศ อายุ ขนาดโรงพยาบาล และภาระหน้าที่หรือสถานะของผู้ใช้งานระบบต่อความตั้งใจในการใช้งานไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละกลุ่มของการศึกษาครั้งนี้ (p ระหว่าง 0.21–0.97)



ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์เชิงโครงสร้างของการยอมรับเทคโนโลยีของเว็บแอปพลิเคชันฯ ที่วิเคราะห์ด้วย PLS-SEM
หมายเหตุ: PE คือ ความคาดหวังในประสิทธิภาพ, EE คือ ความคาดหวังในการใช้งาน, SI คือ อิทธิพลทางสังคม
BI คือ ความตั้งใจในการใช้งาน โดยตัวเลขหลังอักษรย่อในกรอบสี่เหลี่ยมคือรายการข้อคำถาม ค่า R^2
แสดงในวงกลม ค่าสัมประสิทธิ์เส้นทางความสัมพันธ์ (Path Co-efficient, β) แสดงบนเส้นลูกศร
ความสัมพันธ์ที่มีอิทธิพลต่อ BI ค่าองค์ประกอบน้ำหนัก (Factor Loadings) แสดงบนเส้นลูกศรที่ใช้ไป
รายการข้อคำถาม ขณะที่ p แสดงในวงเล็บกำหนดให้ $p < 0.05$ มีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ $\alpha = 0.05$

ตารางที่ 4 ค่าผลกระทบทางตรง (Direct Effect) ผลกระทบทางอ้อม (In-direct Effect) และผลกระทบรวม (Total Effect) ของตัวแปร

ตัวแปรต้น → ตัวแปรตาม	Direct Effect	In-direct Effect	Total Effect	p -value ของ Total Effect
PE → BI	-0.04	-	-0.04	0.81
EE → BI	0.39	0.38	0.78	0.00*
SI → BI	0.53	-	0.53	0.00*

หมายเหตุ: ค่า * แทน มีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า $p < 0.05$

ส่วนที่ 3 การประเมินความพึงพอใจ

หลังจากที่อาสาสมัครทดสอบการใช้งานครบตามกำหนดและทำแบบสอบถามความพึงพอใจต่อระบบเว็บแอปพลิเคชันฯ โดยเป็นการประเมินในด้านความรู้สึกพึงพอใจเกี่ยวกับการใช้งาน ความน่าเชื่อถือ การออกแบบและความยืดหยุ่น โดยในส่วนนี้จะทำการวิเคราะห์เพื่อแปลผลความพึงพอใจและนำไปใช้เป็นข้อมูลการปรับปรุงหรือพัฒนาระบบให้ดีขึ้น โดยจากการวิเคราะห์ได้ค่าสรุป ดังแสดงในตารางที่ 5 พบว่าในด้านการออกแบบได้คะแนนความพึงพอใจเฉลี่ยสูงสุด 3.94 ซึ่งแปลผลว่ามีความพึงพอใจในระดับมาก คะแนนรองลงมาเป็นด้านความน่าเชื่อถือมีคะแนนเฉลี่ย 3.80 ซึ่งแสดงถึงความพึงพอใจในระดับมาก ด้านความยืดหยุ่นและการใช้งานมีค่าคะแนนเฉลี่ย 3.73–3.74 ซึ่งแปลผลว่ามีความพึงพอใจในระดับมากเช่นกัน ในขณะที่ความพึงพอใจโดยรวมต่อระบบเว็บแอปพลิเคชันฯ มีค่าคะแนนเฉลี่ย 3.51 แสดงถึงความพึงพอใจในระดับมาก จากผลการประเมินความพึงพอใจนี้จะเห็นว่ารระบบมีการออกแบบที่ดีเพราะเมื่อพิจารณาจากคะแนนรายข้อคำถาม พบว่าคำถามเกี่ยวกับการออกแบบอักษร สัญลักษณ์ไอคอนและสีได้คะแนนเฉลี่ยสูงประมาณ 4 ในขณะที่ข้อคำถามที่ได้คะแนนน้อยสุดจะอยู่ที่การใช้งานด้านการค้นหาข้อมูล โดยมีระดับคะแนนเฉลี่ยอยู่ที่ 3.22 ซึ่งแสดงว่าผู้ทดลองใช้งานมีความพึงพอใจระดับปานกลางต่อการค้นหาข้อมูลของระบบ แม้ว่าการแปลผลคะแนนโดยใช้เกณฑ์คะแนนเฉลี่ย 3.51 เพื่ออธิบายผลว่าผู้ใช้งานส่วนใหญ่มีความพึงพอใจมาก แต่เมื่อพิจารณาคะแนนเป็นรายบุคคลโดยเฉพาะคนที่ให้คะแนนความพึงพอใจน้อยกว่าระดับปานกลาง (≤ 3 คะแนน) มีข้อเสนอแนะและชี้ให้เห็นปัญหาของระบบที่ต้องปรับปรุงต่อไป ส่วนผลของตัวแปรด้านเพศ อายุ ขนาดโรงพยาบาลและภาระหน้าที่หรือสถานะของผู้ใช้งานระบบต่อความพึงพอใจไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละกลุ่มของการศึกษาครั้งนี้ (p ระหว่าง 0.17–0.80)

ส่วนที่ 4 ประเด็นคำถามปลายเปิดของการทดสอบ

จากการวิเคราะห์ประเด็นที่ผู้ใช้งานระบบเว็บแอปพลิเคชันฯ พบปัญหาการใช้งานสรุปได้ว่า 1) ระบบมีความยุ่งยากซับซ้อน การค้นหาข้อมูลทำได้ยาก ขั้นตอนการเบิกจ่ายและตัดวัสดุคงคลังค่อนข้างยุ่งยาก ปัญหาในข้อนี้สอดคล้องกับค่าคะแนนเฉลี่ยของการยอมรับเทคโนโลยีด้านความคาดหวังในการใช้งานที่มีคำถามเกี่ยวกับความยากง่ายของการใช้งานที่มีคะแนน 3.22 ซึ่งอยู่ในระดับปานกลาง 2) การเพิ่มข้อมูลน้ำยาที่เป็นชนิดเดียวกันแต่คนละล็อต (Lot) ต้องเพิ่มข้อมูลใหม่ ปัญหาในข้อนี้สอดคล้องกับคะแนนเฉลี่ยของความพึงพอใจในด้านของการลดระยะเวลาในการทำงานที่มีคะแนนเฉลี่ย 3.47 ซึ่งผู้ใช้งานเห็นว่าการใช้งานระบบเว็บแอปพลิเคชันฯ ช่วยลดระยะเวลาการทำงานได้ระดับปานกลาง 3) ฟังก์ชันบางอย่างยังไม่ถูกต้อง และไม่สามารถแก้ไขข้อมูลในระบบได้ และ 4) ไม่สามารถดึงข้อมูลออกมาใช้งานต่อได้สะดวก และมีขั้นตอนการเบิกจ่ายและตัดวัสดุคงคลังค่อนข้างยุ่งยาก

จากปัญหาเหล่านี้ผู้ใช้งานมีความต้องการให้พัฒนา 1) ต้องการระบบที่ใช้งานง่าย ลดขั้นตอนและความซับซ้อน 2) ต้องการให้สามารถกำหนดจำนวนน้อยที่สุด (Minimum) หรือมากที่สุด (Maximum) ของน้ำยาและวัสดุสิ้นเปลือง 3) ต้องการให้สามารถลงรายละเอียดในเอกสารเบิกจ่ายได้โดยตรง และ 4) ต้องการให้สามารถดูสถิติการรับเข้า จ่ายออก แยกตามชนิดน้ำยาและช่วงเวลาได้

ส่วนข้อดีหรือประโยชน์ของระบบเว็บแอปพลิเคชันฯ ที่ผู้ใช้งานเล็งเห็น คือ ช่วยการบริหารจัดการคลังน้ำยา วัสดุ และครุภัณฑ์ได้อย่างเป็นระบบ สามารถเก็บและเรียกดูข้อมูลต่างๆ ผ่านระบบคอมพิวเตอร์ได้ ช่วยลดการใช้กระดาษและการจัดเก็บเอกสาร สามารถทำการค้นหาและตรวจสอบข้อมูลได้ และช่วยการวางแผนการสั่งซื้อและบริหารวัสดุคงคลังได้ดีขึ้น ซึ่งเป็นข้อดีของการจัดการข้อมูลแบบอิเล็กทรอนิกส์ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการทำงาน

ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ยแบบสอบถามความพึงพอใจในการใช้งานเว็บแอปพลิเคชัน

รายการ	$\bar{X}$	SD	การแปลผล
การใช้งาน	3.73	0.62	มาก
- ระบบทำงานได้ตรงตามวัตถุประสงค์ระดับใด	3.49	0.84	ปานกลาง
- ระบบมีคุณภาพระดับใด	3.82	0.78	มาก
- ระบบมีการตอบสนองอย่างรวดเร็ว	3.84	0.80	มาก
- การค้นหาข้อมูลทำได้ง่ายและรวดเร็ว	3.22	0.97	ปานกลาง
- ระบบช่วยลดระยะเวลาในการทำงานทำให้การปฏิบัติงาน มีประสิทธิภาพรวดเร็วมากขึ้น	3.47	0.92	ปานกลาง
- ท่านสามารถเรียนรู้การใช้งานระบบได้ง่าย	3.84	0.85	มาก
- การติดตั้งระบบทำได้ง่าย	4.11	0.80	มาก
- การสร้างฐานข้อมูลด้วยระบบมีประโยชน์ต่อการปฏิบัติงาน	3.89	0.80	มาก
- การมีระบบแจ้งเตือนมีประโยชน์อย่างมาก	3.89	0.80	มาก
- ระบบสามารถใช้งานได้ครอบคลุมทั้งวัสดุ น้ำยา อุปกรณ์ และเครื่องมือแพทย์	3.76	0.88	มาก
ความน่าเชื่อถือ	3.80	0.61	มาก
- การทำงานของระบบมีความถูกต้อง	3.84	0.82	มาก
- ระบบสามารถเข้าใช้งานได้ตลอดเวลาตามความต้องการ	4.16	0.88	มาก
- การพิมพ์หรือแสดงรายงานถูกต้องตามความต้องการผู้ใช้งาน	3.62	0.83	มาก
- หากนำระบบมาใช้งานคาดว่าจะลดค่าใช้จ่ายได้	3.60	0.78	มาก
- หากนำระบบมาใช้งานคาดว่าจะลดการใช้ทรัพยากรได้	3.78	0.74	มาก
การออกแบบ	3.94	0.83	มาก
- ระบบมีการออกแบบตัวอักษรที่อ่านง่าย ชัดเจน	4.11	0.86	มาก
- ระบบมีการใช้สัญลักษณ์หรือไอคอนที่สื่อความหมายเหมาะสม	4.02	0.94	มาก
- ระบบมีการใช้สีได้เหมาะสม	4.07	0.92	มาก
- ระบบมีคำสั่งและปุ่มคำสั่งเพียงพอต่อการใช้งานที่ต้องการ	3.58	0.99	มาก
ความยืดหยุ่น	3.74	0.78	มาก
- ระบบสามารถแก้ไขข้อมูลได้ในระดับใด	3.44	0.97	ปานกลาง
- ระบบสามารถรองรับผู้ใช้งานได้เพียงพอต่อบุคลากรในหน่วยงาน	3.93	0.86	มาก
- ระบบสามารถใช้งานเข้ากันได้กับหลากหลายระบบปฏิบัติการ	3.62	0.91	มาก
- ระบบสามารถรองรับการใช้งานได้กับหลากหลายอุปกรณ์	3.96	0.90	มาก
ความพึงพอใจโดยรวม	3.51	0.87	มาก
- ท่านมีความพึงพอใจกับการใช้งานระบบและผลลัพธ์ที่ได้อย่างมาก	3.58	0.87	มาก
- ท่านเห็นควรให้มีการนำระบบมาใช้งานภายในหน่วยงานของท่าน	3.47	0.92	ปานกลาง
- ท่านจะแนะนำให้ผู้อื่นใช้งานระบบ	3.49	0.94	ปานกลาง

วิจารณ์

ถึงแม้ว่ามีงานวิจัยหลายชิ้นเกี่ยวกับการจัดการเครื่องมือและวัสดุที่แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการบริหารทรัพยากรส่วนนี้จะช่วยลดต้นทุนและเวลาของผู้ปฏิบัติงานได้ แต่มีการจัดการในบริบทที่แตกต่างกัน

เช่น การจัดการพัสดุสำนักงาน⁽⁷⁾ ยาและเวชภัณฑ์⁽⁶⁾ เครื่องมือแพทย์⁽³⁻⁵⁾ เป็นต้น รวมทั้งการศึกษาก่อนหน้านี้โดย Sritart H และคณะ⁽⁸⁾ ได้ศึกษาและพัฒนาระบบเว็บแอปพลิเคชันฯ ขึ้นมาเพื่อให้เหมาะกับบริบทห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ อย่างไรก็ตามการศึกษา

ดังกล่าวมีการทดสอบกับผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการเพียง 3 แห่ง เพราะเน้นที่การออกแบบ แก๊ส และทดสอบซอฟต์แวร์ในห้องทดลอง ซึ่งในการศึกษครั้งนี้ นำระบบที่ปรับปรุงแล้วไปใช้จริงในห้องปฏิบัติการต่างๆ ในสถานะจริงที่หลากหลายขึ้น ได้แก่ ห้องปฏิบัติการรวม กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เคมีคลินิก ภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก ธนาการเลือด โลหิตวิทยา และอนุชีวโมเลกุล ซึ่งเป็นการขยายกลุ่มเป้าหมายของผู้ใช้งานเพิ่มขึ้น หลังจากนั้นประเมินการยอมรับเทคโนโลยีและความพึงพอใจ ซึ่งการประเมินการยอมรับเทคโนโลยีนั้นใช้เป็นเครื่องมือเพื่อทำความเข้าใจปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการยอมรับการใช้งานเทคโนโลยีของผู้ใช้งานในสภาพแวดล้อมการปฏิบัติงานจริง เป็นการคาดการณ์และอธิบายพฤติกรรมการใช้งานระบบที่ถูกพัฒนามาระดับหนึ่งแล้ว อีกทั้งวางแผนและกำหนดกลยุทธ์ในการส่งเสริมและพัฒนาเทคโนโลยีที่นำไปใช้ประเมินด้วย⁽⁴⁰⁾ การวิจัยครั้งนี้ได้นำทฤษฎีการรวมกันของการยอมรับเทคโนโลยีสารสนเทศ (UTAUT) มาใช้เป็นโมเดลของการศึกษา โดยพบว่าผู้ใช้งานมีการยอมรับเทคโนโลยีในระดับมาก โดยอนุมานจากค่าเฉลี่ยความตั้งใจในการใช้งาน ซึ่งเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลในอนาคตต่อการใช้งานจริงถ้ามีการนำระบบนี้ไปใช้ในหน่วยงานจริงตามทฤษฎีของ UTAUT และจากการวิเคราะห์สถิติด้วยวิธี PLS-SEM อิทธิพลที่มีผลต่อความตั้งใจในการใช้งาน ได้แก่ ความคาดหวังในการใช้งานโดยมีอิทธิพลโดยรวมเชิงบวกมากที่สุด ขณะที่อิทธิพลทางสังคมมีอิทธิพลโดยตรงเชิงบวกมากที่สุด แต่เป็นที่น่าสนใจที่ในการศึกษานี้ความคาดหวังในประสิทธิภาพไม่ได้เป็นปัจจัยหลักที่มีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อความตั้งใจในการใช้งาน แต่กลับมีอิทธิพลเชิงลบเล็กน้อยและไม่มีความสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับค่าคะแนนเฉลี่ยของความคาดหวังในประสิทธิภาพ (3.82 ± 0.79) ที่มากกว่าความตั้งใจในการใช้งาน (3.52 ± 0.99) แสดงว่าผู้ใช้งานเห็นถึงประสิทธิภาพของเว็บแอปพลิเคชันฯ แต่ไม่ใช่ปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อความตั้งใจในการใช้งานที่แปรผันตรงตามประสิทธิภาพ ซึ่งต่างจากทฤษฎี UTAUT⁽¹⁰⁾ ที่พบว่าความคาดหวังในประสิทธิภาพ ความคาดหวังในการใช้งานและอิทธิพลทางสังคม

มีอิทธิพลเชิงบวกต่อความตั้งใจในการใช้งาน แต่มีงานวิจัยที่คล้ายคลึงกับผลการศึกษานี้ที่รายงานว่า ความคาดหวังในประสิทธิภาพไม่มีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อความตั้งใจในการใช้งาน^(31,41,42) กรณีนี้อาจเกิดจากบริบทของบุคลากรห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ของไทยและหน่วยงานที่ทำการทดสอบระบบส่วนใหญ่เป็นหน่วยงานราชการ ส่วนผลการศึกษาคำสัมพันธ์ระหว่างความปลอดภัยของระบบต่อความตั้งใจในการใช้งานหรือการยอมรับเทคโนโลยีนั้น ในการศึกษาครั้งนี้ไม่เห็นความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อความตั้งใจในการใช้งาน แต่ผู้ใช้งานเห็นว่าเว็บแอปพลิเคชันฯ ที่ทดสอบมีความปลอดภัยระดับมาก (คะแนนเฉลี่ย 3.96 ± 0.64) และถึงแม้ว่าการศึกษานี้จะไม่ได้แสดงว่าความปลอดภัยมีความสัมพันธ์กับการยอมรับเทคโนโลยี แต่ในอนาคตที่มีการจัดเก็บข้อมูลที่มากขึ้นการรักษาข้อมูลในระบบก็ยิ่งมีความสำคัญมากขึ้น⁽⁴³⁾ ในส่วนของการประเมินความพึงพอใจ ผู้ใช้งานมีความพึงพอใจโดยรวมอยู่ในระดับพึงพอใจมาก ซึ่งคล้ายคลึงกับการศึกษาของ ณัฐดนัย สิงห์คสิวรรณ⁽⁵⁾ ที่พัฒนาระบบเว็บแอปพลิเคชันเครือข่ายบริหารเครื่องมือทางการแพทย์ชื่อ WepMEt และประเมินความพึงพอใจของผู้ใช้งานระบบ พบว่าอยู่ในระดับความพึงพอใจมากเช่นกัน แต่เมื่อพิจารณาแต่ละประเด็นของคำถามปลายเปิดและเชื่อมโยงกับคะแนนเฉลี่ยแต่ละด้านของการยอมรับเทคโนโลยีและความพึงพอใจ ทำให้ทราบถึงภาพรวมของปัญหาหรือความต้องการที่มากขึ้นของห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมวิจัย โดยเว็บแอปพลิเคชันฯ ที่พัฒนาขึ้นยังต้องมีการปรับปรุงให้ใช้งานง่าย ลดความซับซ้อน โดยเฉพาะระบบทะเบียนวัสดุ อุปกรณ์ น้ำยา ระบบค้นหาข้อมูลและระบบการเบิกวัสดุสิ้นเปลืองที่สำคัญในการศึกษานี้กลุ่มตัวอย่างเป็นกลุ่มเป้าหมายที่ตรงกับผู้ที่ต้องการใช้งานระบบเว็บแอปพลิเคชันฯ สำหรับการบริหารเครื่องมือและวัสดุในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ทำให้ข้อมูลที่ได้สามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาระบบแบบองค์รวมของการบริหารเครื่องมือและวัสดุในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ให้ได้มาตรฐานและมีประสิทธิภาพ ในการใช้ทรัพยากรของหน่วยงานอย่างคุ้มค่าและมีประโยชน์มากขึ้น

อย่างไรก็ตาม ด้วยข้อจำกัดของเว็บแอปพลิเคชันในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เป็นระบบที่พัฒนาขึ้นในขั้นต้นเพื่อการศึกษาวิจัยเท่านั้นและเป็นระบบปิด ยังไม่มีการต่อยอดเชิงพาณิชย์หรือเผยแพร่เป็นระบบสาธารณะทำให้ไม่มีการใช้งานที่แพร่หลาย อีกทั้งต้องฝึกและทดลองใช้งานนานอย่างน้อย 2 เดือน ทำให้จำนวนผู้ใช้งานหรือกลุ่มตัวอย่างที่เป็นบุคลากรในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์มีอยู่อย่างจำกัด ซึ่งมีการศึกษาก่อนหน้านี้เช่นกันที่นำทฤษฎีการยอมรับเทคโนโลยีมาใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับเทคโนโลยีทางการแพทย์ในกลุ่มตัวอย่างที่มีจำกัด โดยเฉพาะเทคโนโลยีที่เพิ่งพัฒนาขึ้นมาใหม่หรือต้องมีการฝึกการใช้งานก่อนการประเมิน⁽⁴⁴⁻⁴⁹⁾ นอกจากนี้ปัจจัยด้านเพศ อายุ ขนาดของโรงพยาบาล และภาระหน้าที่หรือสถานะของผู้ใช้งานไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของความตั้งใจในการใช้งานหรือความพึงพอใจ แสดงว่าปัจจัยเหล่านี้อาจจะไม่มีผลโดยตรงต่อการยอมรับเทคโนโลยีหรือความพึงพอใจในการทดสอบระบบในครั้งนี้

สรุป

การศึกษานี้ชี้ให้เห็นถึงการยอมรับเทคโนโลยีและปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการยอมรับเทคโนโลยีต่อเว็บแอปพลิเคชันที่ถูกพัฒนาขึ้นก่อนหน้านี้ ทำให้ทราบว่าปัจจัยความคาดหวังในการใช้งานที่สื่อถึงความง่ายต่อการใช้งานของระบบและอิทธิพลทางสังคมในที่นี้รวมถึงเพื่อนร่วมงาน หัวหน้าห้องปฏิบัติการ และผู้บริหารขององค์กรมีผลต่อการยอมรับระบบเว็บแอปพลิเคชัน ซึ่งจะสามารถผลักดันให้มีการนำระบบสารสนเทศมาใช้ในการพัฒนาคุณภาพห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ได้มากขึ้น นอกจากนี้เมื่อพิจารณาจากระดับความพึงพอใจและหากมีการนำระบบไปปรับปรุงเพิ่มเติมในด้านการทำงานให้มีการใช้งานที่ง่ายขึ้น คาดว่าจะสามารถนำระบบเว็บแอปพลิเคชันนี้มาเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานให้กับบุคลากรของห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ได้มากขึ้น อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดของการศึกษาในครั้งนี้ คือ ห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมวิจัยเป็นหน่วยงานของรัฐบาล อาจทำให้การได้ข้อมูลการใช้งานมีเพียงมุมมองของเจ้าหน้าที่ของหน่วยงานรัฐบาลเท่านั้น ซึ่ง

การศึกษาวิจัยในอนาคตควรมุ่งเน้นให้กลุ่มตัวอย่างมีความหลากหลายทั้งหน่วยงานเอกชนและรัฐบาล เนื่องจากการบริหารจัดการเครื่องมือและวัสดุของรัฐและเอกชนมีความแตกต่างกันอาจทำให้การยอมรับเทคโนโลยีแตกต่างกันได้ นอกจากนี้การศึกษานี้ยังมีข้อจำกัดด้านการเก็บตัวอย่างเพราะห้องปฏิบัติการทางการแพทย์แต่ละแห่งมีผู้ปฏิบัติงานและผู้สนใจในงานด้านการจัดการและบริหารคุณภาพห้องปฏิบัติการจำนวนน้อย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ หัวหน้าห้องปฏิบัติการและบุคลากรห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ โรงพยาบาลเจ้าพระยา-ยมราช โรงพยาบาลสระบุรี โรงพยาบาลภูมิพลอดุลยเดช โรงพยาบาลพหลพลพยุหเสนา โรงพยาบาลปทุมธานี โรงพยาบาลอ่างทอง โรงพยาบาลหนองแค โรงพยาบาลมวกเหล็ก โรงพยาบาลนพรัตนราชธานี และโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ ที่ให้ข้อมูลในการวิจัยในครั้งนี้จนสำเร็จด้วยดี และขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดวงเนตร พิพัฒน์สถิตพงศ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิมลพัทธ์ ศรีไวย์ สำหรับคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษานี้

เอกสารอ้างอิง

1. สถาบันรับรองคุณภาพสถานพยาบาล (องค์การมหาชน). มาตรฐานโรงพยาบาลและบริการสุขภาพ ฉบับที่ 5. นนทบุรี: สถาบันรับรองคุณภาพสถานพยาบาล (องค์การมหาชน).; 2564.
2. สมชาติ แตรตุลาการ, สมชีพ โกเมน. รายงานการวิจัย การพัฒนาระบบสารสนเทศการบริหารเครื่องมือห้องปฏิบัติการทางการแพทย์. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์; 2550.
3. จุญรัตน์ ปริญญาคุปต์. ระบบสารสนเทศสำหรับการจัดการเครื่องมือแพทย์ กรณีศึกษา: โรงพยาบาลนครปฐม [วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต]. นครปฐม: มหาวิทยาลัยมหิดล; 2544.
4. Nutdanai S, Pornthip L, Sanpanich A, editors. Development of an information system for

- medical equipment management in hospitals. In: Proceedings of the 9th Biomedical Engineering International Conference (BMEi-CON); 2016 Dec 7-9; Laung Prabang, Laos. Piscataway, NJ: IEEE; 2016. p. 1-5.
5. ณัฐนัยสิงห์ศรีวรรณ. รายงานการวิจัยการสร้างเครือข่ายโรงพยาบาลเพื่อการบริหารจัดการเครื่องมือแพทย์ด้วยโปรแกรมประยุกต์สำหรับเว็บเพื่อช่วยบริหารจัดการเครื่องมือแพทย์ผ่านเครือข่ายอินเทอร์เน็ต. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา; 2558.
 6. สมบูรณ์ สิงห์พรม. S-A-M-NG-A-M: ระบบการบริหารจัดการคลังเวชภัณฑ์และระบบบัญชีที่กำกับดูแลด้วยเทคโนโลยีเครือข่าย. ว สุขภาพและสิ่งแวดล้อม ศึกษา 2563; 5(4): 163-71.
 7. สุริยัน นิลทะราช, สมบูรณ์ ขาวชายโง. การพัฒนาระบบสารสนเทศการบริหารงานพัสดุ เพื่อการควบคุมวัสดุ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร. ว บัณฑิตศึกษามหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร 2563; 17(76): 191-201.
 8. Sritart H, Phudin T, Tosranon P, Taertulakarn S. Design and evaluation of web-based information systems for the medical laboratory. Int J Online Biomed Eng (iJOE) 2023; 19(3): 48-60.
 9. อุไร หัวทองไผ่. การทดสอบซอฟต์แวร์. ว วิชาการมหาวิทยาลัยกรุงเทพ (JKBU). 2559; 16(2): 140-54.
 10. Venkatesh V, Morris MG, Davis GB, Davis FD. User acceptance of information technology: toward a unified view. MIS Quarterly 2003; 27(3): 425-78.
 11. Xue L, Rashid AM, Ouyang S. The unified theory of acceptance and use of technology (UTAUT) in higher education: a systematic review. Sage Open 2024; 14(1): 21582440241229570. (22 pages).
 12. Jadil Y, Rana NP, Dwivedi YK. A meta-analysis of the UTAUT model in the mobile banking literature: the moderating role of sample size and culture. J Bus Res 2021; 132: 354-72.
 13. Venkatesh V, Thong JY, Xu X. Unified theory of acceptance and use of technology: a synthesis and the road ahead. J Assoc Inf Syst 2016; 17(5): 328-76.
 14. Williams MD, Rana NP, Dwivedi YK. The unified theory of acceptance and use of technology (UTAUT): a literature review. J Enterp Inf Manag (JEIM) 2015; 28(3): 443-88.
 15. AlQudah AA, Al-Emran M, Shaalan K. Technology acceptance in healthcare: a systematic review. Appl Sci 2021; 11: 10537. (40 pages).
 16. Holden RJ, Karsh B-T. The technology acceptance model: its past and its future in health care. J Biomed Inform 2010; 43(1): 159. (30 pages).
 17. Mengesha GH, Garfield MJ. A contextualized IT adoption and use model for telemedicine in Ethiopia. Inf Technol Dev 2019; 25(2): 184-203.
 18. Kohnke A, Cole ML, Bush R. Incorporating UTAUT predictors for understanding home care patients' and clinician's acceptance of healthcare telemedicine equipment. J Technol Manag Innov 2014; 9(2): 29-41.
 19. Kijsanayotin B, Pannarunothai S, Speedie SM. Factors influencing health information technology adoption in Thailand's community health centers: applying the UTAUT model. Int J Med Inform 2009; 78(6): 404-16.
 20. Dadhich M, Hiran KK, Rao SS, Sharma R. Factors influencing patient adoption of the IoT for E-health management systems (e-HMS) using the UTAUT model: a high order SEM-ANN approach. Int J Adv Comput Intell (IJACI) 2022; 13(1): 1-18.
 21. Yang Y, Porntrakoon P, Li J. Factors impacting people performance expectancy and behavioral intention with the Internet medical service in Chengdu, China. Local Adm J 2024; 17(2): 129-54.
 22. Huser V, Narus SP, Rocha RA. Evaluation of a flowchart-based EHR query system: a case study of RetroGuide. J Biomed Inform 2010; 43(1): 4-50.
 23. Kock N, Hadaya P. Minimum sample size estimation in PLS-SEM: the inverse square

- root and gamma-exponential methods. *Inf Sys J* 2018; 28(1): 227-61.
24. Hair JF, Hult GTM, Ringle C, Sarstedt M. A primer on partial least squares structural equation modeling (PLS-SEM). 3rd ed. Thousand Oaks, CA: SAGE Publications; 2022.
 25. Rovinelli RJ, Hambleton RK. On the use of content specialists in the assessment of criterion-referenced test item validity. *Tijdschr Voor Onderwijs Res* 1977; 2(2): 49-60.
 26. Likert R. A technique for the measurement of attitudes. *Arch Psychol* 1932; 140: 1-55.
 27. บุญชม ศรีสะอาด. การวิจัยเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 10. กรุงเทพฯ: สุวีริยาสาส์น; 2560. หน้า 121.
 28. Cronbach LJ. Essentials of psychology and education. New York: McGraw-Hill; 1984.
 29. Mohd Ghazali Z, Wan Yaacob WF, Wan Omar WM. LGCM and PLS-SEM in panel survey data: a systematic review and bibliometric analysis. *Data* 2023; 8(2): 32. (24 pages).
 30. Alduais F, Al-Smadi M. Intention to use E-payments from the perspective of the unified theory of acceptance and use of technology (UTAUT): evidence from Yemen. *Economies* 2022; 10(10): 259. (15 pages).
 31. Zaitul, Ramadhani F, Ilona D. Determinants of web-user satisfaction: using technology acceptance model. *MATEC Web Conf* 2018; 248: 05009. (5 pages).
 32. Ahmed RR, Streimikiene D, Streimikis J. The extended UTAUT model and learning management system during COVID-19: evidence from PLS-SEM and conditional process modeling. *J Bus Econ Manag* 2022; 23(1): 82-104.
 33. Almarzouqi A, Aburayya A, Salloum SA. Determinants predicting the electronic medical record adoption in healthcare: a SEM-Artificial Neural Network approach. *PLoS One* 2022; 17(8): e0272735. (29 pages).
 34. Edo OC, Ang D, Etu EE, Tenebe I, Edo S, Diekola OA. Why do healthcare workers adopt digital health technologies-A cross-sectional study integrating the TAM and UTAUT model in a developing economy. *Int J Inf Manag Data Insights* 2023; 3(2): 100186. (15 pages).
 35. Ringle CM, Wende S, Becker J-M. SmartPLS 4 [computer software]. Bönningstedt: SmartPLS. [online]. 2024; [cited 2024 May 1]. Available from: URL: <https://www.smartpls.com>.
 36. The Jamovi Project. Jamovi (version 2.5) [computer software]. [online]. 2024; [cited 2024 May 1]. Available from: URL: <https://www.jamovi.org>.
 37. Henseler J, Ringle CM, Sarstedt M. A new criterion for assessing discriminant validity in variance-based structural equation modeling. *J Acad Market Sci* 2015; 43: 115-35.
 38. Vittinghoff E, Glidden DV, Shiboski SC, McCulloch CE. Regression methods in biostatistics: linear, logistic, survival, and repeated measures models. New York: Springer; 2006.
 39. Hair J, Risher J, Sarstedt M, Ringle C. When to use and how to report the results of PLS-SEM. *Eur Bus Rev* 2019; 31(1): 2-24.
 40. Rahimi B, Nadri H, Lotfnezhad Afshar H, Timpka T. A systematic review of the technology acceptance model in health informatics. *Appl Clin Inform* 2018; 9(3): 604-34.
 41. Yaseen SG, El Qirem IA. Intention to use E-banking services in the Jordanian commercial banks. *Int J Bank Mark* 2018; 36(3): 557-71.
 42. Ariffin SK, Lim KT, editors. Investigating

- factors affecting intention to use mobile payment among young professionals in Malaysia. In: First ASEAN Business, Environment, and Technology Symposium (ABEATS 2019). Paris: Atlantis Press; 2020.
43. วิศณุ สร้างวงศ์ใหม่. การเป็นมืออาชีพในการรักษาความปลอดภัยไซเบอร์. รัฐศาสตร์ 2561; 60(2): 77-83.
44. Barker DJ, Van Schaik P, Simpson DS, Corbett WA. Evaluating a spoken dialogue system for recording clinical observations during an endoscopic examination. *Med Inform Internet Med* 2003; 28(2): 85-97.
45. Chang P, Hsu Y-S, Tzeng Y-M, Hou I, Sang Y-Y, editors. Development and pilot evaluation of user acceptance of advanced mass-gathering emergency medical services PDA support systems. In: MEDINFO 2004. Amsterdam: IOS Press; 2004.
46. Chang P, Hsu Y-S, Tzeng Y-M, Sang Y-Y, Hou I-C, Kao W-F. The development of intelligent, triage-based, mass-gathering emergency medical service PDA support systems. *J Nurs Res* 2004; 12(3): 227-36.
47. Van Schaik P, Bettany-Saltikov JA, Warren J. Clinical acceptance of a low-cost portable system for postural assessment. *Behav Inf Technol* 2002; 21(1): 47-57.
48. Cranen K, Veld RH, Ijzerman M, Vollenbroek-Hutten M. Change of patients' perceptions of telemedicine after brief use. *Telemed J E Health* 2011; 17(7): 530-5.
49. Cilliers L, Flowerday S. User acceptance of telemedicine by health care workers a case of the eastern cape province, South Africa. *Electron J Inf Syst Dev Ctries* 2014; 65(1): 1-10.

Study of the Web-Based Application for Medical Laboratory Inventory and Supply Management: Technology Acceptance and Satisfaction

Nicharas Phornjiranoppanan^{1,2}, Phetcharat Phanthong³, and Somchat Taertulakarn⁴

¹Graduate Program in Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Rangsit Campus, Pathum Thani 12120, Thailand

²Regional Medical Sciences Center 4 Saraburi, Department of Medical Sciences, Muak Lek District, Saraburi 18180, Thailand

³Department of Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

⁴Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Rangsit Campus, Pathum Thani 12120, Thailand

ABSTRACT Medical laboratory inventory and supply management are essential in the quality management system. However, there is still a limited system that has been widely used. This study used a web-based application developed domestically for medical laboratory inventory and supply management, however, the technology acceptance test has not been performed elsewhere. This study aimed to test the use and acceptance of the web-based application system technology in inventory and supply management in medical laboratories. After the trial, the questionnaires were answered to analyze the factors' influence by the path coefficient (β) according to the unified theory of acceptance and use of technology and to evaluate satisfaction. The results showed that the average technology acceptance and satisfaction level was good (mean 3.51–3.52). The findings revealed that social influence ($\beta = 0.52$, $p < 0.05$) exerted the most potent direct effect on behavioral intention, followed by effort expectancy ($\beta = 0.39$, $p < 0.05$). β was 0.10, indicating a small effect size. However, when considering the total effects, effort expectancy emerged as the most influential determinant (total effect = 0.78, $p < 0.05$), mediated partially through its impact on social influence. This underscores the dual significance of effort expectancy and social influence as critical drivers of technology adoption in the tested system. Although this system assisted in methodically managing the inventory, equipment, supplies, and laboratory reagents, enhancements were still required to improve the quality of the system.

Keywords: Web Application, Inventory and supply Management, Medical Laboratory, Evaluation of Technology Acceptance

การพัฒนาคุณภาพห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัยของ โรงพยาบาลสังกัดกระทรวงสาธารณสุข ในพื้นที่จังหวัดตรัง พัทลุง และสตูล

ศิริวรรณ บุญรัตน์ สุชาวลี เชื้อมหวาน และ จีราภรณ์ สงขลา

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อำเภอเมือง ตรัง 92000

บทคัดย่อ การพัฒนาคุณภาพห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัยเป็นสิ่งสำคัญเพื่อให้ได้ภาพรังสีที่มีคุณภาพในการวินิจฉัยและช่วยให้ผู้ป่วยได้รับปริมาณรังสีอย่างเหมาะสม ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง ได้ดำเนินการพัฒนาคุณภาพห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัยโรงพยาบาลสังกัดกระทรวงสาธารณสุข ในเขตพื้นที่จังหวัดตรัง พัทลุง และสตูล จำนวน 28 แห่ง อย่างต่อเนื่องตั้งแต่ปี พ.ศ. 2558 โดยใช้เกณฑ์มาตรฐานห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัย กระทรวงสาธารณสุข โดยทำงานร่วมกับเครือข่ายโรงพยาบาลสำนักงานสาธารณสุขจังหวัด ฝึกอบรมให้ความรู้กับเจ้าหน้าที่รังสี ตรวจติดตามภายใน และประเมินผล เมื่อเดือนมีนาคมถึง กันยายน พ.ศ. 2566 ได้ประเมินผลการพัฒนาคุณภาพตามเกณฑ์มาตรฐานห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัย กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2565 ผลพบว่าห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัย ส่วนใหญ่มีการพัฒนาคุณภาพตามเกณฑ์มาตรฐาน ค่าคะแนนเฉลี่ยอยู่ที่ร้อยละ 82.9 โดยได้รับการพัฒนาอยู่ในระดับดีและดีเด่น (คะแนนร้อยละ 70-100) จำนวน 22 แห่ง (ร้อยละ 78.6) อยู่ระดับพอใช้/ต้องปรับปรุง (คะแนนร้อยละ 50-69.9) จำนวน 4 แห่ง (ร้อยละ 14.3) และไม่ผ่านเกณฑ์ต้องแก้ไขเร่งด่วน (< ร้อยละ 50) จำนวน 2 แห่ง (ร้อยละ 7.1) โดยโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไปได้คะแนนมากกว่าโรงพยาบาลชุมชน ค่าคะแนนเฉลี่ยร้อยละ 94.1 และ 81.6 ตามลำดับ หัวข้อที่ได้รับการพัฒนามากที่สุดโดยได้คะแนนมากกว่าร้อยละ 90 คือ กระบวนการให้บริการทางรังสี เครื่องมืออุปกรณ์ สถานที่และสิ่งแวดล้อม และการรายงานผล หัวข้อที่ได้ช่วงคะแนนร้อยละ 80-90 ได้แก่ การควบคุมเอกสารและความปลอดภัย หัวข้อที่ได้ช่วงคะแนนร้อยละ 70-80 ได้แก่ บุคลากรและการประกันคุณภาพต่ำสุดคือ องค์กรและการบริหาร และการตรวจติดตามภายในและการประเมินผล ได้คะแนนร้อยละ 69.6 และ 62.5 ตามลำดับ ซึ่งควรมีการพัฒนาปรับปรุงเรื่องดังกล่าวต่อไป

คำสำคัญ: ห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัย, คุณภาพห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัย, การตรวจติดตามภายใน

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

Received: 21 October 2024

Revised: 31 March 2025

Accepted: 31 March 2025

บทนำ

การพัฒนาคุณภาพห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัยของโรงพยาบาลให้ได้มาตรฐานเป็นสิ่งสำคัญ นอกจากทำให้ได้ภาพรังสีที่มีคุณภาพในการวินิจฉัย ยังช่วยให้ผู้ป่วยได้รับปริมาณรังสีอย่างเหมาะสม ตามข้อแนะนำของคณะกรรมการป้องกันอันตรายจากรังสีระหว่างประเทศ (International Commission on Radiation Protection; ICRP)⁽¹⁾ และสร้างความพึงพอใจให้กับผู้รับบริการ ซึ่งการดำเนินการพัฒนาต้องอาศัยปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ บุคลากร เครื่องมือ สถานที่ สภาวะแวดล้อม การบริหาร และความร่วมมือจากหน่วยงานที่เกี่ยวข้องทั้งโรงพยาบาลเอง หน่วยงานผู้กำกับดูแล คือ สำนักงานสาธารณสุขจังหวัด คณะกรรมการวิชาชีพ หน่วยงานวิชาการในพื้นที่ เช่น ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ (ศวก.) ซึ่งช่วยสนับสนุนปัจจัยที่สำคัญต่างๆ รวมทั้งถ่ายทอดองค์ความรู้ให้กับเจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงาน ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2550 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยสำนักรังสีและเครื่องมือแพทย์ และ ศวก. ทุกภูมิภาค ดำเนินโครงการพัฒนาห้องปฏิบัติการทางรังสีวินิจฉัยในโรงพยาบาลสังกัดกระทรวงสาธารณสุข โดยจัดทำคู่มือปฏิบัติงานประกันคุณภาพห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัย (Quality Assurance Workbook) ตามหัวข้อการควบคุมคุณภาพทางรังสีวินิจฉัยขององค์การอนามัยโลก (WHO)⁽²⁾ ได้มีการฝึกอบรมถ่ายทอดความรู้ให้กับเจ้าหน้าที่รังสีของโรงพยาบาล ประกอบด้วย การวิเคราะห์ฟิล์มเสีย การควบคุมคุณภาพเครื่องมือและอุปกรณ์ประกอบ และตัวแปรเทคนิคที่มีผลต่อการถ่ายภาพรังสี และเมื่อปีงบประมาณ พ.ศ. 2555 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้จัดทำเกณฑ์และแนวทางการพัฒนาคุณภาพงานรังสีวินิจฉัยโรงพยาบาลสังกัดกระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2555⁽³⁾ ตามแนวทางของการควบคุมคุณภาพทางรังสีวินิจฉัยขององค์การอนามัยโลก และแนวทางการตรวจประเมินบริการรังสีวิทยาในสถานพยาบาลประเภทที่รับผู้ป่วยไว้ค้างคืนของกรมสนับสนุนบริการสุขภาพ กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2551⁽⁴⁾ ประกอบด้วย หัวข้อหลัก 3 ส่วน คือ 1) ความปลอดภัย 2) บริการรังสีวินิจฉัย และ 3) คุณภาพบริการ เผยแพร่ให้โรงพยาบาลนำไปใช้เป็นเกณฑ์ในการพัฒนา จัดอบรมให้ความรู้แก่

เจ้าหน้าที่รังสีของโรงพยาบาล และมีการประเมินคุณภาพตามเกณฑ์ฯ กำหนดเรื่องที่จะต้องดำเนินการเป็น The Must และข้อที่ดำเนินการเพิ่มเติมให้ดีกว่าเดิมคือ The Best โดยการดำเนินงานจะเป็นในลักษณะภาคีเครือข่าย มีทั้งเจ้าหน้าที่สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดของแต่ละจังหวัด และผู้แทนเจ้าหน้าที่รังสีจากโรงพยาบาลทั่วไปและโรงพยาบาลชุมชน จัดตั้งเป็นคณะกรรมการพัฒนาห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัยระดับจังหวัดและระดับเขต ต่อมาในปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 การพัฒนาห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัยได้ถูกกำหนดเป็นตัวชี้วัดของกระทรวงสาธารณสุข มีการปรับปรุงเกณฑ์เพื่อให้มีความสมบูรณ์ชัดเจนขึ้น โดยจัดทำเกณฑ์และแนวทางการพัฒนาคุณภาพงานรังสีวินิจฉัยโรงพยาบาลสังกัดกระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2558⁽⁵⁾ ซึ่งดำเนินการพัฒนาจนถึงปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 และในปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 ได้เริ่มส่งเสริมให้โรงพยาบาลยื่นขอรับรองจากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยปรับปรุงเกณฑ์และแนวทางการพัฒนาคุณภาพงานรังสีวินิจฉัยโรงพยาบาลสังกัดกระทรวงสาธารณสุขเดิม เปลี่ยนชื่อเป็น มาตรฐานห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัย กระทรวงสาธารณสุข⁽⁶⁾ ประกอบด้วย 10 ข้อหลัก 114 ข้อย่อย ได้แก่ 1) องค์กรและการบริหาร 2) บุคลากร 3) เครื่องมือและอุปกรณ์ 4) การประกันคุณภาพ 5) การควบคุมเอกสาร 6) สถานที่และสิ่งแวดล้อม 7) ความปลอดภัย 8) กระบวนการให้บริการทางรังสี 9) การรายงานผล และ 10) การตรวจติดตามภายในและประเมินผล โดยการตัดสินผลการประเมินแต่ละข้อเป็นผ่านหรือไม่ผ่าน ตามหลักมาตรฐานสากล และในปีงบประมาณ พ.ศ. 2565 ได้มีการปรับปรุงแก้ไขเกณฑ์ใหม่ ปรับลดข้อที่ซ้ำซ้อน เหลือข้อย่อย 70 ข้อ เป็นมาตรฐานห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัย กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2565⁽⁷⁾ ศวก. ที่ 12/1 ตรัง รับผิดชอบในเขตพื้นที่จังหวัดตรัง พัทลุง และสตูล มีโรงพยาบาลในพื้นที่รับผิดชอบ 28 แห่ง อยู่ในจังหวัดตรัง 10 แห่ง จังหวัดพัทลุง 11 แห่ง และจังหวัดสตูล 7 แห่ง ได้มีการดำเนินการพัฒนาคุณภาพห้องปฏิบัติการรังสีให้กับโรงพยาบาลในเขตพื้นที่อย่างต่อเนื่อง โดยทำงานร่วมกับเครือข่ายในพื้นที่ มีทั้งการฝึกอบรมให้ความรู้กับเจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงาน และติดตามประเมินผลการพัฒนาคุณภาพตามมาตรฐานที่กำหนด

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินผลการพัฒนาคุณภาพห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัยของโรงพยาบาลในพื้นที่จังหวัดตรัง พัทลุง และสตูล โดยใช้เกณฑ์มาตรฐานห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัย กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2565 เพื่อทราบผลความสำเร็จและพัฒนาเพิ่มเติมส่วนที่ขาดต่อไป

วัสดุและวิธีการ

กลุ่มตัวอย่าง

โรงพยาบาลสังกัดสำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุขในเขตพื้นที่จังหวัดตรัง พัทลุง และสตูล รวม 28 แห่ง เป็นโรงพยาบาลในจังหวัดตรัง 10 แห่ง ได้แก่ โรงพยาบาลตรัง ห้วยยอด กันตัง ย่านตาขาว ปะเหลียน สิเกา วังวิเศษ รัชฎา นาโยง และหาดสำราญ เฉลิมพระเกียรติ 80 พรรษา จังหวัดพัทลุง 11 แห่ง ได้แก่ โรงพยาบาลพัทลุง ควนขนุน ตะโหมด ปากพะยูน ป่าบอน บางแก้ว กงหรา เขาชัยสน ศรีบรรพต ป่าพะยอม และศรีนครินทร์ (ปัญญานันทภิกขุ) และจังหวัดสตูล 7 แห่ง ได้แก่ โรงพยาบาลสตูล ละงู ควนกาหลง ควนโดน

ท่าแพทุ่งหว้า และมะนัง โดยมีระยะเวลาที่ศึกษาเดือนมีนาคม ถึง กันยายน พ.ศ. 2566

เครื่องมือและอุปกรณ์

แบบตรวจประเมินห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัยตามมาตรฐานห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัย กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2565 (Checklist X-Ray) ประกอบด้วยส่วนที่เป็นข้อมูลทั่วไป ได้แก่ ชื่อโรงพยาบาล รหัส 5 หลัก จังหวัด ประเภทโรงพยาบาล จำนวนเตียง ประเภทการตรวจประเมิน วันที่ตรวจประเมิน ดังแสดงในภาพที่ 1 โดยมีข้อกำหนด 10 ข้อหลัก 70 ข้อย่อย ได้แก่ หัวข้อที่ 1 องค์การและการบริหารมี 3 ข้อย่อย หัวข้อที่ 2 บุคลากรมี 5 ข้อย่อย หัวข้อที่ 3 เครื่องมือและอุปกรณ์มี 7 ข้อย่อย หัวข้อที่ 4 การประกันคุณภาพมี 5 ข้อย่อย หัวข้อที่ 5 การควบคุมเอกสารมี 3 ข้อย่อย หัวข้อที่ 6 สถานที่และสิ่งแวดล้อมมี 9 ข้อย่อย หัวข้อที่ 7 ความปลอดภัยมี 24 ข้อย่อย หัวข้อที่ 8 กระบวนการให้บริการทางรังสีมี 11 ข้อย่อย หัวข้อที่ 9 การรายงานผลมี 2 ข้อย่อย หัวข้อที่ 10 การตรวจติดตามภายในและประเมินผลมี 1 ข้อย่อย ดังแสดงในตารางที่ 1

โรงพยาบาลรหัส 5 หลักจังหวัด
ประเภทโรงพยาบาล () A () S () M1 () M2 () F1 () F2 () F3 () อื่นๆ..... จำนวนเตียง เตียง
() การประเมินตนเอง () การประเมิน Internal audit () การประเมิน External audit /Assessment

แบบตรวจประเมินระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัย (Checklist X-ray)

ตามมาตรฐานห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัย กระทรวงสาธารณสุข

โปรดดำเนินการตรวจประเมิน และ ระบุผลตามความเป็นจริง โดยใส่หมายเลข 1 ดังนี้ มีครบ มีบางส่วน ไม่มีหรือไม่ดำเนินการ และไม่เกี่ยวข้อง (n/a) รวมทั้งระบุรายละเอียด หรือหลักฐานที่ดำเนินการสอดคล้องตามระบบคุณภาพ และรายละเอียดที่ไม่สอดคล้องให้ครบทุกข้อ

ข้อที่	ระบบคุณภาพ/มาตรฐานงานบริการ	ไม่เกี่ยวข้อง N/A	มีครบ	มีบางส่วน	ไม่มี	รายละเอียด/หลักฐานที่พบ
1	องค์กรและการบริหาร ข้อ 1.1-1.3					
2	บุคลากร ข้อ 2.1-2.5					
3	เครื่องมือและอุปกรณ์ ข้อ 3.1-3.7					
4	การประกันคุณภาพ ข้อ 4.1-4.5					
5	การควบคุมเอกสาร ข้อ 5.1-5.3					
6	สถานที่และสิ่งแวดล้อม ข้อ 6.1-6.9					
7	ความปลอดภัย ข้อ 7.1.1-7.4.11					
8	กระบวนการให้บริการทางรังสี ข้อ 8.1-8.11					
9	การรายงานผล ข้อ 9.1-9.2					
10	การตรวจติดตามภายในและประเมินผล ข้อ 10.1					

สรุปผลการตรวจประเมินรายหัวข้อ

ที่	ข้อกำหนด	จำนวนข้อ (ข้อ)				
		N/A	มีครบ	มีบางส่วน	ไม่มี	รวม
1	หัวข้อที่ 1 องค์กรและการบริหาร					3
2	หัวข้อที่ 2 บุคลากร					5
3	หัวข้อที่ 3 เครื่องมือและอุปกรณ์					7
4	หัวข้อที่ 4 การประกันคุณภาพ					5
5	หัวข้อที่ 5 การควบคุมเอกสาร					3
6	หัวข้อที่ 6 สถานที่และสิ่งแวดล้อม					9
7	หัวข้อที่ 7 ความปลอดภัย					24
8	หัวข้อที่ 8 กระบวนการให้บริการทางรังสี					11
9	หัวข้อที่ 9 การรายงานผล					2
10	หัวข้อที่ 10 การตรวจติดตามภายในและประเมินผล					1
รวม						70

ลงนามผู้ตรวจประเมิน

- ชื่อ-นามสกุล.....เลขทะเบียน หัวหน้าผู้ตรวจประเมิน
ตำแหน่ง.....โรงพยาบาล.....
- ชื่อ-นามสกุล.....เลขทะเบียน ผู้ตรวจประเมินด้านวิชาการ
ตำแหน่ง.....โรงพยาบาล.....

ภาพที่ 1 ตัวอย่างแบบตรวจประเมินระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัย (Checklist X-ray) ตามมาตรฐาน
ห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัย กระทรวงสาธารณสุข

ตารางที่ 1 ข้อกำหนดมาตรฐานห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัย กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2565

1. องค์กรและการบริหาร

- 1.1 มีการบริหารจัดการ โดยการจัดหาทรัพยากรที่จำเป็นให้เป็นไปตามข้อกำหนดของระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการ
มีการจัดทำแผนผังและแสดงการบริหารภายในองค์กร
- 1.2 มีนโยบาย ระเบียบปฏิบัติในการป้องกันข้อมูลที่เป็นความลับ และสิทธิของผู้ป่วยและด้านความปลอดภัยใน
ห้องปฏิบัติการ
- 1.3 มีการศึกษาข้อมูลและสถิตินำมาเป็นตัวชี้วัดในการปฏิบัติงาน และมีแผนปรับปรุงคุณภาพ (Quality Improvement)
มีการสำรวจความพึงพอใจในการให้บริการทั้งภายในและภายนอก

2. บุคลากร

- 2.1 มีบุคลากรทางด้านวิชาชีพรังสี ปฏิบัติงานได้ตลอดเวลาที่ให้บริการ
- 2.2 มีผลการประเมินความสามารถด้านวิชาการในการปฏิบัติงานด้านรังสี
- 2.3 มีการกำหนดความรับผิดชอบอำนาจหน้าที่ของบุคลากรในห้องปฏิบัติการทุกระดับเป็นลายลักษณ์อักษร
- 2.4 มีแผนพัฒนาบุคลากร
- 2.5 มีการจัดทำประวัติการฝึกอบรมของบุคลากร

3. เครื่องมือและอุปกรณ์

- 3.1 เครื่องมือทางรังสีวิทยาต้องมีสภาพพร้อมใช้งานและเพียงพอและต้องได้มาตรฐานคุณภาพและความปลอดภัย
- 3.2 ระบบไฟฟ้าสำหรับห้องตรวจทางรังสีต้องได้มาตรฐานและมีความปลอดภัย
- 3.3 มีอุปกรณ์ประกอบที่ใช้ถ่ายภาพรังสีพร้อมใช้งาน
- 3.4 มีอุปกรณ์ป้องกันรังสีที่สามารถป้องกันรังสีได้ มีสภาพดี จำนวนเพียงพอ

ตารางที่ 1 ข้อกำหนดมาตรฐานห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัย กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2565 (ต่อ)

- 3.5 มีอุปกรณ์ในการเคลื่อนย้ายผู้ป่วยที่สะอาดและพร้อมใช้งาน
- 3.6 มีเสื้อผ้าสะอาดสำหรับผู้ป่วยและเพียงพอ มีที่จัดเก็บแยกก่อนและหลังใช้งาน
- 3.7 วัสดุและเวชภัณฑ์สำหรับผู้ป่วยมีคุณภาพตามบริบทการให้บริการของโรงพยาบาล

4. การประกันคุณภาพ

- 4.1 มีแผนการควบคุมคุณภาพเครื่องมือทางรังสีวิทยา
- 4.2 มีการควบคุมคุณภาพกรณีการสร้างภาพแบบฟิล์ม
- 4.3 มีการควบคุมคุณภาพกรณีการสร้างภาพแบบดิจิทัล
- 4.4 มีการวิเคราะห์คุณภาพภาพถ่ายรังสี อัตราการถ่ายภาพรังสีซ้ำพร้อมแผนการแก้ไข โดยมีอัตราฟิล์มเสีย อัตราการถ่ายภาพรังสีซ้ำ ไม่เกินร้อยละ 8
- 4.5 มีการตรวจสอบคุณภาพอุปกรณ์ป้องกันรังสีอย่างน้อยปีละ 1 ครั้ง

5. การควบคุมเอกสาร

- 5.1 มีบัญชีรายชื่อเครื่องมือทางรังสีรวมทั้งประวัติครุภัณฑ์เครื่องมือ
- 5.2 มีคู่มือการใช้งานประจำเครื่องมือและอุปกรณ์ที่สำคัญ และมีเอกสารบันทึกประวัติการบำรุงรักษา
- 5.3 ภาพถ่ายรังสี/ฟิล์มภาพถ่ายทางรังสีของผู้รับบริการถูกเก็บในสถานที่ที่มีการป้องกันการเข้าถึงของผู้ที่ไม่ได้รับอนุญาต

6. สถานที่และสิ่งแวดล้อม

- 6.1 ห้องตรวจทางรังสีมีพื้นที่เพียงพอสำหรับผู้รับบริการที่นั่งรถเข็นและผู้รับบริการที่นอนบนเตียง
- 6.2 ผนังทุกด้านและประตูห้องมีผนังกันจุดควบคุมการฉายรังสี (Control booth)
- 6.3 ภายในห้องตรวจทางรังสีมีความสว่างเพียงพอ และภายใต้บริเวณจุดที่ผู้รับบริการรับการถ่ายภาพเอกซเรย์ ต้องสามารถมองเห็นขนาดลำรังสีได้ชัดเจน
- 6.4 มีพื้นที่รอรับบริการเป็นสัดส่วน มีป้ายบอกชัดเจน
- 6.5 มีพื้นที่ลงทะเบียน ที่สามารถมองเห็นผู้รอรับบริการได้ชัดเจน เป็นสัดส่วน
- 6.6 มีห้องเปลี่ยนเสื้อผ้าที่มีประตูล็อกและปุ่มสัญญาณให้ผู้รับบริการกด กรณีฉุกเฉิน มีอากาศถ่ายเทสะดวก
- 6.7 หากมีบริการตรวจพิเศษทางรังสีวินิจฉัยด้วยสารเปรียบต่าง ต้องมีพื้นที่เตรียมสารเปรียบต่างและพื้นที่ทำความสะอาดเครื่องมืออุปกรณ์ มีห้องสุขาข้างในหรือใกล้ห้องตรวจที่มีปุ่มสัญญาณฉุกเฉินสำหรับผู้รับบริการ
- 6.8 มีพื้นที่/ห้องเก็บเครื่องมือ อุปกรณ์ และวัสดุ เป็นสัดส่วน
- 6.9 มีระบบระบายอากาศที่ดี มีแสงสว่างเพียงพอในการปฏิบัติงาน

7. ความปลอดภัย

- 7.1 ความปลอดภัยของผู้ปฏิบัติงานด้านรังสี
 - 7.1.1 มีอุปกรณ์วัดรังสีบุคคลและมีการบันทึกปริมาณรังสีที่ได้รับอย่างต่อเนื่องและเป็นปัจจุบัน
 - 7.1.2 มีการฝึกอบรม/การศึกษา เรื่อง การป้องกันอันตรายจากรังสี
 - 7.1.3 มีการฝึกอบรม/การศึกษา เรื่อง การป้องกันอันตรายจากรังสีให้กับผู้เกี่ยวข้อง
 - 7.1.4 มีการอบรมและการซ้อมแผน/หรือการเตรียมรับมือด้านอัคคีภัย/ภัยธรรมชาติหรืออุบัติเหตุ
 - 7.1.5 มีวัสดุและเวชภัณฑ์ด้านความปลอดภัย
- 7.2 ความปลอดภัยของผู้รับบริการ
 - 7.2.1 มีระบบการเฝ้าระวังดูแลผู้รับบริการ ผู้ป่วยภาวะวิกฤตต้องมีเจ้าหน้าที่ดูแล
 - 7.2.2 ผู้ปฏิบัติงานด้านรังสีต้องได้รับการฝึกอบรมการดูแลและเคลื่อนย้ายผู้รับบริการ และสามารถปฏิบัติได้อย่างถูกต้อง

ตารางที่ 1 ข้อกำหนดมาตรฐานห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัย กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2565 (ต่อ)

- 7.2.3 เส้นทางเคลื่อนย้ายผู้รับบริการ สะดวก ไม่มีสิ่งกีดขวาง ปลอดภัย มีทางลาดให้ผู้รับบริการที่นั่งรถเข็นและนอนเตียง
- 7.2.4 มีการจัดการความเสี่ยงให้กับผู้รับบริการ
- 7.3 กรณีที่มีการใช้สารเปรียบต่าง
 - 7.3.1 มีแนวทางการปฏิบัติ/คู่มือการปฏิบัติงานเกี่ยวกับความปลอดภัยจากการใช้สารเปรียบต่าง
 - 7.3.2 มีหลักฐานการคัดกรองผู้รับบริการที่มีความเสี่ยงสูง
 - 7.3.3 มีการวัดสัญญาณชีพ (Vital sign) ก่อนการตรวจพิเศษทางรังสีทุกครั้ง
 - 7.3.4 มีแนวทางปฏิบัติกรณีเกิดเหตุฉุกเฉินจากสารเปรียบต่างขณะให้บริการรังสีวินิจฉัย
- 7.4 หน่วยให้บริการ
 - 7.4.1 มีระบบป้องกันอันตรายจากรังสี และแนวทางการดูแลผู้รับบริการที่มาใช้บริการ
 - 7.4.2 กรณีมีเครื่องสร้างภาพด้วยสนามแม่เหล็กไฟฟ้า (MRI) มีระบบป้องกันอันตรายจากและแนวทางการดูแลผู้รับบริการที่มาใช้บริการ
 - 7.4.3 มีการประเมินค่าปริมาณรังสีที่ผู้รับบริการได้รับจากการถ่ายภาพรังสีวินิจฉัยอย่างเหมาะสม
 - 7.4.4 มีกระบวนการป้องกันการติดเชื้อและการแพร่กระจายเชื้อครอบคลุมตามมาตรฐานการป้องกันการติดเชื้อ รวมทั้งโรคติดเชื้ออุบัติใหม่/อุบัติซ้ำ
 - 7.4.5 มีการใช้อุปกรณ์จำกัดลำรังสี เฉพาะส่วนที่ต้องการตรวจที่สามารถใช้งานได้
 - 7.4.6 มีการป้องกันรังสีให้ญาติหรือผู้ติดตามในกรณีที่ต้องให้จับผู้รับบริการ
 - 7.4.7 มีมาตรการในการช่วยฟื้นคืนชีพอย่างมีประสิทธิภาพ และมีการซักซ้อมอย่างน้อยปีละ 1 ครั้ง
 - 7.4.8 มีการติดตั้งถังดับเพลิงที่เหมาะสมพร้อมใช้งาน และมีการตรวจสอบอย่างน้อยเดือนละ 1 ครั้ง หรือตามระยะเวลาที่ผู้ผลิตกำหนด ติดป้ายแสดงผลการตรวจสอบ
 - 7.4.9 มีป้ายทางหนีไฟที่เห็นได้ชัดเจนแม้ในเวลากลางคืน
 - 7.4.10 มีระบบไฟฟ้าสำรอง เพื่อให้แสงสว่างฉุกเฉินเพียงพอสำหรับการปฏิบัติงานถึงจุดที่ให้บริการอย่างน้อย 1 จุด
 - 7.4.11 กรณีใช้น้ำยาล้างฟิล์ม ให้มีแนวทางการกำจัดน้ำยาล้างฟิล์มอย่างถูกต้องก่อนปล่อยสู่สิ่งแวดล้อม

8. กระบวนการให้บริการทางรังสี

- 8.1 มีคู่มือการปฏิบัติงานทางรังสี
- 8.2 มีตารางเทคนิคการให้ปริมาณรังสี (Technical/Exposure chart) หรือโปรโตคอล (Protocol) ติดตั้งอยู่ในพื้นที่
- 8.3 มีใบ request ที่ส่งให้ผู้ปฏิบัติงานด้านรังสี โดยระบุข้อบ่งชี้ในการขอตรวจของแพทย์เพื่อให้บริการที่ถูกต้อง
- 8.4 มีการซักประวัติตรวจสอบความถูกต้องของผู้รับบริการ
- 8.5 มีการทวนสอบผู้รับบริการในวัยเจริญพันธุ์ถึงโอกาสในการตั้งครรภ์ทุกครั้ง และมีแนวทางในการถ่ายภาพรังสีผู้รับบริการตั้งครรภ์
- 8.6 มีระบบสื่อสารภายในหรือระหว่างหน่วยงานกับการส่งต่อผู้ป่วย
- 8.7 ผู้รับบริการได้รับคำแนะนำในการเตรียมตัวก่อนเข้ารับการถ่ายภาพรังสี
- 8.8 การให้บริการตรวจพิเศษทางรังสี มีการอธิบายและให้คำแนะนำ และมีกระบวนการในการติดตามเพื่อรับการตรวจตามนัด
- 8.9 ผู้รับบริการได้รับการทวนสอบความเข้าใจขั้นตอนการตรวจพิเศษต่าง ๆ จนสามารถปฏิบัติได้ถูกต้อง
- 8.10 การตรวจพิเศษทางรังสีที่มีการใช้สารเปรียบต่างกระทำโดยแพทย์
- 8.11 มีระบบการส่งต่อข้อมูลผู้ป่วย เช่น ภาพทางรังสี ผลการวินิจฉัยของรังสีแพทย์ ทั้งระหว่างแผนกและระหว่างหน่วยงานที่มีประสิทธิภาพ

9. การรายงานผล

- 9.1 มีการควบคุมคุณภาพภาพถ่ายทางรังสีที่ได้ก่อนส่งมอบให้แพทย์
- 9.2 ซองพร้อมภาพถ่ายทางรังสี มีข้อมูลผู้รับบริการและรายละเอียดที่จำเป็นและถูกต้อง

ตารางที่ 1 ข้อกำหนดมาตรฐานห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัย กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2565 (ต่อ)

10. การตรวจติดตามภายในและประเมินผล

- 10.1 ห้องปฏิบัติการต้องนำข้อมูลการทบทวนระบบบริหารคุณภาพ ผลการตรวจติดตามระบบบริหารคุณภาพภายในห้องปฏิบัติการ (Internal audit) การปฏิบัติแก้ไข การป้องกัน โอกาสเสี่ยงการเกิดซ้ำ มาเป็นข้อมูลสำหรับกำหนดแผนพัฒนาปรับปรุงอย่างต่อเนื่อง

วิธีการ

การจัดประชุม/อบรม

จัดประชุม/อบรมให้ความรู้เรื่องเกณฑ์มาตรฐานห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัย กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2565 ให้กับผู้ปฏิบัติงานห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัยของโรงพยาบาลในเขตพื้นที่จังหวัดตรัง พัทลุง และสตูล และเจ้าหน้าที่สำนักงานสาธารณสุขจังหวัด และประสานงานกับสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดและโรงพยาบาลในการวางแผนการตรวจประเมิน

การตรวจประเมิน

แต่งตั้งทีมผู้ตรวจประเมิน โดยแต่ละโรงพยาบาลมีผู้ตรวจประเมิน 2 คน ได้แก่ นักรังสีการแพทย์จากโรงพยาบาลศูนย์หรือโรงพยาบาลทั่วไป 1 คน และผู้แทนนักรังสีการแพทย์จากโรงพยาบาลชุมชน 1 คน โดยผู้ตรวจประเมินต้องขึ้นทะเบียนเป็นผู้ตรวจประเมินจากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สำหรับการประเมินโรงพยาบาลทั่วไปจะใช้ผู้ตรวจประเมินจากโรงพยาบาลทั่วไปจากจังหวัดใกล้เคียง

ดำเนินการตรวจประเมินโดยใช้แบบตรวจประเมินระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัย (Checklist) ตามเกณฑ์มาตรฐานห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัย กระทรวงสาธารณสุข โดยบันทึกข้อมูลทั่วไป ได้แก่ ชื่อโรงพยาบาล รหัส 5 หลัก จังหวัด ประเภทโรงพยาบาล จำนวนเตียง ประเภทการตรวจประเมิน วันที่ตรวจประเมิน และข้อมูลที่จำเป็นอื่นๆ เพิ่มเติม ได้แก่ ประเภทการให้บริการทางรังสี ชนิดและจำนวนเครื่องเอกซเรย์ ระบบสร้างภาพรังสี และจำนวนเจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงานด้านรังสี และดำเนินการประเมินตาม Checklist โดยให้คะแนนการประเมินของแต่ละข้อ คือ 2 = มีครบ 1 = มีบางส่วน 0 = ไม่มี/ไม่ได้ดำเนินการ และ N/A = ไม่ได้ให้บริการ คะแนนเต็มปกติ คือ 140 คะแนน แต่ข้อที่ N/A จะไม่นำ

มาคิดคะแนนเต็ม โดยโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไปมีคะแนนเต็ม 136 คะแนน เนื่องจากไม่ได้ใช้ระบบฟิล์มเอกซเรย์ โรงพยาบาลชุมชนคิดคะแนนเต็ม 122 คะแนน เนื่องจากไม่ได้ใช้ระบบฟิล์มเอกซเรย์และไม่มี การตรวจพิเศษที่ใช้สารเปรียบต่าง

รวบรวมข้อมูลและสรุปผลการประเมิน

รวบรวมข้อมูลทั่วไป ได้แก่ ประเภท ระดับ และจำนวนโรงพยาบาล ประเภทการให้บริการทางรังสี ชนิด และจำนวนเครื่องเอกซเรย์ ระบบสร้างภาพรังสี และจำนวนเจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงานด้านรังสี และสรุปผลการประเมิน โดยนำคะแนนที่ได้แต่ละโรงพยาบาลคิดเป็นร้อยละจากคะแนนเต็มปกติ และหาค่าเฉลี่ย ค่าต่ำสุด สูงสุด ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของกลุ่ม และจัดระดับการพัฒนาตามคะแนนที่ได้ โดยคะแนน 90.0-100 เป็นระดับดีเด่น คะแนน 80.0-89.9 เป็นระดับดีมาก คะแนน 70.0-79.9 เป็นระดับดี คะแนน 60.0-69.9 เป็นระดับพอใช้ คะแนน 50.0-59.9 เป็นระดับต้องปรับปรุง คะแนนต่ำกว่า 50.0 ถือว่าไม่ผ่านเกณฑ์ต้องแก้ไขเร่งด่วน โดยพิจารณาทั้งคะแนนรวมและคะแนนตามข้อกำหนดทั้ง 10 ข้อ แยกตามจังหวัดและตามประเภทโรงพยาบาล

ผล

ข้อมูลทั่วไป

ข้อมูลเบื้องต้นในพื้นที่จังหวัดตรัง พัทลุง และสตูล มีโรงพยาบาลสังกัดสำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุขทั้งหมด 28 แห่ง อยู่ในจังหวัดตรัง 10 แห่ง จังหวัดพัทลุง 11 แห่ง และจังหวัดสตูล 7 แห่ง เป็นโรงพยาบาลศูนย์ (รพศ.) ระดับ A (Advance Level) คือ โรงพยาบาลที่มีขีดความสามารถรองรับผู้ป่วยที่ต้องการการรักษาที่ยุ่ยากซับซ้อน ระดับเชี่ยวชาญ มีเทคโนโลยีขั้นสูง จำนวน 1 แห่ง เป็นโรงพยาบาลทั่วไป (รพท.) ระดับ S (Standard

Level) คือ โรงพยาบาลทั่วไปขนาดใหญ่ จำนวน 2 แห่ง
โรงพยาบาลชุมชน (รพช.) ระดับ M2 (Middle Level Referral) คือ โรงพยาบาลชุมชนแม่ข่ายทุติยภูมิ จำนวน 2 แห่ง
โรงพยาบาลชุมชน ระดับ F1 (First-Level) คือ โรงพยาบาลชุมชนขนาดใหญ่ ขนาด 90-120 เตียง จำนวน 2 แห่ง และโรงพยาบาลชุมชน ระดับ F2 คือ โรงพยาบาลชุมชนขนาดกลาง ขนาด 30-90 เตียง จำนวน 21 แห่ง
สำหรับการให้บริการด้านรังสี ปัจจุบันมีการให้บริการเฉพาะด้านรังสีวินิจฉัย โดยทุกโรงพยาบาลมีเครื่องเอกซเรย์พื้นฐาน ได้แก่ เครื่องเอกซเรย์ทั่วไป เครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่ เครื่องเอกซเรย์ทันตกรรม ส่วนเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์มีในโรงพยาบาลศูนย์ โรงพยาบาลทั่วไป และโรงพยาบาลชุมชนแม่ข่าย มีการตรวจพิเศษทางรังสีเฉพาะในโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไปของแต่ละจังหวัด โดยใช้เครื่องเอกซเรย์ชนิดพิเศษ ได้แก่ เครื่องเอกซเรย์ฟลูออโรสโคปี เครื่องเอกซเรย์ C-Arm เครื่องเอกซเรย์เต้านม มีการตรวจวินิจฉัยร่วมรักษาด้านโรคหัวใจ 2 แห่ง ในโรงพยาบาลศูนย์ จังหวัดตรัง 1 แห่ง และในโรงพยาบาลทั่วไป จังหวัดพัทลุง 1 แห่ง โดยใช้เครื่องเอกซเรย์ระบบหลอดเลือดและสวนหัวใจชนิด 1 ระนาบ และชนิด 2 ระนาบ และมีเครื่องสร้างภาพด้วยสนามแม่เหล็กไฟฟ้าในโรงพยาบาลศูนย์ จังหวัดตรัง 1 แห่ง ในโรงพยาบาลทั่วไป จังหวัดพัทลุง 1 แห่ง ทุกแห่งมีการใช้ระบบสร้างภาพรังสีแบบดิจิทัล ดังแสดงในตารางที่ 2 สำหรับบุคลากรด้านรังสี พบว่ามีเจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงานด้านรังสีใน 3 จังหวัด ทั้งหมด 137 คน เป็นนักรังสีการแพทย์ จำนวน 40 คน เจ้าหน้าที่งานรังสีการแพทย์ จำนวน 13 คน และเจ้าหน้าที่อื่น ๆ จำนวน 84 คน โดยยังมีโรงพยาบาลที่ไม่มีบุคลากรวิชาชีพรังสี จำนวน 6 แห่ง อยู่ในจังหวัดตรัง 2 แห่ง จังหวัดพัทลุง 2 แห่ง และจังหวัดสตูล 2 แห่ง ดังแสดงในตารางที่ 3

ผลการประเมินคุณภาพห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัย ตามมาตรฐานห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัย กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2565 ทั้งหมด 28 แห่ง พบคะแนนอยู่ในช่วงร้อยละ 48.2-100 คะแนนเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 82.9 และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับร้อยละ 16.22 เมื่อแยกตามจังหวัดพบว่าจังหวัดพัทลุงมีผลการประเมินสูงที่สุด โดยพบคะแนนอยู่ในช่วงร้อยละ 61.9-100 คะแนนเฉลี่ย

เท่ากับร้อยละ 88.2 และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับร้อยละ 11.81 รองลงมาคือจังหวัดตรัง ได้คะแนนอยู่ในช่วงร้อยละ 48.2-97.8 คะแนนเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 79.6 และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับร้อยละ 16.18 ส่วนจังหวัดสตูลได้คะแนนอยู่ในช่วงร้อยละ 48.7-97.7 คะแนนเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 79.3 และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับร้อยละ 21.75 ดังแสดงในภาพที่ 2 และ ตารางที่ 4

เมื่อแบ่งตามประเภทโรงพยาบาล พบว่ากลุ่มโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไปได้คะแนนมากกว่าโรงพยาบาลชุมชน โดยคะแนนอยู่ในช่วงร้อยละ 87.0-97.8 คะแนนเฉลี่ยร้อยละ 94.1 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับร้อยละ 6.12 ส่วนโรงพยาบาลชุมชน คะแนนอยู่ในช่วงร้อยละ 48.2-100 คะแนนเฉลี่ยร้อยละ 81.6 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับร้อยละ 16.59 ดังแสดงในตารางที่ 5

เมื่อจัดกลุ่มตามช่วงคะแนน พบว่ามีโรงพยาบาลได้คะแนนอยู่ในระดับดีเด่น (คะแนนร้อยละ 90-100) จำนวน 11 แห่ง (ร้อยละ 39.3) อยู่ในจังหวัดตรัง 2 แห่ง พัทลุง 5 แห่ง และสตูล 4 แห่ง ระดับดีมาก (คะแนนร้อยละ 80.0-89.9) จำนวน 9 แห่ง (ร้อยละ 32.1) อยู่ในจังหวัดตรัง 5 แห่ง และพัทลุง 4 แห่ง ระดับดี (คะแนนร้อยละ 70.0-79.9) จำนวน 2 แห่ง (ร้อยละ 7.1) อยู่ในจังหวัดตรัง 1 แห่ง และพัทลุง 1 แห่ง ระดับพอใช้ (คะแนนร้อยละ 60.0-69.9) จำนวน 2 แห่ง (ร้อยละ 7.1) อยู่ในจังหวัดพัทลุง 1 แห่ง และสตูล 1 แห่ง ระดับต้องปรับปรุง (คะแนนร้อยละ 50.0-59.9) จำนวน 2 แห่ง (ร้อยละ 7.1) อยู่ในจังหวัดตรัง 1 แห่ง และสตูล 1 แห่ง และไม่ผ่านเกณฑ์ต้องแก้ไขเร่งด่วน (คะแนนต่ำกว่าร้อยละ 50.0) จำนวน 2 แห่ง (ร้อยละ 7.1) อยู่ในจังหวัดตรัง 1 แห่ง และสตูล 1 แห่ง เมื่อพิจารณาตามประเภทโรงพยาบาล พบว่ากลุ่มที่ได้ระดับดีเด่นเป็นโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไป จำนวน 2 แห่ง โรงพยาบาลชุมชน 9 แห่ง ระดับดีมาก เป็นโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไป 1 แห่ง โรงพยาบาลชุมชน 8 แห่ง ส่วนระดับดี ระดับพอใช้ ระดับต้องปรับปรุง และไม่ผ่านเกณฑ์ต้องแก้ไขเร่งด่วน เป็นโรงพยาบาลชุมชน อย่างละ 2 แห่ง ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 2 ชนิดและจำนวนเครื่องเอกซเรย์ในโรงพยาบาลสังกัดกระทรวงสาธารณสุขในเขตพื้นที่จังหวัดตรัง พัทลุง และสตูล

จังหวัด	ชื่อ รพ.	ชนิด รพ.	ระดับ	จำนวนเตียง	ระบบสร้างภาพรังสี	GEN	Flu	Mobile	รถเอกซเรย์	DENT	OPG	CBCT	C-Arm	ส่วนหัวใจ 1	ส่วนหัวใจ 2	เต้านม	CT	มวลกระดูก	MRI	รวม
ตรัง	ตรัง	รพศ.	A	559	DR	4		5		2	1		4	2	1	1	2	1	1	24
	ห้วยยอด	รพช.	M2	90	DR	2		2		1	1		1				1			9
	กันตัง	รพช.	F1	60	DR	1		1		1										3
	ย่านตาขาว	รพช.	F1	60	DR	1		1		1										3
	ปะเหลียน	รพช.	F2	30	DR	1		1		1										3
	ลิเกา	รพช.	F2	60	DR	1		1		1										3
	วังวิเศษ	รพช.	F2	30	DR	1		1		1										3
	รัชฎา	รพช.	F2	30	DR	1		2		1										4
	นาโยง	รพช.	F2	60	DR	1		1		1										3
	หาดสำราญ	รพช.	F2	30	DR	1		1		1										3
รวม						14		16		11	2	1	5	2	1	1	3	1	1	58
พัทลุง	พัทลุง	รพท.	S	450	DR	5	1	8	1	4		1	3	1		1	1		1	27
	ควนขนุน	รพช.	M2	90	DR	2		1		2		1	1				1			8
	ตะโหมด	รพช.	F2	30	DR	1		1		1										3
	ปากพะยูน	รพช.	F2	30	DR	1		2		1										4
	ป่าบอน	รพช.	F2	30	DR	1				2										3
	บางแก้ว	รพช.	F2	30	DR	1		1		1										3
	กงหรา	รพช.	F2	30	DR	1		1		1										3
	เขาชัยสน	รพช.	F2	30	DR	1		1		1										3
	ศรีบรรพต	รพช.	F2	30	DR	1				1										2

ตารางที่ 2 ชนิดและจำนวนเครื่องเอกซเรย์ในโรงพยาบาลสังกัดกระทรวงสาธารณสุขในเขตพื้นที่จังหวัดตรัง พัทลุง และสตูล (ต่อ)

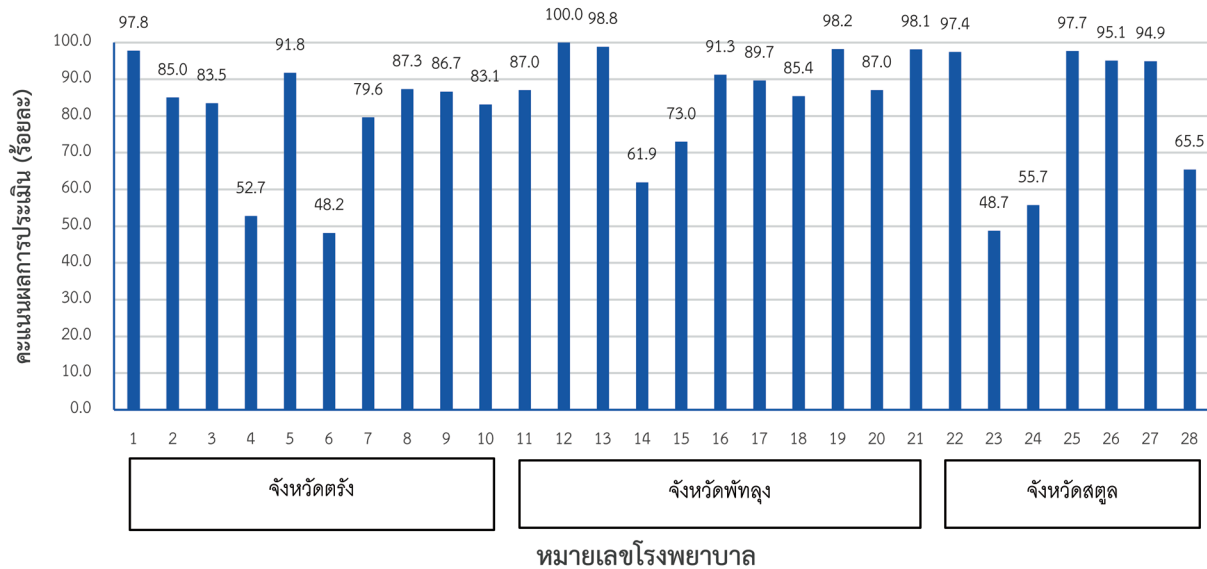
จังหวัด	ชื่อ รพ.	ชนิด รพ.	ระดับ	จำนวนเตียง	ระบบสร้างภาพรังสี	GEN	Flu	Mobile	รถเอกซเรย์	DENT	OPG	CBCT	C-Arm	ส่วนหัวใจ 1 ระบาย	ส่วนหัวใจ 2 ระบาย	เต้านม	CT กระดูก	MRI	รวม
สตูล	ป่าพะยอม	รพช.	F2	30	DR	1	1	1	1	1									3
	ศรีนครินทร์	รพช.	F2	30	DR	1	1	1	1	1									3
	รวม					16	1	17	1	16	2	4	1	1	2	1			62
สตูล	สตูล	รพท.	S	186	DR	1	1	8	1	1	1	3			1	1	1		18
	ละงู	รพช.	M2	114	DR	1		5	1	1	1					1			9
	ควนกาหลง	รพช.	F2	30	DR	1		1	1	1									3
	ควนโดน	รพช.	F2	30	DR	1		1	1	1									3
	ท่าแพ	รพช.	F2	30	DR	1		1	1	1									3
	ทุ่งหว้า	รพช.	F2	30	DR	1		2	1	1									4
	มะนัง	รพช.	F2	30	CR	1		1	1	1									3
	รวม					7	1	19	7	7	2	3			1	2	1		43
รวมทั้งหมด						37	2	52	1	34	2	5	12	3	1	3	7	2	163

หมายเหตุ: DR = Digital Radiography เครื่องสร้างภาพรังสีแบบดิจิทัล, CR = Computer Radiography เครื่องสร้างภาพรังสีแบบดิจิทัลที่ต้องมีเครื่องอ่าน, GEN = General X-ray machine เครื่องเอกซเรย์ทั่วไป, Flu = Fluoroscopy X-ray Machine เครื่องเอกซเรย์ฟลูออโรสโคปี, Mobile = Mobile X-Ray Machine เครื่องเอกซเรย์เคลื่อนที่, DENT = Intra-oral Dental X-Ray Machine เครื่องเอกซเรย์ฟันชนิดถ่ายภาพในช่องปาก, OPG = Orthopantomography and Cephalometric X-ray Machine เครื่องเอกซเรย์ฟันชนิดถ่ายภาพรอบปาก และกะโหลกศีรษะ, CBCT = Cone Beam Computer X-ray Machine เครื่องเอกซเรย์ทันตกรรมแบบสร้างภาพตัดขวางด้วยลำรังสีรูปกรวย, C-Arm = C-Arm X-ray Machine เครื่องเอกซเรย์ชนิด C-Arm, CT = Computed Tomography X-ray Machine เครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ และ MRI = Magnetic Resonance Imaging เครื่องสร้างภาพด้วยสนามแม่เหล็กไฟฟ้า

ตารางที่ 3 จำนวนบุคลากรด้านรังสีและผลการประเมินคุณภาพห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัยของโรงพยาบาล
สังกัดกระทรวงสาธารณสุขในเขตพื้นที่จังหวัดตรัง พัทลุง และสตูล จำนวน 28 แห่ง

จังหวัด	หมายเลข รพ.	ชื่อ รพ.	ชนิด รพ.	ระดับ	จำนวนเตียง	จำนวน นักรังสี	จำนวน เจ้าพนักงาน รังสี	จำนวน เจ้าหน้าที่ อื่น ๆ ในแผนก
ตรัง	1	ตรัง	รพศ.	A	559	12	1	12
	2	ห้วยยอด	รพช.	M2	90	1		7
	3	กันตัง	รพช.	F1	60		2	2
	4	ย่านตาขาว	รพช.	F1	60		1	2
	5	ปะเหลียน	รพช.	F2	30	1		1
	6	ลิเกา	รพช.	F2	60			3
	7	วังวิเศษ	รพช.	F2	30			5
	8	รัชฎา	รพช.	F2	30	1		2
	9	นาโยง	รพช.	F2	60		2	2
	10	หาดสำราญ	รพช.	F2	30	1		1
						16	6	37
พัทลุง	11	พัทลุง	รพท.	S	450	10	1	12
	12	ควนขนุน	รพช.	M2	90	1	1	3
	13	ตะโหมด	รพช.	F2	30	1	1	1
	14	ปากพะยูน	รพช.	F2	30			2
	15	ป่าบอน	รพช.	F2	30			2
	16	บางแก้ว	รพช.	F2	30		1	1
	17	กงหรา	รพช.	F2	30	1		1
	18	เขาชัยสน	รพช.	F2	30		1	1
	19	ศรีบรรพต	รพช.	F2	30	1		1
	20	ป่าพะยอม	รพช.	F2	30	1		2
	21	ศรีนครินทร์	รพช.	F2	30	1		1
						16	5	27
สตูล	22	สตูล	รพท.	S	186	4	1	7
	23	ละงู	รพช.	M2	114			2
	24	ควนกาหลง	รพช.	F2	30	1		3
	25	ควนโดน	รพช.	F2	30	2		2
	26	ท่าแพ	รพช.	F2	30		1	2
	27	ทุ่งหว้า	รพช.	F2	30	1		2
	28	มะนัง	รพช.	F2	30			2
						8	2	20
รวม						40	13	84

หมายเหตุ: ที่ขีดเส้นใต้คือไม่มีเจ้าหน้าที่รังสี



ภาพที่ 2 แผนภูมิแสดงคะแนนผลการประเมินคุณภาพห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัยของโรงพยาบาลสังกัดกระทรวงสาธารณสุข ในเขตพื้นที่จังหวัดตรัง พัทลุง และสตูล (แสดงเป็นหมายเลข ตารางที่ 3)

ตารางที่ 4 สรุปคะแนนผลการประเมินคุณภาพห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัยของโรงพยาบาลสังกัดกระทรวงสาธารณสุข ในเขตพื้นที่จังหวัดตรัง พัทลุง และสตูล แยกตามจังหวัด

จังหวัด	จำนวน (แห่ง)	คะแนนการประเมิน (ร้อยละ)			
		ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
ตรัง	10	48.2	97.8	79.6	16.18
พัทลุง	11	61.9	100.0	88.2	11.81
สตูล	7	48.7	97.7	79.3	21.75
ภาพรวม	28	48.2	100	82.9	16.22

ตารางที่ 5 คะแนนจากการประเมินคุณภาพห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัยของโรงพยาบาลสังกัดกระทรวงสาธารณสุข ในเขตพื้นที่จังหวัดตรัง พัทลุง และสตูล แบ่งตามประเภทโรงพยาบาล

ประเภทโรงพยาบาล	จำนวน (แห่ง)	คะแนนการประเมิน (ร้อยละ)			
		ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
รพศ./รพท.	3	87.0	97.8	94.1	6.12
รพช.	25	48.2	100.0	81.6	16.59
ภาพรวม	28	48.2	100	82.9	16.22

ตารางที่ 6 จำนวนโรงพยาบาลที่ได้รับการพัฒนาคุณภาพห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัย ตามมาตรฐานห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัย กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2565 แต่ละระดับการพัฒนาในเขตพื้นที่จังหวัดตรัง พัทลุง และสตูล

ระดับการพัฒนา	ช่วงคะแนน	จังหวัดตรัง		จังหวัดพัทลุง		จังหวัดสตูล		ภาพรวม	
		รพศ.	รพช.	รพท.	รพช.	รพท.	รพช.	จำนวน	ร้อยละ
ดีเด่น	90-100	1	1		5	1	3	11	39.3
ดีมาก	80-89.9		5	1	3			9	32.1
ดี	70-79.9		1		1			2	7.1
พอใช้	60-69.9				1		1	2	7.1
ต้องปรับปรุง	50-59.9		1				1	2	7.1
ไม่ผ่านเกณฑ์	ต่ำกว่า 50		1				1	2	7.1
ต้องแก้ไขเร่งด่วน									
รวม		1	9	1	10	1	6	28	100

เมื่อพิจารณาตามหัวข้อการประเมิน 10 หัวข้อหลัก แต่ละจังหวัดตามประเภทโรงพยาบาล พบว่าในจังหวัดตรัง โรงพยาบาลศูนย์ ส่วนใหญ่แต่ละหัวข้อได้คะแนนร้อยละ 100 คือ ไม่พบข้อบกพร่อง แต่มีหัวข้อที่ต้องพัฒนาเพิ่มเติม คือ หัวข้อที่ 3 เครื่องมือและอุปกรณ์ ได้คะแนนร้อยละ 85.7 หัวข้อที่ 6 สถานที่และสิ่งแวดล้อม ได้คะแนนร้อยละ 94.4 และหัวข้อที่ 7 ความปลอดภัย ได้คะแนนร้อยละ 97.8 ตามลำดับ ส่วนโรงพยาบาลชุมชนพบว่าหัวข้อที่ได้รับการพัฒนามากที่สุด คือ หัวข้อที่ 8 กระบวนการให้บริการทางรังสี ได้คะแนนร้อยละ 97.2 รองลงมา คือ หัวข้อที่ 6 สถานที่และสิ่งแวดล้อม และหัวข้อที่ 5 การควบคุมเอกสาร ได้คะแนนร้อยละ 91.0 และ 90.7 ตามลำดับ หัวข้อที่ต้องได้รับการพัฒนามากที่สุด คือ หัวข้อที่ 10 การตรวจติดตามภายในและประเมินผล ได้คะแนนร้อยละ 44.4 รองลงมา คือ หัวข้อที่ 1 องค์กรและการบริหาร ได้คะแนนร้อยละ 51.9 และหัวข้อที่ 2 บุคลากร ได้คะแนนร้อยละ 71.1

จังหวัดพัทลุง โรงพยาบาลทั่วไป หัวข้อที่ได้รับการพัฒนามากที่สุด คือ หัวข้อที่ 5 การควบคุมเอกสาร หัวข้อที่ 8 กระบวนการให้บริการทางรังสี และหัวข้อที่ 9 การรายงานผล ทุกข้อได้คะแนนร้อยละ 100 คือ ไม่พบข้อบกพร่อง ลำดับถัดมา คือ หัวข้อที่ 6 สถานที่และสิ่งแวดล้อม ได้คะแนนร้อยละ 94.4 เรื่องที่ต้องพัฒنالำดับแรก คือ หัวข้อที่ 10 การตรวจติดตามภายในและประเมินผล ได้คะแนนร้อยละ 50 รองลงมา คือ หัวข้อที่ 2 บุคลากร ได้คะแนนร้อยละ 80.0 และ หัวข้อที่ 1 องค์กรและการบริหาร ได้คะแนนร้อยละ 83.3 ส่วนโรงพยาบาล

ชุมชน พบว่าหัวข้อที่ได้รับการพัฒนามากที่สุด คือ หัวข้อที่ 8 กระบวนการให้บริการทางรังสี และหัวข้อที่ 9 การรายงานผล ทั้ง 2 หัวข้อ ได้คะแนนร้อยละ 100 และรองลงมา คือ หัวข้อที่ 3 เครื่องมือและอุปกรณ์ ได้คะแนนร้อยละ 96.8 และหัวข้อที่ 6 สถานที่และสิ่งแวดล้อม ได้คะแนนร้อยละ 92.4 เรื่องที่ต้องได้รับการพัฒنالำดับแรก คือ หัวข้อที่ 4 การประกันคุณภาพ ได้คะแนนร้อยละ 79.2 รองลงมา คือ หัวข้อที่ 1 องค์กรและการบริหาร ได้คะแนนร้อยละ 79.6 และหัวข้อที่ 2 บุคลากร ได้คะแนนร้อยละ 80.0

จังหวัดสตูล โรงพยาบาลทั่วไปได้รับพัฒนามากที่สุด คือ หัวข้อที่ 2, 4, 5, 6, 8 และ 9 ได้คะแนนร้อยละ 100 คือ ไม่พบข้อบกพร่อง เรื่องที่ต้องพัฒنالำดับแรก คือ หัวข้อที่ 1 องค์กรและการบริหาร รองลงมา คือ หัวข้อที่ 3 เครื่องมือและอุปกรณ์ และหัวข้อที่ 7 ความปลอดภัย ได้คะแนนร้อยละ 83.3, 92.9 และ 97.8 ตามลำดับ ส่วนโรงพยาบาลชุมชน พบว่าหัวข้อที่ได้รับการพัฒนามากที่สุด คือ หัวข้อที่ 3 เครื่องมือและอุปกรณ์ ได้คะแนนร้อยละ 94.0 รองลงมา คือ หัวข้อที่ 8 กระบวนการให้บริการทางรังสี ได้คะแนนร้อยละ 92.7 และหัวข้อที่ 6 สถานที่และสิ่งแวดล้อม ได้คะแนนร้อยละ 87.5 เรื่องที่ต้องได้รับการพัฒنالำดับแรก คือ หัวข้อที่ 10 การตรวจติดตามภายในและประเมินผล ได้คะแนนร้อยละ 50.0 รองลงมา คือ หัวข้อที่ 4 การประกันคุณภาพ ได้คะแนนร้อยละ 60.4 และหัวข้อที่ 1 องค์กรและการบริหาร และหัวข้อที่ 2 บุคลากร ทั้ง 2 ข้อ ได้คะแนนร้อยละ 66.7 ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 คะแนนเฉลี่ยจากการประเมินคุณภาพห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัยของ 10 หัวข้อหลัก ตามมาตรฐาน
ห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัย กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ.2565 แบ่งตามประเภทโรงพยาบาล ในจังหวัดตรัง
พัทลุงและสตูล (ร้อยละ)

หัวข้อ/เรื่อง	ภาพรวม	จังหวัดตรัง		จังหวัดพัทลุง		จังหวัดสตูล	
		รพศ.	รพช.	รพท.	รพช.	รพท.	รพช.
หัวข้อที่ 1 องค์กรและการบริหาร	69.6	100.0	51.9	83.3	79.6	83.3	66.7
หัวข้อที่ 2 บุคลากร	76.4	100.0	71.1	80.0	80.0	100.0	66.7
หัวข้อที่ 3 เครื่องมือและอุปกรณ์	92.9	85.7	88.9	85.7	96.8	92.9	94.0
หัวข้อที่ 4 การประกันคุณภาพ	74.1	100.0	72.2	87.5	79.2	100.0	60.4
หัวข้อที่ 5 การควบคุมเอกสาร	86.9	100.0	90.7	100.0	81.5	100.0	80.6
หัวข้อที่ 6 สถานที่และสิ่งแวดล้อม	91.6	94.4	91.0	94.4	92.4	100.0	87.5
หัวข้อที่ 7 ความปลอดภัย	85.5	97.8	81.9	89.1	89.2	97.8	80.7
หัวข้อที่ 8 กระบวนการให้บริการทางรังสี	97.5	100.0	97.2	100.0	100.0	100.0	92.7
หัวข้อที่ 9 การรายงานผล	92.2	100.0	86.1	100.0	100.0	100.0	83.3
หัวข้อที่ 10 การตรวจติดตามภายในและ ประเมินผล	69.6	100.0	44.4	50.0	83.3	100.0	50.0

เมื่อพิจารณารายละเอียดพบว่าเรื่องที่ได้รับการพัฒนาและต้องปรับปรุงแก้ไขในแต่ละหัวข้อยังมี

หัวข้อที่ 1 องค์กรและการบริหาร ได้คะแนนภาพรวมร้อยละ 69.6 เรื่องที่ได้รับการพัฒนาของหัวข้อนี้นี้ คือ การจัดหาทรัพยากรที่จำเป็น เช่น เครื่องเอกซเรย์ ระบบสร้างภาพรังสี ครอบคลุมและได้มาตรฐาน เรื่องที่พบปัญหาได้แก่ ยังไม่มีการศึกษาข้อมูลทางสถิติที่เป็นตัวชี้วัดในการปฏิบัติงาน ไม่มีการจัดทำแผนปรับปรุงคุณภาพ และการสำรวจความพึงพอใจการให้บริการทั้งภายในและภายนอก ไม่พบเอกสารที่แสดงนโยบาย/ระเบียบปฏิบัติในการป้องกันข้อมูลที่เป็นความลับผู้ป่วยและสิทธิผู้ป่วย และความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้มีบางแห่งที่ไม่มีคู่มือคุณภาพ โดยพบในโรงพยาบาลทั่วไปบางแห่ง และพบมากในโรงพยาบาลชุมชนของทั้ง 3 จังหวัด

หัวข้อที่ 2 บุคลากร ได้คะแนนภาพรวมร้อยละ 76.4 เรื่องที่ได้รับการพัฒนาของหัวข้อนี้นี้ คือ หน่วยงานเริ่มให้ความสำคัญกับบุคลากรด้านวิชาชีพรังสีมากขึ้น มีการกำหนดบทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบ มีการจัดทำแผนพัฒนาบุคลากรประจำปี มีการบันทึกประวัติการฝึกอบรม เรื่องที่พบปัญหาในบางโรงพยาบาล ได้แก่ ไม่มีการประเมินความสามารถในการปฏิบัติงานรังสีเมื่อเริ่มเข้ามาปฏิบัติงาน การจัดให้มีเจ้าหน้าที่รังสีปฏิบัติงานได้ตลอดเวลาที่

ให้บริการยังไม่พอเพียง และไม่มีนักรังสีการแพทย์ในโรงพยาบาลชุมชนของทั้ง 3 จังหวัด จำนวน 6 แห่ง

หัวข้อที่ 3 เครื่องมือและอุปกรณ์ ได้คะแนนภาพรวมร้อยละ 92.9 จุดเด่นของหัวข้อนี้นี้สอดคล้องการบริหารจัดการในหัวข้อที่ 1 คือ การจัดหาเครื่องมืออุปกรณ์ในการให้บริการทางรังสีครอบคลุมและได้มาตรฐาน ซึ่งจากผลการสำรวจข้อมูล พบว่าโรงพยาบาลส่วนใหญ่มีเครื่องเอกซเรย์ที่จำเป็นสำหรับใช้งานครบถ้วน แต่พบปัญหาบางโรงพยาบาลเครื่องเอกซเรย์ใช้งานมานาน มีการชำรุด รื้อซ่อมแซม ต้องจัดทำแผนเพื่อซื้อทดแทน บางแห่งมีปัญหาเรื่องระบบควบคุมไฟฟ้าที่เข้าเครื่องเอกซเรย์ไม่ได้มาตรฐาน โดยพบในโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไปมากกว่าโรงพยาบาลชุมชน โดยเฉพาะในจังหวัดตรัง

หัวข้อที่ 4 การประกันคุณภาพ ได้คะแนนภาพรวมร้อยละ 74.1 เรื่องที่ได้รับการพัฒนาของหัวข้อนี้นี้ คือ ทุกโรงพยาบาลได้มีการจัดทำแผนการควบคุมคุณภาพเครื่องมือ จุดที่ยังพบปัญหามาก คือ การควบคุมคุณภาพระบบสร้างภาพรังสีดิจิทัลที่เป็นเทคโนโลยีที่เข้ามาแทนระบบฟิล์มเอกซเรย์ ซึ่งมีหลากหลายรุ่นและยี่ห้อ เจ้าหน้าที่รังสีต้องศึกษาเพิ่มเติมเรื่องการควบคุมคุณภาพเนื่องจากมีผลต่อการแปลผลภาพรังสีในการวินิจฉัย และปัญหาถัดมา คือ มีบางแห่งไม่มีการวิเคราะห์คุณภาพ

ภาพถ่ายรังสีและอัตราการถ่ายภาพรังสีซ้ำ โดยพบมาก
ในโรงพยาบาลชุมชนทั้ง 3 จังหวัด

หัวข้อที่ 5 การควบคุมเอกสาร ได้คะแนนภาพรวมร้อยละ 86.9 เรื่องที่ได้รับการพัฒนาของหัวข้อนี้คือ
ทุกแห่งมีการจัดเก็บภาพถ่ายรังสี มีการป้องกันเข้าถึงของ
ผู้ที่ได้รับอนุญาต ปัญหาที่พบ คือ บางแห่งไม่พบการ
ลงทะเบียนเครื่องมือ ไม่พบประวัติเครื่องมือ และไม่พบ
คู่มือการใช้งานของเครื่องมือ โดยพบมากในโรงพยาบาล
ชุมชนในจังหวัดพัทลุงและสตูล

หัวข้อที่ 6 สถานที่และสิ่งแวดล้อม ได้คะแนนภาพรวมร้อยละ 91.6 จุดเด่นของหัวข้อเรื่องที่ได้รับการพัฒนา
ของหัวข้อนี้คือ ห้องตรวจทางรังสีและสภาวะแวดล้อมได้
มาตรฐาน ที่ยังพบปัญหาในบางแห่ง ได้แก่ พื้นที่รองรับ
บริการ พื้นที่ลงทะเบียนรับผู้ป่วย และห้องเปลี่ยนเสื้อผ้า
ยังไม่เพียงพอหรือไม่เหมาะสม โดยพบโรงพยาบาลชุมชน
มากกว่าโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไป โดยเฉพาะ
ในจังหวัดสตูล

หัวข้อที่ 7 ความปลอดภัย ได้คะแนนภาพรวมร้อยละ 85.5 เรื่องที่ได้รับการพัฒนาของหัวข้อนี้คือ ทุกแห่ง
มีวัสดุป้องกันรังสีสำหรับเจ้าหน้าที่และญาติผู้ป่วย รวมทั้ง
มีวัสดุเวชภัณฑ์ที่จำเป็น เช่น ถุงมือ หน้ากากอนามัย
มีเส้นทางการเคลื่อนย้ายผู้ป่วยที่ชัดเจน จุดที่ยังต้อง
ปรับปรุงในบางแห่ง คือ การประเมินค่าปริมาณรังสี
ที่ผู้ป่วยได้รับอย่างเหมาะสม การอบรมการป้องกัน
อันตรายจากรังสีให้เจ้าหน้าที่อื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น
พยาบาล เวิร์เพล บางแห่งยังไม่มีป้ายทางหนีไฟ ขาดการ
จัดการความเสี่ยงให้กับผู้ป่วยกรณีตั้งครุฑ ระบบ
ไฟส่องสว่างกรณีฉุกเฉินไม่ครอบคลุมมายังห้องเอกซเรย์
โดยพบทั้งในโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไป
แต่พบมากกว่าโรงพยาบาลชุมชนในทั้ง 3 จังหวัด

หัวข้อที่ 8 กระบวนการให้บริการทางรังสี ได้
คะแนนภาพรวมร้อยละ 97.5 หัวข้อนี้โรงพยาบาล
ทุกระดับทั้ง 3 จังหวัดได้รับการพัฒนามากที่สุด เช่น
จุดเด่น ได้แก่ การมีตารางเทคนิคในการให้บริการรังสี
หรือโปรโตคอลที่ใช้ถ่ายภาพ คำแนะนำก่อนเข้ารับบริการ
การนัดผู้ป่วยกรณีมีการตรวจพิเศษ พบข้อบกพร่อง
แค่ส่วนน้อย ได้แก่ ไม่มีคู่มือการบริการทางรังสี ไม่มี

การบ่งชี้ของแพทย์ในใบส่งถ่ายเอกซเรย์ การทวนสอบ
ผู้ป่วยวัยเจริญพันธุ์หรือประวัติการตั้งครรภ์ โดยพบบ้าง
ในโรงพยาบาลชุมชนในจังหวัดตรังและสตูล

หัวข้อที่ 9 การรายงานผล ได้คะแนนภาพรวมร้อยละ 92.0 จุดเด่นของหัวข้อนี้ เรื่องที่ได้รับการพัฒนา
ทุกแห่งคือ ข้อมูลผู้รับบริการมีครบถ้วนในใบรายงานผล
และบนภาพถ่ายรังสีพบปัญหาในบางแห่งที่ไม่มี
การควบคุมคุณภาพภาพถ่ายรังสีก่อนส่งให้แพทย์โดยพบ
ในโรงพยาบาลชุมชนในจังหวัดตรังและสตูล โดยเฉพาะ
โรงพยาบาลที่ไม่มีเจ้าหน้าที่รังสี

หัวข้อที่ 10 การตรวจติดตามภายในและประเมินผล
ได้คะแนนภาพรวมร้อยละ 62.5 หัวข้อนี้การดำเนินงาน
ยังน้อยพบปัญหาคือ ไม่พบข้อมูลการทบทวนระบบบริหาร
การปฏิบัติการแก้ไข การป้องกันโอกาสเสี่ยงที่เกิดซ้ำ
ขาดแผนพัฒนาปรับปรุงอย่างต่อเนื่อง โดยพบทั้งในกลุ่ม
โรงพยาบาลศูนย์ โรงพยาบาลทั่วไป และโรงพยาบาล
ชุมชน โดยพบมากในโรงพยาบาลชุมชนของทั้ง 3 จังหวัด

วิจารณ์

จากการประเมินคุณภาพห้องปฏิบัติการรังสี
วินิจฉัยของโรงพยาบาลสังกัดกระทรวงสาธารณสุข
ในเขตพื้นที่จังหวัดตรัง พัทลุง และสตูล ตามมาตรฐาน
ห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัย กระทรวงสาธารณสุข
พ.ศ. 2565 เห็นได้ว่าโรงพยาบาลส่วนใหญ่มีผลการ
ประเมินมากกว่าร้อยละ 80 โดยอยู่ในระดับดีมากและ
ดีเด่น จำนวน 22 แห่ง จากทั้งหมด 28 แห่ง โดยเฉพาะ
โรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไปทั้ง 3 แห่ง
ได้คะแนนมากกว่าร้อยละ 80 เมื่อพิจารณาผลคะแนน
แต่ละหัวข้อจะเห็นได้ว่ากลุ่มดังกล่าวมีการพัฒนา
ทุกหัวข้อมีเรื่องที่ต้องพัฒนาเพิ่มเติมบางส่วน ได้แก่
การติดตามภายในและการประเมินผล องค์กร และ
การบริหาร และเครื่องมือและอุปกรณ์ ปัญหาที่พบ คือ
เครื่องเอกซเรย์ใช้งานมานานมีการชำรุด รอยซ่อมแซม
ด้วยเหตุผลที่ผู้รับบริการส่วนใหญ่นิยมมาใช้บริการ
ในโรงพยาบาลขนาดใหญ่ ทำให้ไม่เพียงพอต่อการให้
บริการ คนไข้ต้องรอคิวนาน จำเป็นต้องจัดทำแผน

เพื่อชื้อทดแทน สำหรับโรงพยาบาลชุมชนส่วนใหญ่ มีคะแนนมากกว่าร้อยละ 80 ที่น่าสังเกต คือ โรงพยาบาลชุมชนในเขตพื้นที่นี้มีเครื่องมืออุปกรณ์ครบถ้วนและมีเพียง 8 แห่ง ที่คะแนนไม่ถึงร้อยละ 80 ในกลุ่มนี้เป็นโรงพยาบาลที่มีเจ้าหน้าที่รังสี 2 แห่ง ไม่มีเจ้าหน้าที่รังสี 6 แห่ง โดยมีโรงพยาบาลชุมชนที่ไม่มีเจ้าหน้าที่รังสี 2 แห่ง ที่คะแนนไม่ถึงร้อยละ 50 ทำให้คะแนนในภาพรวมต่ำ จำเป็นต้องมีการแก้ไข คือ การจัดหาเจ้าหน้าที่รังสีอย่างเร่งด่วน จากผลการประเมินจะเห็นได้ว่าโรงพยาบาลทุกแห่งทั้ง 3 จังหวัด หัวข้อที่ได้รับการพัฒนามากที่สุด คือ กระบวนการให้บริการทางรังสี เป็นไปได้ว่าผู้ที่เข้ามาปฏิบัติงานต้องดำเนินการหัวข้อนี้ให้ครบถ้วนก่อนที่จะพัฒนาหัวข้ออื่น เนื่องจากเป็นหัวข้อหลักในการให้บริการทางรังสี ส่วนเรื่องที่ยังพัฒนาได้น้อยที่สุดในทุกโรงพยาบาลของทุกจังหวัด คือ หัวข้อที่ 10 เรื่องการตรวจติดตามภายในและการประเมินผลและหัวข้อที่ 1 เรื่ององค์การและการบริหาร เป็นไปได้ว่าเรื่องเหล่านี้ผู้ปฏิบัติงานอาจไม่คุ้นเคยหรือไม่มีความรู้จึงต้องอาศัยทีมงานคุณภาพของโรงพยาบาลเองหรือจากหน่วยงานภายนอกที่จะสร้างความเข้าใจ ช่วยผลักดันให้การดำเนินการส่วนนี้มีผลสำเร็จมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาของ สุภาศิ สมบูรณ์รัตน์ และคณะ⁽⁸⁾ ที่ศึกษาผลการพัฒนาห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัยในโรงพยาบาลสังกัดกระทรวงสาธารณสุข ในเขตสุขภาพที่ 9 เมื่อปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 พบว่าผลการพัฒนาสอดคล้องกัน คือ หัวข้อการให้บริการทางรังสีได้รับการพัฒนามากที่สุด และการพัฒนาในภาพรวมของโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไปพัฒนาได้ดีกว่าโรงพยาบาลชุมชน อย่างไรก็ตามผลการศึกษาครั้งนี้ พบว่าทุกชนิดโรงพยาบาลมีการพัฒนาครอบคลุมทุกหัวข้อมากขึ้น อาจเป็นเพราะว่าโรงพยาบาลได้มีการพัฒนาให้ได้ตามเกณฑ์มาตรฐานมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2558 แนวโน้มการพัฒนาจึงมีมากขึ้น ปัจจัยที่สำคัญ คือ การดำเนินงานอย่างต่อเนื่อง การทำงานในรูปแบบเครือข่ายกับพื้นที่ ทั้งในส่วนของโรงพยาบาลเอง โรงพยาบาลที่เป็นต้นแบบ การสนับสนุนจากสำนักงานสาธารณสุขจังหวัด และการทำงานเป็นทีมในพื้นที่ จึงทำให้มีการพัฒนามากขึ้น

สรุป

จากผลการประเมินตามข้อกำหนดตามเกณฑ์มาตรฐานห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัย กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2565 ครั้งนี้ ห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัยของโรงพยาบาลสังกัดกระทรวงสาธารณสุขในจังหวัดตรัง พัทลุง และสตูล มีการพัฒนาคุณภาพตามเกณฑ์ โดยส่วนใหญ่อยู่ในระดับดีมากและดีเด่น จังหวัดที่ได้รับการพัฒนามากที่สุด คือ จังหวัดพัทลุง สำหรับโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไปทั้งหมดมีการพัฒนาอยู่ในระดับดีมากและดีเด่น เรื่องที่ต้องพัฒนาเพิ่มเติม คือ หัวข้อที่ 10 การตรวจติดตามภายในและประเมินผล หัวข้อที่ 3 เครื่องมือและอุปกรณ์ และหัวข้อที่ 1 องค์การและการบริหาร สำหรับโรงพยาบาลชุมชน ส่วนใหญ่ผลการประเมินอยู่ในระดับดีมาก แต่มีจำนวน 8 แห่ง ที่คะแนนต่ำกว่าร้อยละ 80 โดยมีจำนวน 6 แห่ง ไม่มีเจ้าหน้าที่รังสี และพบ 2 แห่ง ไม่ผ่านเกณฑ์ ปัญหาที่พบในโรงพยาบาลชุมชน อันดับแรก คือ หัวข้อที่ 10 การตรวจติดตามภายในและประเมินผล เช่นเดียวกับโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไป รองลงมาเป็นปัญหาเรื่องบุคลากร โดยมีข้อเสนอแนะ คือ ผู้บริหารควรสนับสนุนให้มีการพัฒนาห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัยของโรงพยาบาลอย่างต่อเนื่อง มีการตรวจติดตามภายในทุกปี เพื่อธำรงรักษาเรื่องที่ได้มีการพัฒนาแล้วและเพิ่มเติมส่วนที่ขาด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการรังสีของโรงพยาบาลทุกแห่ง และผู้ประสานงานจากสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดตรัง พัทลุง และสตูล ที่ให้ความร่วมมือในการดำเนินการในครั้งนี้ ตลอดจนผู้อำนวยการและเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการรังสีและเครื่องมือแพทย์ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12/1 ตรัง กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้การสนับสนุนการดำเนินงานจนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. International Commission on Radiological Protection. ICRP Publication 60, Recommendations of the international commission on radiological protection. Oxford: Pergamon Press; 1990. p. 25-49.
2. Lloyd PJ. Quality assurance workbook for radiographers and radiological technologists. Geneva: World Health Organization; 2001.
3. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. เกณฑ์และแนวทางการพัฒนางานรังสีวินิจฉัย โรงพยาบาลสังกัดกระทรวงสาธารณสุข. นนทบุรี: สำนักรังสีและเครื่องมือแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2555.
4. กรมสนับสนุนบริการสุขภาพ กระทรวงสาธารณสุข. แนวทางการตรวจประเมินบริการรังสีวิทยาในสถานพยาบาลประเภทที่รับผู้ป่วยไว้ค้างคืน ฉบับปรับปรุงครั้งที่ 2. นนทบุรี: กลุ่มงานสถานพยาบาล กองการประกอบโรคศิลปะ; 2551.
5. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. เกณฑ์และแนวทางการพัฒนางานรังสีวินิจฉัย โรงพยาบาลสังกัดกระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2558. นนทบุรี: สำนักรังสีและเครื่องมือแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2558.
6. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. มาตรฐานห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัย กระทรวงสาธารณสุข นนทบุรี: สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2562.
7. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. มาตรฐานห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัย กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2565. นนทบุรี: สำนักรังสีและเครื่องมือแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2565.
8. สุภาศิษย์มธุรจันน์, อุมวดีสังข์ทอง, อรุณรัตน์ปัทมาทุม. ผลการพัฒนาห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัยในโรงพยาบาลสังกัดกระทรวงสาธารณสุขในเขตสุขภาพที่ 9. ว กรมวิทย พ 2559; 58(3): 180-8.

Development of the Quality of Diagnostic Radiology Laboratories in Hospitals, Ministry of Public Health, in Trang, Phatthalung, and Satun Provinces, Thailand

Siriwan Buncharat, Suchawalee Chuamahawan, and Jeeraporn Songkow,
*Regional Medical Sciences Center 12/1 Trang, Department of Medical Sciences, Muang District,
Trang 92000, Thailand*

ABSTRACT Developing the quality of diagnostic radiology laboratories is important to produce quality X-ray images for diagnosis and help patients receive the appropriate amount of radiation. Regional Medical Sciences Center 12/1 Trang, Department of Medical Sciences, has continuously developed the quality of diagnostic radiology laboratories in 28 hospitals under the Ministry of Public Health, Thailand, in Trang, Phatthalung, and Satun provinces since 2015 using the Ministry of Public Health's Diagnostic Radiology Laboratory Standards. With the hospital network and the Provincial Public Health Office, radiology laboratory personnel have been trained, provided relevant knowledge, and conducted internal monitoring and evaluations. From March to September 2023, the quality development was evaluated according to the Ministry of Public Health's Diagnostic Radiology Laboratory Standards 2022. The results showed that most laboratories developed their quality according to the standard criteria, with an average score was as 82.9%. Among these 28 hospitals, 22 hospitals (78.6%) developed at the good-excellent level (score 70-100%), while 4 hospitals (14.3%) were at the fair level and needed improvement (score 50-69.9%) and 2 hospitals (7.1%) did not pass the criteria which needed urgent correction (< 50%). The Regional and General Hospitals scored higher than Community Hospitals, with average scores of 94.1 and 81.6%, respectively. The topics that gained the most development with scores higher than 90%, were the process of providing radiology services, equipment, premises and environment, and result reporting. The document control and safety topics received 80-90%, while those of personnel and quality assurance received 70-80%. The lowest scores were for organization and management, and internal auditing and evaluation with 69.6 and 62.5%, respectively. Thus, these issues should be further developed and improved.

Keywords: Diagnostic radiology laboratory, Quality of diagnostic radiology laboratory, Internal Audit

การสำรวจติดตามสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้าง ในผักและผลไม้จาก 77 จังหวัด ของประเทศไทย ปี พ.ศ. 2565

วีรวุฒิ วิทยานันท์¹ พรศพล ชะพลพรรค² ชนิษฐา พุทธสุชา³ ศศิธร สุกรีทา⁴ และ กิ่งแก้ว กาญจนรัตน์⁵

¹สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

²ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1/1 เชียงราย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อำเภอเมือง เชียงราย 57100

³ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 6 ชลบุรี กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อำเภอเมือง ชลบุรี 20000

⁴ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 9 นครราชสีมา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อำเภอเมือง นครราชสีมา 30000

⁵ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12 สงขลา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อำเภอเมือง สงขลา 90100

บทคัดย่อ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ร่วมกับสำนักส่งเสริมและสนับสนุนอาหารปลอดภัย ดำเนินโครงการสำรวจติดตามสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผักและผลไม้ระดับประเทศ โดยเก็บตัวอย่างผักและผลไม้ จำนวน 385 ตัวอย่างจากตลาดขนาดใหญ่ 77 จังหวัด ทั่วประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2565 เพื่อประเมินความปลอดภัยจากการได้รับสัมผัส โดยเก็บตัวอย่างส่งตรวจวิเคราะห์ ณ ห้องปฏิบัติการ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร และศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ 4 แห่ง ได้แก่ เชียงราย ชลบุรี นครราชสีมา และ สงขลา ที่ได้รับการรับรองตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 ตรวจวิเคราะห์รายการ 132 สาร แบบ Multi-residue ด้วยเครื่อง GC-MS/MS และ LC-MS/MS ส่วน glyphosate และ paraquat โดยวิธีวิเคราะห์แยกเฉพาะสาร ผลการตรวจวิเคราะห์พบสารทั้งสิ้น 43 ชนิด ปริมาณ < 0.01–4.13 mg/kg ในตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 47.0 ของตัวอย่างทั้งหมด โดยมีตัวอย่างที่พบเกินเกณฑ์มาตรฐานร้อยละ 34.3 ผลการวิเคราะห์ 3 สาร ซึ่งเป็นสารที่ห้ามใช้ 2 ชนิด ได้แก่ chlorpyrifos และ paraquat และสารที่จำกัดการใช้ตามนโยบายกระทรวงสาธารณสุข ได้แก่ glyphosate คิดเป็นร้อยละ 7.3, 0 และ 2.3 ตามลำดับ ผลการประเมินความเสี่ยงการได้รับสัมผัสสารที่มีอัตราการตรวจพบสูงสุด 10 อันดับแรกพบว่าคนไทยได้รับสารทุกชนิดไม่เกินค่า ADI ของ WHO บ่งชี้ว่าคนไทยปลอดภัยจากการได้รับสารพิษโดยการบริโภคผักและผลไม้ อย่างไรก็ตามยังคงตรวจพบตัวอย่างที่เกินเกณฑ์มาตรฐานซึ่งจัดเป็นอาหารที่ไม่บริสุทธิ์ จึงควรมีการสำรวจติดตามอย่างสม่ำเสมอ และต้องมีมาตรการควบคุมการใช้สารเคมีอันตรายในภาคเกษตรกรรมอย่างเคร่งครัดเพื่อป้องกันอันตรายต่อผู้บริโภค

คำสำคัญ: สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช, ผัก, ผลไม้, ปริมาณที่บริโภคได้ต่อวัน

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

Received: 11 December 2024

Revised: 7 February 2025

Accepted: 7 February 2025

บทนำ

เมื่อประชากรโลกเพิ่มขึ้นทำให้เกิดวิกฤติการณ์ขาดแคลนอาหารและการแข่งขันทรัพยากร ดังนั้นเพื่อให้ทุกคนมีอาหารอย่างเพียงพอต่อความต้องการจึงต้องมีการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร เพื่อให้เป็นอาหาร ทำให้มีความจำเป็นต้องใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชและวัตถุอันตรายทางการเกษตร เพื่อเพิ่มผลผลิตและป้องกันไม่ให้พืชผลถูกทำลาย⁽¹⁾ เมื่อมีการใช้สารเคมีเหล่านี้อย่างต่อเนื่องในปริมาณสูงหรือใช้งานอย่างไม่ถูกต้อง อาจมีการตกค้างในอาหารและสิ่งแวดล้อม^(2,3) ผ่านเข้าสู่ร่างกายในที่สุด การได้รับสารเคมีอันตรายจะส่งผลเสียต่อสุขภาพของผู้บริโภค⁽⁴⁾ ประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตผักและผลไม้ที่ใหญ่ที่สุดแห่งหนึ่ง และเป็นผู้ส่งออกผักและผลไม้เขตร้อนและกึ่งร้อน ทั้งแบบสดและแปรรูปรายใหญ่ของโลก⁽⁵⁾ ตลาดที่สำคัญของไทย ได้แก่ ประเทศในภูมิภาคอาเซียน จีน ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกาและประเทศสมาชิกสหภาพยุโรป ที่ผ่านมาประเทศคู่ค้าที่มีระบบคัดกรองความปลอดภัยอาหารที่เข้มงวดได้ปฏิเสธอาหารที่มาจากประเทศผู้ผลิตและส่งออกอาหารบางราย เนื่องจากพบว่ามีสารปนเปื้อนของสารเคมีอันตราย^(6,7) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ผักและผลไม้ส่งออกของประเทศไทยมีการควบคุมคุณภาพอย่างเข้มงวดทำให้มีการตรวจพบสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในอัตราต่ำ ในทางกลับกันผักและผลไม้ที่ผลิตหรือนำเข้าและจำหน่ายในประเทศไทย ยังต้องได้รับการตรวจสอบสารเคมีตกค้างอย่างเป็นระบบและสม่ำเสมอ เพื่อให้มั่นใจได้ว่าอาหารที่คนไทยบริโภคนั้นปลอดภัยต่อสุขภาพ

ผลการเฝ้าระวังสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในผักและผลไม้ของประเทศไทยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง⁽⁸⁻¹⁰⁾ โครงการ Total Diet Study (TDS) ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ช่วงปี พ.ศ. 2542-2565 พบว่ามีสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างมากถึง 20-24 ชนิด ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม organophosphorus, synthetic pyrethroids และ carbamates กับพบสารหลายชนิดในกลุ่ม organochlorines และสารอีกหลายชนิดในกลุ่มอื่นๆ^(11,12) แม้จะพบตัวอย่างที่ผิดมาตรฐานอยู่บ้าง แต่ผลการประเมินความเสี่ยงการได้รับ

สัมผัสสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชจากการบริโภคอาหารพบว่าคนไทยมีความปลอดภัยจากการได้รับสารพิษและสารตกค้างจากอาหารที่บริโภค ในทำนองเดียวกัน ผลการเฝ้าระวังสารเคมีตกค้างในผัก 4 ชนิด ทั่วประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2558 พบสารเคมีตกค้างในตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 22.3 เมื่อคำนวณเปรียบเทียบกับค่าความปลอดภัยมาตรฐานพบว่ายังน้อยกว่าค่าการบริโภคประจำวันที่ยอมรับได้ (Acceptable Daily Intake, ADI)⁽¹³⁾ อย่างไรก็ตามยังมีการตรวจพบสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชเกินค่ามาตรฐานตามกฎหมาย และพบสารที่ยกเลิกการใช้งานในการเกษตรอีกหลายชนิด เช่น chlorpyrifos methamidophos และ methomyl เป็นต้น และพบสารที่ไม่มีการขึ้นทะเบียนในประเทศไทย ได้แก่ methiocarb อีกด้วย

ตามที่กระทรวงอุตสาหกรรม ออกประกาศกระทรวง เรื่อง บัญชีรายชื่อวัตถุอันตราย (ฉบับที่ 6) พ.ศ. 2563⁽¹⁴⁾ ซึ่งทำให้มีการยกเลิกการใช้ chlorpyrifos และ paraquat ส่วนกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ออกประกาศกระทรวง เรื่อง การจำกัดการใช้ การกำหนดฉลากและภาชนะบรรจุวัตถุอันตราย ที่เกี่ยวกับ glyphosate ที่กรมวิชาการเกษตรรับผิดชอบ พ.ศ. 2562⁽¹⁵⁾ มีผลในการจำกัดการใช้งานสาร glyphosate ตามมติคณะกรรมการวัตถุอันตราย ประกอบกับกระทรวงสาธารณสุข มีนโยบาย “ยุติการใช้สารเคมีทางการเกษตร 3 ชนิด” ตามที่กระทรวงอุตสาหกรรม ออกประกาศกระทรวงฉบับดังกล่าว ซึ่งนโยบายทางสาธารณสุขข้างต้นมาจากข้อมูลการเจ็บป่วยของเกษตรกรที่ใช้สารเคมีทั้ง 3 ชนิด ที่ได้รับทั้งโดยตั้งใจและไม่ตั้งใจ^(16,17) และการตรวจพบการตกค้างในผักและผลไม้ของกระทรวงสาธารณสุข ซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ ทั้งนี้เพื่อปกป้องคุ้มครองเกษตรกรและประชาชนไม่ให้เจ็บป่วยหรือเสียชีวิตจากการใช้สารเคมีทางการเกษตรที่เป็นอันตราย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้ดำเนินการพัฒนาศักยภาพห้องปฏิบัติการตรวจสอบสารเคมีทางการเกษตรทั้งส่วนกลางและส่วนภูมิภาคให้ครอบคลุมพื้นที่ แก้ไขปัญหาได้อย่างทั่วถึง และสามารถรองรับข้อกำหนดทางกฎหมายของประเทศไทยได้⁽¹⁸⁾ นอกจากนี้ยังสามารถวิเคราะห์สารที่ยกเลิกการใช้งานทั้ง chlorpyrifos, paraquat และ glyphosate ที่จำกัด

การใช้ตามมติคณะกรรมการวัตถุอันตรายได้ จึงใช้ ศักยภาพโครงสร้างพื้นฐานของเครือข่ายศูนย์วิทยาศาสตร์ การแพทย์ 4 แห่ง ในแต่ละภูมิภาคให้สามารถบูรณาการ แผนการตรวจวิเคราะห์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวดเร็ว และตอบสนองต่อการบริหารจัดการโครงการขนาดใหญ่ สำหรับการเก็บตัวอย่างเป็นความร่วมมือเชิงบูรณาการ กับหน่วยตรวจสอบความปลอดภัยอาหารเคลื่อนที่ของ กระทรวงสาธารณสุขในการลงพื้นที่เก็บตัวอย่าง เพื่อให้ ได้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่เป็นตัวแทนตัวอย่างที่เหมาะสม กับบริบทของผู้บริโภคแต่ละพื้นที่ ทั้งนี้กองโรคจากการ ประกอบอาชีพ กรมควบคุมโรค ได้มีการเก็บข้อมูล โรคจากการประกอบอาชีพ ซึ่งมีข้อมูลการเจ็บป่วย จากสารเคมีทางการเกษตร 3 ชนิด ดังนั้นในปี พ.ศ. 2565 มีการเชื่อมโยงข้อมูลผลการตรวจวิเคราะห์การตกค้าง ของสารเคมีทางการเกษตรในผักและผลไม้ กับข้อมูลการ เจ็บป่วยของประชาชนจากการประกอบอาชีพเกษตรกรรม หลังจากที่มีมติยกเลิกการใช้ เพื่อสร้างความเชื่อมั่นให้กับ ประชาชนในการบริโภคผักและผลไม้ได้อย่างปลอดภัย

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ร่วมกับ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ 4 แห่ง ได้แก่ ศูนย์วิทยาศาสตร์ การแพทย์ที่ 1/1 เชียงราย ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 6 ชลบุรี ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 9 นครราชสีมา และ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12 สงขลา กรมวิทยาศาสตร์ การแพทย์ ซึ่งมีการกิกในการเฝ้าระวังคุณภาพและความ ปลอดภัยอาหารเพื่อคุ้มครองผู้บริโภค ได้จัดทำโครงการ ตรวจเฝ้าระวังสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผัก และผลไม้จาก 77 จังหวัด ของประเทศไทย จำนวนจังหวัดละ 5 ตัวอย่าง แบ่งเป็น ผัก 3 ตัวอย่าง และผลไม้ 2 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 385 ตัวอย่าง โดยใช้วิธี multi-residue และ single residue method ที่ได้รับการรับรองตาม มาตรฐานคุณภาพ ISO/IEC 17025:2017 ครอบคลุม 134 สาร โดยเก็บตัวอย่างจากทุกจังหวัดในทุกเขตสุขภาพ แล้วศึกษาวิจัยเพื่อให้ทราบสถานการณ์และข้อมูลปริมาณ การตกค้างของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในผักและ ผลไม้อย่างต่อเนื่อง แยกตามเขตสุขภาพและภาพรวม

ของประเทศ นำข้อมูลมาใช้ในการประเมินสถานการณ์ ความปลอดภัยและความเสี่ยงในการบริโภคผักและผลไม้ ของคนไทย เพื่อใช้ในการบริหารจัดการ วางแผน เพื่อดำเนินการเชิงนโยบายในการลดอันตราย และ ลดความเสี่ยงของสารเคมีทางการเกษตรต่อผู้บริโภค ต่อไป

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างและการเก็บตัวอย่าง

สุ่มเก็บตัวอย่างผักและผลไม้สดจากตลาดสด หรือตลาดนัด ที่มีประชาชนเข้าไปใช้จำนวนมากหรือ จากตลาดค้าส่งขนาดใหญ่ ที่มีการกระจายตัวของสินค้า ของจังหวัดนั้นๆ ใน 77 จังหวัด จาก 13 เขตสุขภาพ ของประเทศไทย โดยมีแนวทางการเลือกชนิดตัวอย่าง ผักและผลไม้ที่เก็บเป็นเลือกเก็บตัวอย่างที่ผู้บริโภคนิยม รับประทาน หรือพื้นที่ที่เป็นแหล่งผลิต หรือเป็นผักผลไม้ ที่มีแนวโน้มความเสี่ยงที่จะตรวจพบการตกค้างสูง จังหวัดละ 5 ตัวอย่าง จำนวนรวมทั้งหมด 385 ตัวอย่าง แบ่งเป็น ตัวอย่างผักสด 26 ชนิด ได้แก่ คะน้า พริก ถั่วฝักยาว กะหล่ำปลี แตงกวา กวางตุ้ง ผักกาดขาว ผักบุ้ง มะเขือเปราะ คื่นฉ่าย โหระพา มะเขือเทศ ต้นหอม ผักสลัด มะละกอ ผักชี ผักชีฝรั่ง กะหล่ำดอก กะเพรา แครอท บรอกโคลี ฟักเขียว ฟักทอง หอมแดง หัวไชเท้า และมันฝรั่ง และตัวอย่างผลไม้สด 20 ชนิด ได้แก่ ส้ม ฝรั่ง แตงโม แอปเปิล ส้มโอ กล้วย แก้วมังกร ชมพู่ แคนตาลูป พุทรา มะม่วง ละมุด ลำไย สับปะรด ลำไย องุ่น มะละกอสุก เมล่อน มันแกว และแห้ว โดยขนาดตัวอย่างกำหนดด้วย การใช้สูตรของ Cochran⁽¹⁹⁾ เพื่อการสำรวจหาความชุก กรณีนี้อย่างน้อยจำนวนประชากร จำนวนประชากรและ ค่าสัดส่วนของประชากรตัวอย่างที่ต้องการศึกษาคำนวณ จากสูตรการหาขนาดตัวอย่าง โดยใช้อัตราการตรวจพบ ของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชของสำนักคุณภาพ และความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในงานบริการช่วงเวลา 3 ปี ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2562-2564 ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 อัตราการตรวจพบสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชของสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารย้อนหลัง 3 ปี
(พ.ศ. 2562-2564)

ปี พ.ศ.	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์ (Sample Analyzed)	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบ (Sample Detected)	อัตราการตรวจพบ (ร้อยละ)
2562	1,174	259	22.1
2563	612	157	25.7
2564	659	163	24.7
รวม	2,445	579	23.7

ตัวอย่างที่ตรวจพบสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในช่วงเวลา 3 ปี คิดเป็นร้อยละ 23.7

สูตรการคำนวณตัวอย่างกรณีไม่ทราบจำนวนประชากร

$$n = \frac{(Z^2 P(P-1))}{e^2} \quad n = 278 \text{ ตัวอย่าง}$$

- เมื่อ
- n = จำนวนตัวอย่างที่ต้องตรวจวิเคราะห์
 - Z = คะแนนมาตรฐาน = 1.96 (ค่าคงที่)
 - P = สัดส่วนของลักษณะที่สนใจในประชากร = 23.7/100 = 0.237
 - e = ค่าความคลาดเคลื่อนของการประมาณค่า = 0.05 (ความเชื่อมั่น 95%)

ดำเนินการเก็บตัวอย่างโดยหน่วยเคลื่อนที่เพื่อความปลอดภัยด้านอาหาร (Mobile unit for food safety) สำนักส่งเสริมและสนับสนุนอาหารปลอดภัย กระทรวงสาธารณสุข เพื่อส่งตรวจสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช 134 สาร (รายการทดสอบ 132 สาร และ glyphosate paraquat) ณ ห้องปฏิบัติการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ (ศวก.) 14 แห่ง เป็นผู้รับตัวอย่างจากหน่วยเคลื่อนที่ฯ และเป็นผู้เตรียมตัวอย่าง ส่งต่อให้ ศวก. 4 แห่ง ได้แก่ ศวก. ที่ 1/1 เชียงราย ศวก. ที่ 6 ชลบุรี ศวก. ที่ 9 นครราชสีมา และ ศวก. ที่ 12 สงขลา เป็นผู้ตรวจวิเคราะห์รายการทดสอบ 132 สาร และส่งต่อให้สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารเป็นผู้ตรวจวิเคราะห์รายการทดสอบ 132 สาร และ glyphosate paraquat ผลการวิเคราะห์ทั้งหมดถูกส่งให้สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารเป็นผู้รวบรวม ประมวลผล วิเคราะห์ข้อมูล สรุป และรายงานผล

การวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช

วิธีวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช 132 สาร

วิธีวิเคราะห์ที่ใช้เป็น Modified QuEChERS in-house Method Based on BS EN 15662:2018⁽²⁰⁾ เป็นการวิเคราะห์แบบ Multi-residue method โดยซึงตัวอย่างผักและผลไม้ที่บดละเอียด 10.0 กรัม ลงใน centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำ 10 มิลลิลิตร acetonitrile (HPLC, Merck, South Korea) เขย่าด้วยมือ 1 นาที เติมน้ำผสม extraction kit (EN 15662) แล้วเขย่าให้เข้ากันด้วยมืออีก 1 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge (Multifuge X1RPro-MD, Thermo Fisher, Germany) ที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ตัวอย่างจะเกิดการแยกชั้น แบ่งสารสกัดส่วนใสด้านบนที่ได้เป็น 2 ส่วน เพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์ สำหรับตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างด้วย 2 เทคนิค ได้แก่ GC-MS/MS และ LC-MS/MS สำหรับสารสกัดส่วนที่ 1 ปีเปิดสารละลาย

3 มิลลิลิตร มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยตัวดูดซับแบบกระจายตัว (Dispersive SPE) ที่เหมาะสม จากนั้นหมุนเหวี่ยงอีกครั้ง ที่ความเร็วรอบและเวลาเท่าเดิม เพื่อให้เกิดการแยกชั้น ระหว่างของแข็งและของเหลว ปิเปตสารละลายด้านบน 2 มิลลิลิตร ระเหยแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน แล้วปรับ ปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายผสมระหว่าง n-hexane (PG, Honeywell B&J, USA) และ ethyl acetate (HPLC, Honeywell B&J, USA) สัดส่วน 3 ต่อ 1 เติมสารละลาย 3% D-sorbitol (Lab Grade Loba, India) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร แล้วนำไปตรวจ วิเคราะห์หาชนิดและปริมาณด้วยเครื่องมือ GC-MS/MS (7890B-TQ7000C, Agilent Technologies, USA) วิเคราะห์ด้วยเทคนิค Matrix-matched calibration curve สำหรับสารสกัดส่วนที่ 2 วิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS ปิเปตสารละลายส่วนใส 1 มิลลิลิตร ใส่ ใน Dispersive SPE เขย่า 1 นาที จากนั้นหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบและเวลาเท่าเดิม แล้วปิเปตสารละลาย ส่วนใสลงใน micro-spin filters 0.2 μ m ชนิด nylon (Vertical, Thailand) จากนั้นหมุนเหวี่ยงอีกครั้ง เก็บสารละลายส่วนใส นำไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณ สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างด้วยเทคนิค LC-MS/MS (1260-5500 QTRAP, AB Sciex, Canada) วิเคราะห์ด้วยเทคนิค Procedural calibration curve โดยมี LOD = 0.005 mg/kg และ LOQ = 0.01 mg/kg

ชนิดสารเคมี 132 สารที่วิเคราะห์

ชนิดสารเคมี 132 สารที่วิเคราะห์ ได้แก่ สาร มาตรฐาน (CRM, CPACChem, France) ที่วิเคราะห์ โดยเครื่อง GC-MS/MS 106 ชนิด ได้แก่ 4,4'-DDD (p,p'-TDE), 4,4'-DDE (p,p'-DDE), 4,4'-DDT (p,p'-DDT), acephate, alachlor, aldrin, ametryn, azinphos-ethyl, azinphos-methyl, BHC-alpha (alpha-HCH), BHC-beta (beta-HCH), BHC-delta (delta-HCH), BHC-gamma (gamma-HCH), bifenazate, bifenthrin, bromo-phos-ethyl, bromopropylate, buprofezin, butachlor, cadusafos, chlordane-alpha, chlor-dane-oxy, chlordane-gamma, chlorfenapyr,

chlorfenvinphos, chlorobenzilate, chloroneb, chlorothalonil, chlorpropham, chlorpyrifos, chlorpyrifosmethyl, cyanophos, cyfluthrin, cyper-methrin, DCPA (Dacthal), DEET, deltamethrin, demeton-s-methyl, diazinon, dichlorvos, dicofol, dicrotophos, dieldrin, dimethoate, dioxathion, disulfoton, ditalimfos, endosulfan sulfate, endosulfan-alpha, endosulfan-beta, endrin, EPN, ethion, ethoprophos, etrimfos, fenclorophos, fenitrothion, fenpropathrin, fenthion, fenvalerate, fipronil, folpet, fosthiazate, heptachlor, heptachlor epoxide-cis, heptachlor epoxide-trans, heptenophos, hexachlorobenzene, isofenphos, isoxathion, lambda-cyhalothrin, malathion, methacrifos, methamidophos, methidathion, methoxychlor, metribuzin, mevinphos, naled, parathion, parathion-methyl, permethrin, phorate, phosalone, phosmet, phosphamidon, picoxystrobin, pirimiphos-ethyl, pirimiphos-methyl, profenofos, propachlor, propargite, propetamphos, prothiofos, quinal-phos, quintozone, tecnazene, terbacil, terbufos, tetrachlorvinphos, tetradifon, thiometon, tolyl-fluanid, triadimefon, triazophos และ trifluralin

สารที่วิเคราะห์โดยเครื่อง LC-MS/MS 26 ชนิด ได้แก่ aldicarb, atrazine, bendiocarb, bromacil, carbaryl, carbendazim, carbofuran-3-hydroxy, carbofuran, carboxin, fenobucarb, hexazinone, isoprocarb, metalaxyl, methiocarb, methomyl, metolachlor, monocrotophos, omethoate, oxamyl, phenthoate, pyrimethanil, simazine, tebufen-pyrad, thiabendazole, thiophanate-methyl และ tolclofos-methyl

วิธีวิเคราะห์ glyphosate

วิเคราะห์โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงตามวิธีของ Oulkar DP และคณะ⁽²¹⁾ เตรียมสารสกัดตัวอย่างผักและผลไม้ โดยนำตัวอย่าง 10.0 กรัม มาเติม 0.1% formic acid

(AR, Fisher Scientific, UK) 10 มิลลิลิตร ปั่นผสมด้วย Vortex mixer (Vortec Genic 2, Scientific Industries, USA) ประมาณ 1 นาที เติม dichloromethane (HPLC, RCI Labscan, Ireland) 15 มิลลิลิตร ปั่นผสมด้วย Vortex mixer ประมาณ 1 นาที เขย่าด้วย shaker (J-MSFS, JISICO, South Korea) ความเร็ว 80 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนใสขึ้นบนใส centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร ทำตามขั้นตอนเดิมอีก 1 รอบ และเทส่วนใสขึ้นบนใสใน centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร รวมกับรอบแรก ปรับปริมาตรเป็น 30 มิลลิลิตร ด้วย 0.1% formic acid (AR, Fisher Scientific, UK) ปั่นผสมด้วย Vortex mixer จากนั้นทำการ derivatization ของสารสกัดตัวอย่าง โดยดูดสารสกัด 400 ไมโครลิตร ใส่หลอด centrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม 5% borate buffer (เตรียมโดยละลาย di-Sodium tetraborate decahydrate 5 กรัม ด้วยน้ำ DI ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร) 350 ไมโครลิตร ปั่นผสมด้วย Vortex mixer เติม 20 mM 9-Fluorenylmethoxycarbonyl chloride, Fmoc-Chloride (Dr. Ehrenstorfer, Germany) ใน acetonitrile (HPLC, Merck, South Korea) 300 ไมโครลิตร ปั่นผสมด้วย Vortex mixer ประมาณ 1 นาที เขย่าด้วย shaker เบา ๆ 10 นาที เติม 20% formic acid 50 ไมโครลิตร ปั่นด้วย Vortex mixer กรองสารละลายด้วย filters 0.45 ไมโครเมตร ชนิด nylon นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทสารละลายที่กรองได้ใส่ในขวดพลาสติกสีขาว ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปตรวจวัดปริมาณด้วยเครื่อง LC-MS/MS (1260-5500 QTRAP, AB Sciex, Canada) โดยมี LOD = 0.005 mg/kg และ LOQ = 0.01 mg/kg

วิธีวิเคราะห์ paraquat

วิเคราะห์โดยใช้วิธี EURL-SRM (QuPPe-PO-Method); Version 10.1 (2019)⁽²²⁾ ซึ่งตัวอย่างผักและผลไม้ 10.0 กรัม ลงใน centrifuge tube ขนาด

50 มิลลิลิตร เติมน้ำให้ครบ 100% ของตัวอย่างโดยคำนวณปริมาตรน้ำกลั่นที่เติมตามความชื้นของแต่ละชนิดตัวอย่าง พิจารณาความชื้น (%Water) จากตารางแสดงคุณค่าทางโภชนาการของอาหารไทย กรมอนามัย (2018)⁽²³⁾ ปั่นด้วย Vortex mixer นาน 1 นาที เติม acidified methanol (1% formic acid ใน MeOH) 10 มิลลิลิตร ปั่นด้วย Vortex mixer 1 นาที เขย่าต่อเนื่อง ใน water bath (WB 22, Memmert, Germany) ที่อุณหภูมิ 80±2 องศาเซลเซียส 15 นาที วางให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใส ประมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่หลอด micro-spin filter 0.45 µm ชนิด nylon หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทสารละลายที่กรองได้ใส่ในขวดพลาสติกสีขาว ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปตรวจวัดปริมาณด้วยเครื่อง LC-MS/MS (1260-5500 QTRAP, AB Sciex, Canada) โดยมี LOD = 0.005 mg/kg และ LOQ = 0.01 mg/kg

การวิเคราะห์ทั้ง 3 รายการ วิเคราะห์โดยห้องปฏิบัติการ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ใช้ระบบบริหารคุณภาพที่ได้รับการรับรอง ทั้ง ISO 9001:2015 และ ISO/IEC 17025:2017 ใช้วิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการทดสอบความใช้ได้ และมีแผนการควบคุมคุณภาพภายใน เพื่อให้มั่นใจว่าได้ผลวิเคราะห์ที่น่าเชื่อถือ โดยทำการเตรียมตัวอย่างผักและผลไม้ที่ตรวจไม่พบสารตกค้างเป็น Blank sample แล้วเติมสารมาตรฐานแต่ละชนิด ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม ต่อกิโลกรัม ใช้เกณฑ์ยอมรับการคืนกลับ (Recovery) อยู่ในช่วง 70-120% วิธีที่ใช้วิเคราะห์ผ่านการทดสอบความใช้ได้ของวิธี และควบคุมกระบวนการวิเคราะห์ตามเอกสาร SANTE/11312/2021 (V2)⁽²⁴⁾ ซึ่งเป็นแนวทางวิธีการตรวจสอบความถูกต้องและข้อกำหนดในการควบคุมคุณภาพผลการวิเคราะห์ในสหภาพยุโรป เพื่อให้มั่นใจในความถูกต้องของข้อมูลที่ใช้สำหรับตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ระบุปริมาณการตกค้างสูงสุดที่สามารถยอมรับได้ตามกฎหมาย หรือนำข้อมูลไปใช้ในการประเมินการสัมผัสสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช

การประเมินการได้รับสัมผัสและการประเมินความเสี่ยง (Exposure and risk assessment)

การประเมินการได้รับสัมผัสสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชจากผักและผลไม้ของคนไทย⁽²⁵⁾ คำนวณโดยนำปริมาณสารพิษที่พบในผักและผลไม้แต่ละชนิด (หน่วยเป็น mg/kg) เนื่องจากตรวจพบสารจำนวนมาก จึงเลือกสารพิษตกค้าง 10 อันดับแรก ที่มีการตรวจพบบ่อยที่สุด โดยนำค่ามัธยฐานของปริมาณที่ตรวจพบทั้งหมดคูณด้วยน้ำหนักผักหรือผลไม้ที่คนไทยบริโภคใน 1 วัน (หน่วยเป็น g หรือ kg) คำนวณปริมาณสารพิษที่บริโภคจะได้ปริมาณสารพิษที่คนไทยได้รับใน 1 วัน

(หน่วยเป็น mg/person/day) แล้วหารด้วยน้ำหนักเฉลี่ยของคนไทยอายุ 3 ปีขึ้นไปรวมเพศ (เท่ากับ 57.57 kg) จะได้ปริมาณสารพิษที่คนไทยได้รับจากอาหาร (หน่วยเป็น mg/kg bodyweight/day) จากนั้นประเมินความปลอดภัยหรือความเสี่ยงของการได้รับสัมผัสสารพิษจากการเปรียบเทียบกับค่าอ้างอิงขององค์การอนามัยโลก คือ ปริมาณที่บริโภคได้ต่อวัน (Acceptable Daily Intake, ADI) หรือปริมาณสารที่บริโภคทุกวันตลอดชีวิตแล้วไม่พบความเสี่ยงที่มีผลกระทบและเป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภค ดังสมการ

$$CDI (\%) = \frac{\left[\frac{(PR \times ADC)}{BW} \right]}{ADI} \times 100$$

CDI = Chronic daily intake (%)

PR = The median pesticide residue results found (mg/kg)

ADC = Average daily consumption of vegetables and fruits (g/person/day)

BW = Body weight (kg)

ADI = Acceptable Daily Intake (mg/kg bw/day)

ผล

หน่วยงานที่รับผิดชอบดำเนินการเก็บตัวอย่างเตรียมตัวอย่างและตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างผักและผลไม้สด จำนวน 385 ตัวอย่างจาก 77 จังหวัดทั่วประเทศไทย โดยตรวจวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช 134 สาร แบ่งเป็น 3 รายการ ได้แก่ สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช

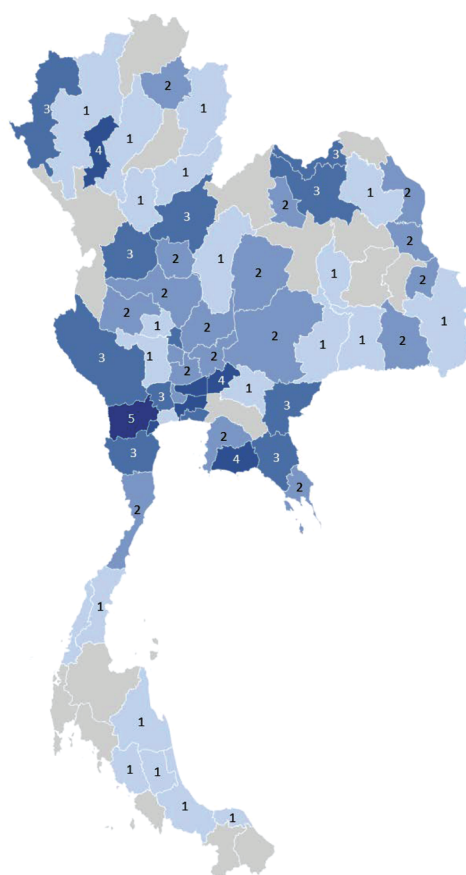
132 สาร 1 รายการ และ glyphosate และ paraquat ชนิดละ 1 รายการ จำนวนตัวอย่างที่เก็บของแต่ละเขตสุขภาพ และจำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบเกินเกณฑ์มาตรฐาน ดังแสดงในตารางที่ 2 สำหรับจำนวนตัวอย่างที่พบการตกค้างของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชเกินมาตรฐานแยกจังหวัด ดังแสดงในภาพที่ 1

ตารางที่ 2 จำนวนตัวอย่างและจำนวนที่ตรวจพบสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชเกินเกณฑ์มาตรฐาน จากแหล่งจำหน่ายตลาดค้าส่งผักและผลไม้ 77 จังหวัด แบ่งตาม 13 เขตสุขภาพ

เขตสุขภาพ	จังหวัด	จำนวนตัวอย่างที่เก็บ	ตรวจพบเกินเกณฑ์มาตรฐาน	
			จำนวนตัวอย่าง	ร้อยละ
เขตสุขภาพที่ 1	เชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน น่าน พะเยา ลำปาง ลำพูน แพร่	40	12	30.0
เขตสุขภาพที่ 2	อุดรธานี สุกโขทัย ตาก พิษณุโลก เพชรบูรณ์	25	6	24.0
เขตสุขภาพที่ 3	กำแพงเพชร พิจิตร นครสวรรค์ อุทัยธานี ชัยนาท	25	10	40.0
เขตสุขภาพที่ 4	ลพบุรี สิงห์บุรี อ่างทอง สระบุรี อโยธยา นครนายก ปทุมธานี นนทบุรี	40	24	60.0

ตารางที่ 2 จำนวนตัวอย่างและจำนวนที่ตรวจพบสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชเกินเกณฑ์มาตรฐาน จากแหล่งจำหน่าย
ตลาดค้าส่งผักและผลไม้ 77 จังหวัด แบ่งตาม 13 เขตสุขภาพ (ต่อ)

เขตสุขภาพ	จังหวัด	จำนวนตัวอย่าง ที่เก็บ	ตรวจพบเกิน เกณฑ์มาตรฐาน	
			จำนวนตัวอย่าง	ร้อยละ
เขตสุขภาพที่ 5	กาญจนบุรี สุพรรณบุรี นครปฐม ราชบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ สมุทรสงคราม สมุทรสาคร	40	22	55.0
เขตสุขภาพที่ 6	ชลบุรี ระยอง จันทบุรี ตราด สมุทรปราการ ฉะเชิงเทรา ปราจีนบุรี สระแก้ว	40	22	55.0
เขตสุขภาพที่ 7	ขอนแก่น มหาสารคาม ร้อยเอ็ด กาฬสินธุ์	20	1	5.0
เขตสุขภาพที่ 8	อุดรธานี เลย สกลนคร นครพนม หนองบัวลำภู หนองคาย บึงกาฬ	35	10	28.6
เขตสุขภาพที่ 9	นครราชสีมา บุรีรัมย์ สุรินทร์ ชัยภูมิ	20	8	40.0
เขตสุขภาพที่ 10	อุบลราชธานี ศรีสะเกษ ยโสธร อำนาจเจริญ มุกดาหาร	25	7	28.0
เขตสุขภาพที่ 11	กระบี่ ชุมพร พังงา ภูเก็ต นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี	35	2	5.7
เขตสุขภาพที่ 12	ตรัง พัทลุง สตูล สงขลา ปัตตานี ยะลา นราธิวาส	35	4	11.4
เขตสุขภาพที่ 13	กรุงเทพมหานคร	5	4	80.0
รวม		385	132	34.3



ภาพที่ 1 จำนวนตัวอย่างที่พบการตกค้างของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชเกินเกณฑ์มาตรฐานแยกแยะรายจังหวัด

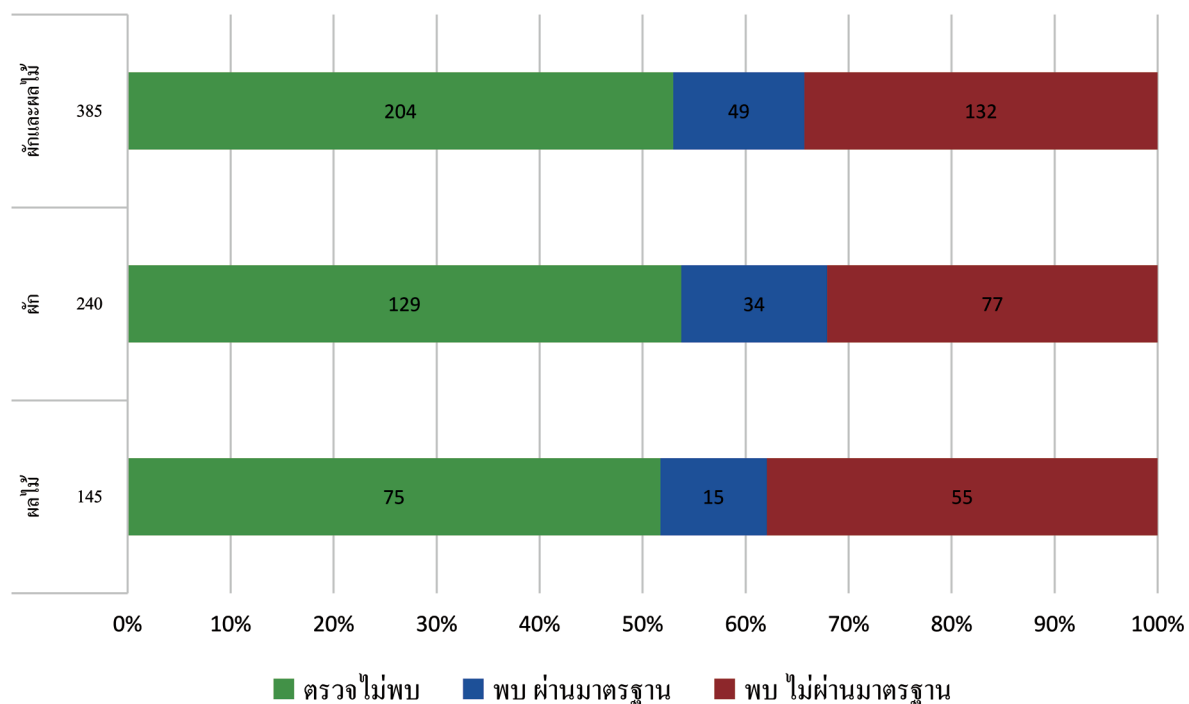
เขตสุขภาพที่มีอัตราการตรวจพบเกินเกณฑ์มาตรฐานสูงสุด 4 อันดับแรก ได้แก่ เขตสุขภาพที่ 13, 4, 5 และ 6 ตรวจพบเกินเกณฑ์มาตรฐานร้อยละ 80.0, 60.0, 55.0 และ 55.0 ตามลำดับ ซึ่งเป็นพื้นที่เขตกรุงเทพมหานคร ภาคกลางตอนล่าง ภาคตะวันออก และภาคตะวันตก ในขณะที่พื้นที่ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ มีอัตราการตรวจพบเกินเกณฑ์มาตรฐานอยู่ระหว่างร้อยละ 5.0–40.0 จังหวัดที่ตรวจพบเกินเกณฑ์มาตรฐานมากที่สุด คือ ราชบุรี ร้อยละ 100 และจังหวัดที่ตรวจพบเกินเกณฑ์มาตรฐานรองลงมาที่ร้อยละ 80.0 ได้แก่ กรุงเทพมหานคร ลำพูน ระยอง นครนายก

ปทุมธานี และสมุทรสงคราม และมีเขตสุขภาพ 2 เขตที่มีอัตราการตรวจพบเกินเกณฑ์มาตรฐานต่ำมาก ได้แก่ เขตสุขภาพที่ 7 และ 11 ที่ 5.0 และ 5.7 ตามลำดับ สะท้อนการบริหารจัดการการใช้สารเคมีทางการเกษตรที่ดี

สถานการณ์การตกค้างของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในภาพรวมของประเทศ พบว่าผลการตรวจวิเคราะห์ผักและผลไม้สด จำนวน 385 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบการตกค้างร้อยละ 53.0 ตรวจพบแต่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานร้อยละ 12.7 และตรวจพบสารเคมีทางการเกษตรไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานร้อยละ 34.3 ดังแสดงในตารางที่ 3 และภาพที่ 2

ตารางที่ 3 สถานการณ์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผักและผลไม้

ชนิดตัวอย่าง	ตัวอย่างที่วิเคราะห์	ตรวจไม่พบ	ตรวจพบ	
			ผ่านมาตรฐาน	ไม่ผ่านมาตรฐาน
ผัก	240 (62.3)	129 (53.8)	34 (14.2)	77 (32.1)
ผลไม้	145 (37.7)	75 (51.7)	15 (10.3)	55 (38.0)
รวม	385 (100.0)	204 (53.0)	49 (12.7)	132 (34.3)



ภาพที่ 2 สถานการณ์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผักและผลไม้

สถานการณ์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้าง
ในผักและผลไม้ จำแนกตามชนิดของตัวอย่าง ผัก จำนวน
240 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบการตกค้างร้อยละ 53.8 ตรวจพบ
แต่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน ร้อยละ 14.2 และไม่ผ่านเกณฑ์
มาตรฐาน ร้อยละ 32.1 ดังแสดงในตารางที่ 4 และ

สถานการณ์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผลไม้
จำนวน 145 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบการตกค้างร้อยละ
51.7 ตรวจพบแต่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน ร้อยละ 10.3 และ
ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน ร้อยละ 38.0 ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 4 การตกค้างสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในผัก 26 ชนิด

ชนิดตัวอย่าง	จำนวน (ตัวอย่าง)	ตรวจไม่พบ (ตัวอย่าง)	พบ (ตัวอย่าง)	
			ผ่านมาตรฐาน	ไม่ผ่านมาตรฐาน
คะน้า	78	31	14	33
พริก	32	8	5	19
ถั่วฝักยาว	28	13	8	7
กะหล่ำปลี	18	15	2	1
แตงกวา	12	10	1	1
กวางตุ้ง	10	6	2	2
ผักกาดขาว	8	6	1	1
ผักบุ้ง	7	6	-	1
มะเขือเปราะ	6	6	-	-
คื่นฉ่าย	5	2	-	3
โหระพา	5	2	-	3
มะเขือเทศ	4	4	-	-
ต้นหอม	4	2	1	1
ผักสลัด	4	4	-	-
มะละกอ	3	3	-	-
ผักชี	3	2	-	1
ผักชีฝรั่ง	3	1	-	2
กะหล่ำดอก	2	2	-	-
กะเพรา	1	-	-	1
แครอท	1	1	-	-
บรอกโคลี	1	1	-	-
ฟักเขียว	1	1	-	-
ฟักทอง	1	1	-	-
หอมแดง	1	1	-	-
หัวไชเท้า	1	-	-	1
มันฝรั่ง	1	1	-	-
รวมตัวอย่าง	240	129	34	77
ร้อยละ	100	53.8	14.2	32.1

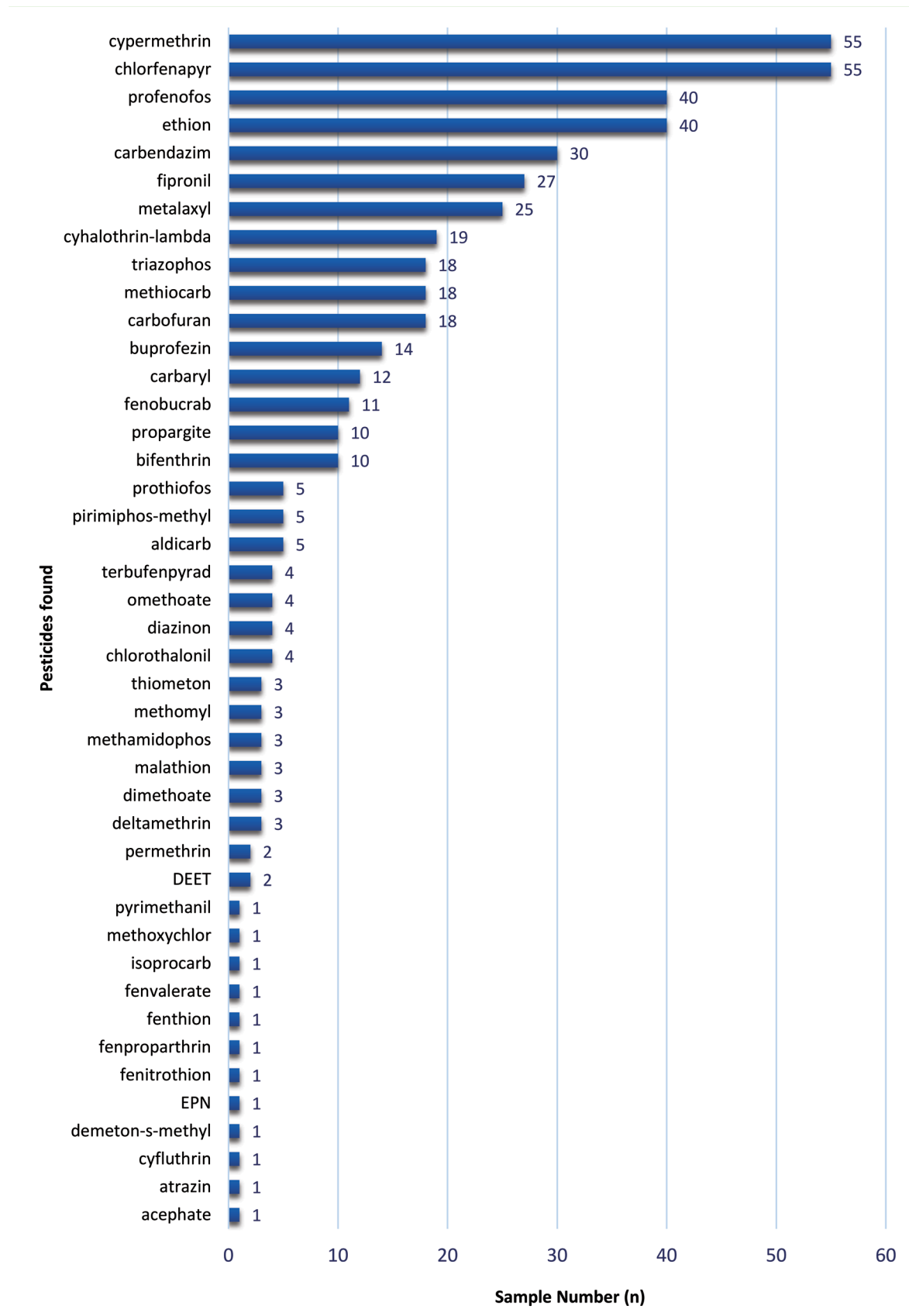
ตารางที่ 5 การตกค้างสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในผลไม้ 20 ชนิด

ชนิดตัวอย่าง	จำนวน (ตัวอย่าง)	ตรวจไม่พบ (ตัวอย่าง)	พบ (ตัวอย่าง)	
			ผ่านมาตรฐาน	ไม่ผ่านมาตรฐาน
ส้ม	48	9	6	33
ฝรั่ง	26	14	5	7
แตงโม	18	14	2	2
แอปเปิล	8	8	–	–
ส้มโอ	5	3	–	2
กล้วย	5	5	–	–
แก้วมังกร	5	3	1	1
ชมพู่	5	3	–	2
แคนตาลูป	3	2	–	1
พุทรา	3	1	–	2
มะม่วง	3	2	–	1
ละมุด	3	2	–	1
ลำไย	3	1	–	2
สับปะรด	2	2	–	–
สาลี่	2	2	–	–
องุ่น	2	1	1	–
มะละกอสุก	1	–	–	1
เมลอน	1	1	–	–
มันแกว	1	1	–	–
แต้ว	1	1	–	–
รวมตัวอย่าง	145	75	15	55
ร้อยละ	100	51.7	10.3	38.0

ชนิดของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างที่ตรวจพบในผักและผลไม้ ในขอบข่ายสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่ตรวจวิเคราะห์ 132 สาร ตัวอย่างผักและผลไม้สด จำนวน 385 ตัวอย่าง ตรวจพบการตกค้าง 181 ตัวอย่าง จำนวนสารเคมีที่ตรวจพบทั้งสิ้น 43 สาร โดยชนิดสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างที่พบทั้งหมด และจำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบในผักและผลไม้ ดังแสดงในภาพที่ 3 สำหรับข้อมูลอัตราการตรวจพบสูง 10 อันดับแรก และข้อมูลเชิงสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 6

สำหรับการตรวจวิเคราะห์ 3 สาร ได้แก่ chlorpyrifos, glyphosate และ paraquat ในผักและผลไม้

ทั้งหมดรวม 385 ตัวอย่าง พบการตกค้าง chlorpyrifos จำนวน 28 ตัวอย่าง ปริมาณ < 0.01–0.43 mg/kg คิดเป็นร้อยละ 7.3 ได้แก่ พริก 9 ตัวอย่าง ส้ม 9 ตัวอย่าง คื่นช่าย 3 ตัวอย่าง ผักชีฝรั่ง 2 ตัวอย่าง ฝรั่ง 2 ตัวอย่าง ถั่วฝักยาว 1 ตัวอย่าง โหระพา 1 ตัวอย่าง และ ลำไย 1 ตัวอย่าง ตรวจพบสาร glyphosate จำนวน 9 ตัวอย่าง ปริมาณ < 0.01–0.05 mg/kg คิดเป็นร้อยละ 2.3 ได้แก่ พริก 4 ตัวอย่าง คื่นช่าย 1 ตัวอย่าง ผักชี 1 ตัวอย่าง ผักบุ้ง 1 ตัวอย่าง ฝรั่ง 1 ตัวอย่าง และละมุด 1 ตัวอย่าง และตรวจไม่พบสาร paraquat ในทุกตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 7



ภาพที่ 3 จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างแต่ละชนิดในผักและผลไม้

ตารางที่ 6 ชนิดและช่วงของปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผักและผลไม้ที่มีอัตราการตรวจพบสูงสุด
10 อันดับแรก

ชนิดสารเคมี ที่ตรวจพบ	จำนวนตัวอย่าง	ร้อยละ	Min-Max (mg/kg)	Median (mg/kg)	Mean (mg/kg)
cypermethrin	55	30.4	0.01–4.13	0.12	0.38
chlorfenapyr	55	30.4	< 0.01–0.88	0.05	0.15
ethion	40	22.1	< 0.01–2.50	0.12	0.38
profenofos	40	22.1	0.03–1.40	0.17	0.31
carbendazim	30	16.6	0.02–2.00	0.23	0.44
fipronil	27	14.9	< 0.01–0.23	0.02	0.04
metalaxyl	25	13.8	0.01–0.96	0.04	0.09
λ-cyhalothrin	19	10.5	< 0.01–0.71	0.04	0.10
methiocarb	18	9.9	< 0.01–0.53	0.01	0.06
carbofuran	18	9.9	< 0.01–0.43	0.03	0.07

หมายเหตุ: วิธีวิเคราะห์มี Limit of Detection, LOD = 0.005 mg/kg และ Limit of Quantification, LOQ = 0.01 mg/kg

ตารางที่ 7 ผลการตรวจวิเคราะห์สาร chlorpyrifos glyphosate และ paraquat ในตัวอย่างผักและผลไม้ทั้งหมด
385 ตัวอย่าง

สารเคมี	พบ		ปริมาณที่พบ mg/kg)	Median mg/kg)	Mean mg/kg)
	จำนวนตัวอย่างผัก และผลไม้	ร้อยละ			
chlorpyrifos	28	7.3	< 0.01–0.43	0.03	0.08
glyphosate	9	2.3	< 0.01–0.05	0.02	0.03
paraquat	0	0	–	–	–

การประเมินการได้รับสัมผัสสารพิษตกค้างและการประเมินว่าคนไทยมีความเสี่ยงจากการบริโภคผักและผลไม้หรือไม่ ใช้ข้อมูลจากการบริโภคอาหารของประเทศไทย พ.ศ. 2559 ของสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ⁽²⁶⁾ ซึ่งเป็นฉบับล่าสุด โดยนำข้อมูลการสำรวจปริมาณการบริโภคผักและผลไม้แต่ละชนิด ที่ค่าเฉลี่ยและค่าเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 97.5 ของปริมาณผักและผลไม้ที่บริโภคของประชากรทั้งหมด (per capita) อายุ 3 ปีขึ้นไป นำค่ามัธยฐานของปริมาณความเข้มข้นที่พบสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในผักและผลไม้ชนิดนั้นๆ ที่พบในอัตราที่สูงที่สุด 10 อันดับแรก หน่วยเป็น mg/kg คูณกับปริมาณการบริโภคของผักและผลไม้ที่พบสารพิษนั้นบ่อยที่สุด หน่วยเป็น g หรือ kg

หารด้วยน้ำหนักตัวเฉลี่ยของคนไทยอายุ 3 ปีขึ้นไปรวมเพศ (57.57 kg) ได้ปริมาณที่ได้รับต่อวัน หน่วยเป็น g/person/day แล้วนำมาเปรียบเทียบกับค่า ADI อ้างอิง คือ ปริมาณที่บริโภคได้ต่อวัน เป็นปริมาณสารที่บริโภคทุกวันตลอดชีวิตแล้วไม่พบความเสี่ยงที่มีผลกระทบและเป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภค เป็นค่า CDI (Chronic Daily Intake) คิดเป็นร้อยละ หากค่า CDI ที่คำนวณได้จากการบริโภคสารพิษมีค่ามากกว่าร้อยละ 100 แสดงว่าผู้บริโภคมีความเสี่ยงที่จะได้รับอันตรายจากสารพิษนั้น

สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่คนไทยได้รับการศึกษา 10 อันดับแรก เมื่อคำนวณปริมาณที่ได้รับต่อคนต่อวัน พบว่าได้รับ carbendazim สูงที่สุด เท่ากับ

0.001116 mg/kg body weight (bw)/day เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับค่า ADI ที่องค์การอนามัยโลกกำหนด (0.03 mg/kg bw/day) คิดเป็นเพียงร้อยละ 3.72 ของค่า ADI เป็นที่น่าสังเกตว่า แม้ ethion ซึ่งเป็นสารเคมีที่มักตกค้างในส้ม ผัก ผลไม้หลายชนิด และปริมาณที่ได้รับจากการบริโภคส้มต่อคนต่อวันมีปริมาณไม่สูงมากเพียง 0.0009 mg/kg bw/day แต่เนื่องจากมีความเป็น

พิษสูงทำให้ค่า ADI ต่ำ ที่ 0.002 mg/kg bw/day เมื่อเปรียบเทียบกับพบว่า คิดเป็นร้อยละ 45.02 ของค่า ADI ซึ่งสูงที่สุด และคำนวณปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่ตรวจพบในอัตราสูงสุด 10 อันดับแรก ที่คนไทยได้รับจากการบริโภคผักและผลไม้ พบว่าคนไทยได้รับสารพิษทุกชนิดน้อยกว่าค่า ADI ของ WHO รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่คนไทยได้รับจากผักและผลไม้ ปริมาณที่บริโภคได้ต่อวัน (ADI) และร้อยละปริมาณที่บริโภคทุกวันตลอดชีวิตแล้วไม่พบความเสี่ยงต่อสุขภาพ (CDI)

สาร	Median	ผักผลไม้	ปริมาณบริโภค (g/person/ day)	mg/kg bw/day		CDI (%)	Reference
				ปริมาณ ที่ได้รับ	ADI		
cypermethrin	0.42	คะน้า	56.00	0.000409	0-0.02	2.04	JMPR 2011
chlorfenapyr	0.16	คะน้า	56.00	0.000156	0-0.03	0.52	JMPR 2012
ethion	0.42	ส้ม	123.42	0.000900	0.002	45.02	JMPR 1990
profenofos	0.28	พริก	10.40	0.000051	0-0.03	0.17	JMPR 2007
carbendazim	0.44	ลำไย	146.00	0.001116	0.03	3.72	JMPR 1995
fipronil	0.03	คะน้า	56.00	0.000029	0-0.0002	14.59	JMPR 2021
metalaxyl	0.08	โหระพา	14.00	0.000019	0.08	0.02	JMPR 2002
λ-cyhalothrin	0.11	คะน้า	56.00	0.000107	0-0.02	0.54	JMPR 2000
methiocarb	0.07	คื่นฉ่าย	26.00	0.000032	0.02	0.16	JMPR 2005
carbofuran	0.07	ส้ม	123.42	0.000150	0-0.001	15.01	JMPR 2008

หมายเหตุ: FAO/WHO Joint Meeting on Pesticide Residues ที่มาของค่า ADI และ CDI (%)

วิจารณ์

ข้อกำหนดตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 387) พ.ศ. 2560 เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้าง⁽²⁷⁾ ระบุวัตถุอันตรายทางการเกษตร ตรวจพบปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด (Maximum Residue Limit; MRL) ได้ไม่เกินที่กำหนดไว้ในบัญชีหมายเลข 2 หรือที่ไม่เกินข้อกำหนดของคณะกรรมการอาหารของโครงการมาตรฐานอาหารเอฟ เอ โอ/ดับบลิว เอช โอ (Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO Food Standards Programme) กรณีพบสารนอกเหนือจากบัญชีดังกล่าว มีการกำหนดค่าดีฟอลต์ ลิมิต (Default Limit) สำหรับพืชและสัตว์ตรวจพบได้ไม่เกิน 0.01 มิลลิกรัมสารพิษตกค้างต่อกิโลกรัมอาหาร เว้นแต่ค่า

Default Limit สำหรับพืชที่กำหนดไว้ในบัญชีหมายเลข 3 แนบท้ายประกาศ ซึ่งในส่วนค่า Default Limit นี้เป็นส่วนที่เพิ่มขึ้นจากประกาศเดิม ซึ่งสถานการณ์การตรวจพบผักและผลไม้สดในปี พ.ศ. 2565 ส่วนใหญ่ที่ไม่ผ่านมาตรฐาน เนื่องจากตรวจพบสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างเกินค่า Default Limit พบมีสารจำนวนมากที่อนุญาตให้ใช้ในประเทศไทยกับผักและผลไม้บางชนิดได้แต่ยังไม่มีการประเมินความปลอดภัยกับผักและผลไม้อีกหลายชนิด ทำให้ไม่มีการกำหนดค่า MRL อนึ่ง ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 419) พ.ศ. 2563⁽²⁸⁾ ออกตามความในพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้าง (ฉบับที่ 3) ได้กำหนดให้ chlorpyrifos และ paraquat เป็นวัตถุอันตราย

ทางการเกษตรชนิดที่ 4 ตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 โดยต้องตรวจไม่พบ ซึ่งการตรวจวิเคราะห์ทางวิชาการของสารพิษตกค้างในอาหารตามบัญชีหมายเลข 1 แนบท้ายประกาศกระทรวงสาธารณสุข เลขที่ 387 พ.ศ. 2560 เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้าง จะต้องใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์และห้องปฏิบัติการที่มีขีดจำกัดของการตรวจวัด (Limit of Detection; LOD) ของวิธีทดสอบอย่างน้อยต่ำถึงระดับที่กำหนด ตามตารางแนบท้ายประกาศ ที่ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทำให้ผักและผลไม้ที่ตรวจพบตั้งแต่ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมขึ้นไปเป็นอาหารผิดมาตรฐาน สำหรับ glyphosate ยังไม่มีการกำหนดค่า MRL ในการศึกษาจากการตรวจวิเคราะห์ผักและผลไม้ จำนวน 385 ตัวอย่าง ตรวจพบการตกค้างของ chlorpyrifos และ glyphosate คิดเป็นร้อยละ 7.3 และ 2.3 ตามลำดับ โดยตรวจไม่พบการตกค้างของ paraquat สำหรับการตรวจพบสารเคมีทางการเกษตรเมื่อพิจารณาในเชิงพื้นที่ พบว่าเขตสุขภาพที่ 13, 4, 5 และ 6 ตรวจพบเกินเกณฑ์มาตรฐานสูงสุด 4 อันดับแรก (ร้อยละ 80.0, 60.0, 55.0 และ 55.0 ตามลำดับ) เขตสุขภาพทั้ง 4 เขต มีพื้นที่เชื่อมต่อกัน โดยมีกรุงเทพมหานคร (เขตสุขภาพที่ 13) เป็นศูนย์กลางและเป็นแหล่งกระจายออกไปทางทิศตะวันออก (เขตสุขภาพที่ 6) ทิศเหนือ (เขตสุขภาพที่ 4) และทิศตะวันตก (เขตสุขภาพที่ 5) โดยมีตลาดค้าส่งขนาดใหญ่ เช่น ตลาดไทย ตลาดสี่มุมเมือง เป็นต้น เป็นแหล่งกระจายสินค้าที่สำคัญของประเทศไทย ผักและผลไม้ที่จำหน่ายในพื้นที่ดังกล่าวอาจมีแหล่งผลิตมาจากแหล่งผลิตเดียวกัน แล้วมีการจัดจำหน่ายกระจายออกไปยังพื้นที่ใกล้เคียง และอาจมีการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชคล้ายคลึงกันทั้งชนิดและวิธีการใช้งาน ทำให้เกิดการตกค้างที่ทำให้อาหารเหล่านี้จัดเป็นอาหารผิดมาตรฐาน

ในการประเมินความเสี่ยงการได้รับสารพิษตกค้างครั้งนี้ พบว่าคนไทยมีโอกาสได้รับสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช 43 ชนิด เมื่อประเมินโดยการเปรียบเทียบสารที่มีอัตราการตรวจพบสูงสุด 10 อันดับแรก คำนวณโดยใช้ค่ามัธยฐานของปริมาณการตรวจพบกับอัตราการบริโภคของผักผลไม้ที่ตรวจพบกับค่า ADI พบว่าปริมาณที่ได้รับต่ำกว่า ร้อยละ 15.01 ของ ADI ยกเว้น carbendazim เพียงชนิดเดียวที่ได้รับปริมาณเท่ากับ ร้อยละ 45.02 ของ

ค่า ADI ผลการประเมินความเสี่ยงพบว่าคนไทยยังคงปลอดภัยจากการได้รับสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่ตกค้างในผักและผลไม้ โดยไม่มีสารใดที่คนไทยบริโภคเกินเกณฑ์มาตรฐาน แสดงให้เห็นว่าการผลิตอาหารที่เป็นผักและผลไม้จากภาคเกษตรกรรมของประเทศไทย ซึ่งเป็นต้นน้ำของอาหารนั้น ได้รับการกำกับดูแลควบคุมให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพและปลอดภัย รวมทั้งผักและผลไม้ที่นำเข้าจากต่างประเทศ ได้รับการตรวจสอบและควบคุมคุณภาพก่อนนำไปจำหน่ายภายในประเทศ อย่างไรก็ตาม ยังมีการตรวจพบสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่ยกเลิกการใช้ในการเกษตรตามนโยบายกระทรวงสาธารณสุข ได้แก่ chlorpyrifos และพบสาร methomyl ที่ถูกยกเลิกการใช้งาน เมื่อ พ.ศ. 2558 โดยมีเงื่อนไขอนุญาตให้ใช้เฉพาะในบ้านเรือนเท่านั้น นอกจากนี้ยังพบสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่ไม่มีการขึ้นทะเบียนในประเทศไทย ได้แก่ methiocarb ดังนั้นหน่วยงานที่มีหน้าที่ควบคุมดูแลการนำเข้า การจำหน่าย และการใช้สารเคมีในภาคเกษตรกรรม และหน่วยงานคุ้มครองผู้บริโภคจึงจำเป็นต้องบูรณาการเพื่อเฝ้าระวังอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้ทราบสถานการณ์และดำเนินการป้องกันปัญหาความไม่ปลอดภัยในการบริโภคอาหารที่อาจเกิดขึ้นกับคนไทยได้ โดยอาจใช้ตัวอย่างการจัดการสารเคมีทางการเกษตรของสหภาพยุโรป (EU) ที่มีการควบคุมและจัดการสารเคมีในอาหารอย่างเข้มงวดรัดกุม โดยมีผู้เชี่ยวชาญจาก European Food Safety Authority (EFSA) เป็นผู้กำหนดมาตรฐานการตกค้างของสารเคมีในอาหาร มีมาตรการตรวจสอบและทดสอบผลิตภัณฑ์อย่างสม่ำเสมอ มีการใช้เทคโนโลยีการผลิตทางการเกษตรที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ใช้ระบบ REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) เพื่อจัดการกับสารเคมีที่อาจเป็นอันตรายทั้งในภาคเกษตรและอุตสาหกรรม โดยสารเคมีที่ไม่ได้รับอนุญาตหรือมีความเสี่ยงสูงจะถูกห้ามใช้ หรือมีข้อจำกัดในการใช้งาน มีระบบการแจ้งเตือนและติดตามการใช้สารเคมีในอาหารอย่างใกล้ชิด ผ่านระบบ RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) ในทำนองเดียวกันสหรัฐอเมริกา มีการจัดการสารเคมีทางการเกษตรในอาหารที่ได้รับการควบคุมอย่างเข้มงวด ผ่านการกำหนด

ปริมาณสารพิษตกค้างที่ปลอดภัย การตรวจสอบและทดสอบสารพิษตกค้างในอาหาร การอนุมัติสารเคมีใหม่ๆ ที่ใช้ในเกษตรกรรม และการส่งเสริมการเกษตรที่ยั่งยืน เช่น การใช้สารชีวภาพหรือวิธีการทางการเกษตรที่ไม่ต้องพึ่งพาสารเคมีมากเกินไป โดยหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง เช่น EPA, FDA และ USDA จะทำงานร่วมกันเพื่อให้มั่นใจว่าอาหารที่บริโภคภายในประเทศมีความปลอดภัยและไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ

ข้อมูลที่ได้จากโครงการเฝ้าระวังสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในผักและผลไม้ครั้งนี้ ได้ส่งมอบแก่หน่วยงานกำกับดูแลที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา และสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ ซึ่งปฏิบัติงานภายใต้คณะทำงานจัดทำแผนบูรณาการตรวจติดตามเฝ้าระวังสารพิษตกค้างจากวัตถุอันตรายทางการเกษตรในผักผลไม้พืชอาหาร คณะที่ 2 ด้านความปลอดภัยด้านอาหาร ของคณะกรรมการอาหารแห่งชาติ เพื่อการบริหารจัดการและการลดความเสี่ยงของการบริโภคอาหารต่อไป โดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์เป็นหนึ่งในหน่วยงานของคณะทำงานฯ ที่เป็นหน่วยวิชาการทำหน้าที่สนับสนุนข้อมูลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ และดำเนินงานเชิงแผนบูรณาการจัดทำโครงการสำรวจติดตามอย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้ภาครัฐควรมีแผนดำเนินงานอย่างเป็นระบบ เพื่อให้เห็นแนวโน้มสถานการณ์ของประเทศไทย และกรณีการนำเข้าผักและผลไม้จากต่างประเทศ ควรมีแผนในการตรวจเฝ้าระวังที่มีประสิทธิภาพ ทั้งนี้เพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคและตอบโต้ภาวะฉุกเฉินด้านอาหารปลอดภัย สำหรับสารที่ห้ามใช้และจำกัดการใช้งาน หน่วยงานต้นน้ำที่เกี่ยวข้องทั้งการนำเข้า จำหน่าย และอบรมการใช้งานสารเคมี ได้แก่ กรมวิชาการเกษตรและกรมส่งเสริมการเกษตร ควรมีแนวปฏิบัติในการควบคุม กำกับ ติดตาม สารเคมีดังกล่าวที่เข้มงวดยิ่งขึ้นต่อไป

สรุป

การสำรวจติดตามสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผักและผลไม้ จำนวน 385 ตัวอย่าง แบ่งเป็นผัก 26 ชนิด รวม 240 ตัวอย่าง และ ผลไม้ 20 ชนิด รวม 145 ตัวอย่าง เก็บจาก 77 จังหวัด ของประเทศไทย

ดำเนินการในปี พ.ศ. 2565 โดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ร่วมกับสำนักส่งเสริมและสนับสนุนอาหารปลอดภัย ตรวจวิเคราะห์ขอบข่ายสารเคมี 134 สาร ผลการประเมินสถานการณ์การตกค้างสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในผักและผลไม้ พบว่าผักมีการตกค้างไม่ผ่านเกณฑ์ ร้อยละ 32.1 และผลไม้ตกค้างไม่ผ่านเกณฑ์ ร้อยละ 38.0 ตัวอย่าง ผักและผลไม้ที่พบว่าไม่ผ่านเกณฑ์มากที่สุด ได้แก่ คะน้า พริก ส้ม และฝรั่ง ตามลำดับ โดยเป็นสารเคมีทางการเกษตรที่ตรวจพบทั้งหมด 43 ชนิด พบมากที่สุด 3 อันดับแรก ได้แก่ cypermethrin, chlorfenapyr และ ethion ผลการประเมินความเสี่ยงการได้รับสัมผัสสารพิษตกค้างทางการเกษตร 10 อันดับแรก พบว่าคนไทยได้รับสารพิษทุกชนิดต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐาน (น้อยกว่าร้อยละ 45.02) บ่งชี้ว่าคนไทยยังคงปลอดภัยจากการได้รับสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่ตกค้างในผักและผลไม้ สำหรับผลการตรวจวิเคราะห์สารเคมีเป้าหมายอีก 3 ชนิด พบการตกค้าง chlorpyrifos ร้อยละ 7.3, glyphosate ร้อยละ 2.3 โดยไม่พบการตกค้างของ paraquat ทุกตัวอย่าง สถานการณ์การเฝ้าระวังสารเป้าหมาย 3 สาร ที่มีมติคณะกรรมการวัตถุอันตรายที่ให้อยกเลิกการใช้สาร chlorpyrifos, paraquat และ glyphosate เป็นสารที่จำกัดการใช้งาน พบว่าการตกค้างในผักและผลไม้ของทั้ง 3 สาร ลดลงจนถึงตรวจไม่พบ แต่ข้อมูลผู้ป่วยที่มีอาการเจ็บป่วยโดยไม่ตั้งใจมีจำนวนเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าเกษตรกรยังมีการนำสาร chlorpyrifos และ paraquat มาใช้ในการเพาะปลูก หน่วยงานที่เกี่ยวข้องควรเพิ่มความเข้มงวดในการตรวจสอบการจำหน่ายสารเคมีทางการเกษตรเหล่านี้ให้มากขึ้น เช่น การเพิ่มบทบาทของสารวัตรเกษตรและผู้เกี่ยวข้องตามมาตรการจัดการวัตถุอันตราย สำนักควบคุมพืชและวัสดุทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร สำหรับสาร glyphosate มีอัตราการเจ็บป่วยเพิ่มขึ้น ควรต้องมีการลงพื้นที่แนะนำการใช้ที่ถูกต้องและปลอดภัยให้กับเกษตรกรอย่างต่อเนื่องสม่ำเสมอ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนางเลขาปราสาททองสำหรับคำแนะนำในการดำเนินโครงการ นางสาวนิตา ยุธยาดี ในการ

ประสานงานเชิงบูรณาการกับหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง และ
เจ้าหน้าที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์
การแพทย์ ทั้ง 14 แห่ง ในการเก็บ เตรียม และส่งต่อ
ตัวอย่าง

เอกสารอ้างอิง

1. Yang X, Wang F, Meng L, Zhang W, Fan L, Geissen V, et al. Farmer and retailer knowledge and awareness of the risks from pesticide use: a case study in the Wei River catchment, China. *Sci Total Environ* 2014; 497-498: 172-9.
2. Panuwet P, Siri Wong W, Prapamontol T, Ryan PR, Fiedler N, Robson MG, et al. Agricultural pesticide management in Thailand: situation and population health risk. *Environ Sci Policy* 2012; 17: 72-81.
3. Grovermann C, Schreinemachers P, Berger T. Quantifying pesticide overuse from farmer and societal points of view: an application to Thailand. *Crop Prot* 2013; 53: 161-8.
4. Riwithong S, Schreinemachers P, Grovermann C, Berger T. Agricultural commercialization: risk perceptions, risk management and the role of pesticides in Thailand. *Kasetsart J Soc Sci* 2017; 38: 264-72.
5. Wongta A, Sawarn N, Tongchai P, Yana P, Hongsibsong S. Agricultural health and safety: evaluating Farmers' knowledge, attitude, and safety behavior in Northern Thailand. *Safety Health Work* 2024; 15(4): 435-40.
6. Chomchalow N, Somsri S, Na Songkhla P. Marketing and export of major tropical fruits from Thailand. *AU J Technol* 2008; 11(3): 133-43.
7. Pongpanich C, Phitya-Isarakul P. Enhancing the competitiveness of Thai fruit exports: an empirical study in China. *Contemp Manag Res* 2008; 4: 15-28.
8. Ussanawarong S, Peingsaweung N, Chabangam S. Survey of pesticide use in farms: Khon Kaen Province, Thailand. *KKU Res J* 2007; 12(1): 5-16.
9. Poramacom N. Pesticide markets and related situations in Thailand. *Kasetsart J Soc Sci* 2001; 22: 205-11.
10. Tawatsin A, Thavara U, Siriyasatien P. Pesticides used in Thailand and toxic effects to human health. *Med Res Arch* 2015; 3: 1-10.
11. Atisook K. Exposure assessment of pesticide intake from Thai diet. *Bull Dept Med Sci* 2001; 43: 10-8.
12. Atisook K, Lertreungdej Y, Suntudrob J, Jongmevasna W, Payanan T, Kaunha C, et al. Total diet study on pesticide residues in Thai diet, 1999- 2003. *Bull Dept Med Sci* 2008; 50: 151-62.
13. Suntudrob J, Jongmevasna W, Payanan T, Srikote R, Wittayanan W. Monitoring of pesticide residues in domestic vegetables in Thailand during 2015. *Asia Pac J Sci Technol* 2018; 23: APST-23-04-03. (8 pages).
14. ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 6 (พ.ศ. 2563) เรื่อง บัญชีรายชื่อวัตถุอันตราย. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 137 ตอนพิเศษ 117 ง (วันที่ 19 พฤษภาคม 2563). หน้า 56.
15. ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (พ.ศ. 2562) เรื่อง การจำกัดการใช้ การกำหนดฉลากและภาชนะบรรจุ วัตถุอันตราย ที่เกี่ยวกับไกลโฟเซต ที่กรมวิชาการเกษตร รับผิดชอบ. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 136 ตอนพิเศษ 100 ง (วันที่ 23 เมษายน 2562). หน้า 54.
16. Rivera EP, Siri Wong W, Taneepanichskul N, Norkaew S, Robson MG. Health risk related to pesticide exposure in the agriculture system in Thailand: a systematic review. *J Health Res* 2016; 30(Suppl 1): S71-80.
17. สำนักโรคจากการประกอบอาชีพและสิ่งแวดล้อม กรมควบคุมโรค. รายงานสถานการณ์โรคและภัย สุขภาพจากการประกอบอาชีพและสิ่งแวดล้อม ปี 2560. [ออนไลน์]. 2561; [สืบค้น 4 ธ.ค. 2567]; [67 หน้า].

- เข้าถึงได้ที่: URL: https://ddc.moph.go.th/uploads/ckeditor2/files/01_envocc_situation_60.pdf.
18. วิชาดาจมีวาสนา, ทองสุข ปายะนันท์, รัตติยากรศรีโคตร, วีรวุฒิ วิทยานันท์, จิตผกา สันต์ตรบ. การพัฒนาความสามารถห้องปฏิบัติการและสร้างเครือข่าย เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเฝ้าระวังสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผักและผลไม้ของประเทศไทย. ว อาหารและยา 2563; 27(2): 73-83.
 19. Ahmed SK. How to choose a sampling technique and determine sample size for research: a simplified guide for researchers. Oral Oncol Rep 2024; 12: 100662. (7 pages).
 20. BS EN 15662:2008. Foods of plant origin - determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE - QuEChERS-method. [online]. 2008; [cited 2024 Nov 4]; [84 screens]. Available from: URL: http://www.chromnet.net/Taiwan/QuEChERS_Dispersive_SPE/QuEChERS_%E6%AD%90%E7%9B%9F%E6%96%B9%E6%B3%95_EN156622008_E.pdf.
 21. Oulkar DP, Hingmire S, Goon A, Jadhav M, Ugare B, Thekkumpurath AS, et al. Optimization and validation of a residue analysis method for glyphosate, glufosinate, and their metabolites in plant matrixes by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. J AOAC Int 2017; 100(3): 631-9.
 22. QuPpe-PO-Method. Quick method for the analysis of numerous highly polar pesticides in food involving extraction with acidified methanol and LC-MS/MS measurement. [online]. 2019; [cited 2024 Nov 4]; [83 screens]. Available from: URL: [https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/meth_QuPpe_PO_V10_1\(1\).pdf](https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/meth_QuPpe_PO_V10_1(1).pdf).
 23. สำนักโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข. ตารางแสดงคุณค่าทางโภชนาการของอาหารไทย. [ออนไลน์]. 2561; [สืบค้น 7 ก.พ. 2568]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://nutrition2.anamai.moph.go.th/th/thai-food-composition-table>.
 24. SANTE 11312/2021 v2. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. [online]. 2024; [cited 2024 Nov 4]; [55 screens]. Available from: URL: https://food.ec.europa.eu/system/files/2023-11/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2021-11312.pdf.
 25. Mosallaei S, Tabatabaei Z, Azhdarpoor A. Investigating organophosphorus pesticides in dates from Khesht City (Iran): impact of washing and assessment of the health risks. Appl Food Res 2024; 4(2): 100535. (8 pages).
 26. สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. ข้อมูลการบริโภคอาหารของประเทศไทย. [ออนไลน์]. 2559; [สืบค้น 6 ธ.ค. 2567]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://www.m-society.go.th/ewtadmin/ewt/mso_web/article_attach/19305/20675.pdf.
 27. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 387 (พ.ศ. 2560) เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้าง. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 134 ตอนพิเศษ 228 ง (วันที่ 18 กันยายน 2560). หน้า 8.
 28. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 419 (พ.ศ. 2563) ออกตามความในพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้าง (ฉบับที่ 3). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 137 ตอนพิเศษ 257 ง (วันที่ 2 พฤศจิกายน 2563). หน้า 27.

Monitoring of Pesticide Residues in Vegetables and Fruits From 77 Provinces of Thailand in 2022

Weerawut Wittayanan¹, Pakphon Chaphonpak², Khanittha Phutthasukha³,
Sasithorn Sukreeta⁴, and Kingkaew Kanchanaratana⁵

¹ Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

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

³ Regional Medical Sciences Center 6 Chonburi, Department of Medical Sciences, Muang District,
Chonburi 20000, Thailand

⁴ Regional Medical Sciences Center 9 Nakhon Ratchasima, Department of Medical Sciences, Muang
District, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

⁵ Regional Medical Sciences Center 12 Songkhla, Department of Medical Sciences, Muang District,
Songkhla 90100, Thailand

ABSTRACT The collaboration between the Department of Medical Sciences and the Bureau of Food Safety Extension and Support the Bureau of Safety Extension and Support, Ministry of Public Health, Thailand, has performed a national monitoring programme assessment for pesticide residues in vegetables and fruits. 385 samples were collected from major markets in 77 provinces of Thailand in 2022 and were evaluated for the potential health risks associated with those samples. All samples were sent to the ISO/IEC 17025:2017 accredited laboratories of the Bureau of Quality and Safety of Food and 4 Regional Medical Sciences Centers including Chiang Rai, Chonburi, Nakhon Ratchasima, and Songkhla, and were examined. The current project was focused on quantifying 132 pesticides by GC-MS/MS and LC-MS/MS using the multi-residue methods combined with the single residue analyses of glyphosate and paraquat. The results showed 43 pesticide residues ranging from < 0.01 to 4.13 mg/kg were found in 47.0% of the samples, with 34.3% above the maximum residue limits. There was contamination of 3 pesticides including 2 banned pesticides; chlorpyrifos and paraquat, and glyphosate which has restricted use by the Ministry of Public Health, Thailand, presented 7.3, 0, and 2.3% respectively. Ten pesticides that found the highest contamination were assessed for health risks for the Thai population, and regarding the WHO ADI, all were in acceptable safety risks for exposure. Yet, some vegetables and fruits from markets are still detected with pesticides higher than the limits. Therefore, it is critical to regularly monitor and control the pesticides used in vegetables and fruits to minimize their hazardous effects on consumers.

Keywords: Pesticide residues, Vegetables, Fruits, Acceptable Daily Intake

การค้นพบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างใหม่ของไวรัสหัดสายพันธุ์ D8 ครั้งแรก: กรณีการระบาดในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย ปี พ.ศ. 2567

อัจฉริยา ลูกบัว¹ กรรณิการ์ ขวัญชุม¹ นรารรรณ ปันงาม¹ เดือนเพ็ญ เชื้อผู้ดี¹ ประสพชัย อร่ามรุ่งโรจน์¹ ธนพนธ์ เปรมกมล¹ สุธาทิพย์ ตรีพลอักษร² ภาวินี ต่วงเงิน³ จัตรมงคล สัมแป้น³ และ
พิไลลักษณ์ อัครไพบุลย์ โอภาตะ¹

¹สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

²ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12 สงขลา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อำเภอเมือง สงขลา 90100

³กองระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ การศึกษาสายพันธุ์ไวรัสหัดจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนยีน Nucleoprotein (N) และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไวรัสหัด 428 ตัวอย่าง จากเหตุการณ์การระบาดของโรคหัดในจังหวัดสงขลา ยะลา ปัตตานี และนราธิวาส ในปี พ.ศ. 2567 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ไวรัสหัดสายพันธุ์อ้างอิงขององค์การอนามัยโลก จำนวน 24 สายพันธุ์ พบว่าตรงกับไวรัสหัดสายพันธุ์ D8 แต่ถูกจำแนกออกเป็น 20 Distinct Sequence Identifiers (DSId) แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสหัดสายพันธุ์ D8 ที่พบมีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันในแต่ละ DSId โดย 20 DSIs ประกอบด้วย DSId8581, 8717, 8775, 8813, 8830, 8851, 8913, 8914, 8971, 9106, 9107, 9108, 9134, 9143, 9144, 9165, 9167, 9202, 9203 และ 9204 ซึ่งทั้ง 20 DSIs เป็นการตรวจพบครั้งแรกในประเทศไทย ในจำนวนนี้มี 19 DSIs ที่รายงานในฐานข้อมูลขององค์การอนามัยโลก (Measles Surveillance Nucleotide Database: MeaNS2) เป็นครั้งแรก ยกเว้น DSId8581 มีรายงานในฐานข้อมูลขององค์การอนามัยโลกมาก่อนว่าพบครั้งแรกในประเทศมาเลเซีย อย่างไรก็ตาม ผลจากการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถระบุแหล่งที่มาของเชื้อได้เนื่องจากข้อมูลสนับสนุนทางด้านระบาดวิทยายังมีไม่เพียงพอ

คำสำคัญ: ไวรัสหัด, สายพันธุ์ไวรัสหัด, ไวรัสหัดในพื้นที่ภาคใต้ประเทศไทย

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

Received: 6 February 2025

Revised: 7 March 2025

Accepted: 14 March 2025

บทนำ

โรคหัดเป็นโรคไข่ออกผื่นที่พบได้บ่อยในเด็ก เกิดจากการติดเชื้อไวรัสหัด (Measles virus) อยู่ในตระกูล Paramyxoviridae องค์การอนามัยโลกได้จัดกลุ่มสายพันธุ์ไวรัสหัดออกเป็น 8 กลุ่ม (กลุ่ม A–H) จำนวน 24 สายพันธุ์ โดยจัดกลุ่มจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Nucleoprotein (N gene) ขนาด 450 นิวคลีโอไทด์ ออกเป็น สายพันธุ์ A, B1–B3, C1–C2, D1–D11, E, F, G1–G3 และ H1–H2⁽¹⁾ โรคหัดติดต่อโดยการไอ จาม หรือพูดกันในระยะใกล้ชิด เชื้อไวรัสจะกระจายอยู่ในละอองเสมหะ น้ำมูก น้ำลายของผู้ป่วยและเข้าสู่ร่างกายโดยการหายใจ ผู้ป่วยจะมีเชื้อไวรัสอยู่ในลำคอและแพร่เชื้อได้ในระยะ 1–2 วัน ก่อนที่จะเริ่มมีอาการ หรือประมาณ 3–5 วัน ก่อนมีผื่น ไปจนถึงระยะหลังผื่นขึ้นแล้ว 4 วัน ผู้ป่วยโรคหัดจะมีผื่นลักษณะนูนแดง (maculopapular rash) ติดกันเป็นปื้น โดยจะเริ่มขึ้นที่ใบหน้าบริเวณชิดขอบผม แล้วกระจายไปลำตัว แขน ขา ในผู้ป่วยบางรายอาจตรวจพบ Koplik's spot ลักษณะเป็นจุดสีขาวเทาเม็ดเล็ก ๆ หลาย ๆ เม็ด บริเวณเยื่อในแก้มบริเวณฟันกรามซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของโรคหัด⁽²⁾ โรคหัดเป็นโรคที่มีการระบาดได้ง่าย มีอัตราการเกิดโรคและอัตราการเสียชีวิตสูงในเด็กเล็ก หรือผู้ป่วยที่มีโรคร่วม เช่น ปวดบวม อูจาระร่วง หากได้รับการรักษาล่าช้า อาจทำให้เสียชีวิตได้ ประเทศไทยมีการให้วัคซีนป้องกันโรคแก่เด็กไทยทุกคนทั่วประเทศตั้งแต่ปี พ.ศ. 2527 โดยให้ 1 เข็ม และเพิ่มเป็นให้ 2 เข็มในปี พ.ศ. 2539 โดยให้เข็มแรกในเด็กอายุ 9 เดือน และเข็มที่ 2 เมื่ออายุประมาณ 6–7 ปี ในปัจจุบันประเทศไทยได้ปรับแผนการให้วัคซีน ซึ่งเป็นวัคซีนรวมหัด คางทูม หัดเยอรมัน (Measles, Mumps, Rubella: MMR vaccine) โดยให้เข็มแรกในเด็กอายุ 9–12 เดือน และเข็มที่สองให้ในเด็กอายุ 18 เดือน⁽³⁾ โรคหัดถึงแม้เป็นโรคที่สามารถป้องกันได้ด้วยวัคซีน แต่มีรายงานการระบาดของโรคหัดทั่วโลกอย่างต่อเนื่อง ในปี พ.ศ. 2567 องค์การอนามัยโลก รายงานผู้ป่วยสงสัยโรคหัดทั่วโลกที่รายงานจาก 183

ประเทศ มีจำนวน 595,000 ราย ให้ผลตรวจยืนยันทางห้องปฏิบัติการ (Anti-measles IgM positive) จำนวน 321,000 ราย คิดเป็นร้อยละ 54 ที่เหลืออีกร้อยละ 31 เป็นผู้ป่วยที่มีอาการเข้าได้กับเกณฑ์ผู้ป่วยโรคหัด (clinically compatible) และอีกร้อยละ 15 เป็นโรคไข่ออกผื่นอื่น ๆ (non-measles)⁽⁴⁾

โรคหัดเป็นหนึ่งในโรคภายใต้นโยบายกำจัดกวาดล้าง (Disease Elimination and Eradication) ขององค์การอนามัยโลก ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งประเทศไทยเป็นหนึ่งใน 11 ประเทศสมาชิก ได้ตอบสนองนโยบายขององค์การอนามัยโลก โดยกระทรวงสาธารณสุขได้อนุมัติโครงการกำจัดโรคหัดตามพันธสัญญานานาชาติ มอบหมายให้กรมควบคุมโรค กรมการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และสำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข เป็นหน่วยงานรับผิดชอบ โดยมีกรมควบคุมโรคเป็นหน่วยงานกลางประสานการดำเนินงานตามโครงการ และกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ซึ่งเป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงขององค์การอนามัยโลก ในการตรวจไวรัสหัดและหัดเยอรมันในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รับผิดชอบการตรวจยืนยันทางห้องปฏิบัติการ และมีศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เป็นห้องปฏิบัติการเครือข่าย โครงการได้เริ่มดำเนินการในปี พ.ศ. 2553 และตั้งเป้าหมายความสำเร็จในปี พ.ศ. 2563 อย่างไรก็ตามยังคงมีรายงานการระบาดของโรคในหลายประเทศ ดังนั้นองค์การอนามัยโลกจึงได้ขยายเป้าหมายการกำจัดโรคหัดออกไปเป็นปี พ.ศ. 2569 โดยมีเป้าหมายหลักคือ ประเทศในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งประเทศไทยเป็นหนึ่งในประเทศสมาชิก สามารถลดอุบัติการณ์การเกิดโรคหัดลงเหลือไม่เกิน 1 คนต่อประชากรล้านคน^(5,6) หนึ่งในตัวชี้วัดความสำเร็จและเป้าหมายของการกำจัดโรคหัดที่องค์การอนามัยโลก กำหนด คือ ประเทศต้องมีข้อมูลสายพันธุ์ของไวรัสหัดที่แพร่กระจายภายในประเทศ โดยเป้าหมายการประเมิน

ความสำเร็จของโครงการ คือ ต้องไม่มีผู้ป่วยโรคหัดที่ยืนยันการติดเชื้อจากไวรัสหัดสายพันธุ์ภายในประเทศเป็นระยะเวลาติดต่อกันไม่น้อยกว่า 12 เดือน^(5,7) ทั้งนี้ไวรัสหัดแต่ละสายพันธุ์สามารถจำแนกได้หลาย Distinct Sequence Identifiers (DSIDs) เพื่อให้สามารถวิเคราะห์ความแตกต่างของสายพันธุ์ไวรัสหัดและเป็นประโยชน์ต่อการทราบแหล่งที่มา รวมถึงเส้นทางการแพร่กระจายของเชื้อ อีกทั้งเป็นการเฝ้าระวังสายพันธุ์นำเข้า องค์การอนามัยโลกมีการระบุชื่อเรียกของไวรัสหัดในแต่ละสายพันธุ์ โดยใช้หมายเลข DSID โดยเมื่อมีการรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ ในส่วนยีน Nucleoprotein (N) ความยาว 450 นิวคลีโอไทด์ เข้าสู่ฐานข้อมูล MeaNS2 แล้วตรวจสอบพบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ 1 ตำแหน่งขึ้นไป และไม่เคยมีการรายงานตำแหน่งที่แตกต่างนั้นในฐานข้อมูลมาก่อน ระบบฐานข้อมูลจะเพิ่มหมายเลข DSID ใหม่ขึ้นมาหลังจากการตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลโดยอัตโนมัติ⁽⁸⁻¹⁰⁾

ข้อมูลจากรายงานผลการดำเนินโครงการกำจัดโรคหัดของประเทศไทย ยังมีรายงานการระบาดของโรคหัดอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะในกลุ่มวัยเรียนและวัยทำงาน โดยในช่วงปีพ.ศ. 2561–2562 พบการระบาดใหญ่ของโรคหัดในเขตภาคใต้ของประเทศไทย มีรายงานผู้ป่วยยืนยันโรคหัด จำนวน 5,476 ราย และ 4,411 ราย ตามลำดับ และมีรายงานผู้เสียชีวิตจากโรคหัดในปี พ.ศ. 2561–2562 จำนวน 8 ราย และ 15 ราย ตามลำดับ โดยสายพันธุ์ไวรัสหัดที่ก่อให้เกิดการระบาดในปี พ.ศ. 2561–2562 ได้แก่ สายพันธุ์ B3 (DSID5258, 5616, 5617, 5639, 5640, 5660, 5661, 5805, 5806, 5821, 5959, 6066, 6183 และ 6219) และสายพันธุ์ D8 DSID5981 ต่อมาในปี พ.ศ. 2567 เกิดการระบาดใหญ่ของโรคหัดอีกครั้งในเขต 4 จังหวัดภาคใต้ ได้แก่ สงขลา ยะลา ปัตตานี และนราธิวาส มีรายงานผู้ป่วยยืนยันโรคหัดในฐานข้อมูลโครงการกำจัดโรคหัด (Measles Elimination Database) จำนวน 3,594 ราย และมีรายงานผู้ป่วยเสียชีวิตจากโรคหัด จำนวน 11 ราย⁽¹¹⁾ ทั้งนี้จากฐานข้อมูลระบบคลังข้อมูลด้านการแพทย์และ

สุขภาพ กระทรวงสาธารณสุข (Health Data Center; HDC) พบว่าจังหวัดสงขลา ยะลา ปัตตานี และนราธิวาส มีความครอบคลุมของวัคซีนหัดเข็มที่ 2 (MMR2) ร้อยละ 86.22, 69.67, 40.90 และ 54.20 ตามลำดับ⁽¹²⁾ ซึ่งต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐาน (เกณฑ์มาตรฐานมากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 95)⁽¹³⁾

วัตถุประสงค์ของการศึกษารั้งนี้ เพื่อศึกษา ลักษณะทางพันธุกรรมของสายพันธุ์เชื้อไวรัสหัด และแหล่งที่มาของสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดการระบาดและแพร่กระจายในจังหวัดสงขลา ยะลา ปัตตานี และนราธิวาส ในปี พ.ศ. 2567 รวมทั้งเฝ้าติดตามสายพันธุ์อื่นๆ ที่อาจถูกนำเข้ามาจากต่างประเทศ (imported strain) ซึ่งผลการศึกษาที่ได้ครั้งนี้จะทำให้ประเทศไทยมีข้อมูลพื้นฐานของสายพันธุ์ไวรัสหัดที่แพร่กระจายในประเทศ อันเป็นข้อมูลสำคัญที่จะสนับสนุนการประเมินความสำเร็จของโครงการกำจัดโรคหัดในประเทศไทยและในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ให้สำเร็จได้ตามเป้าหมายขององค์การอนามัยโลก

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษารั้งนี้เป็นตัวอย่าง Throat swab และ Nasal swab จากผู้ป่วยสงสัยติดเชื้อไวรัสหัดที่มีอาการแสดงตามเกณฑ์ทางคลินิก ได้แก่ มีไข้มากกว่า 38 องศาเซลเซียส มีผื่นนูนแดง พร้อมทั้งมีอาการไอร่วมกับอาการอื่นอีกอย่างน้อยหนึ่งอาการ ได้แก่ มีน้ำมูก หรือเยื่อบุตาอักเสบ หรือตรวจพบ Koplik's spot 1–2 วันก่อนและหลังผื่นขึ้น ซึ่งถูกเก็บในช่วง 1–5 วันแรกหลังพบผื่นจากการระบาดในเขต 4 จังหวัดภาคใต้ของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดสงขลา ยะลา ปัตตานี และนราธิวาส ในช่วง 1 มกราคม ถึง 31 ธันวาคม พ.ศ. 2567 โดยหน่วยงานที่ส่งตัวอย่างตรวจ ได้แก่ สำนักงานควบคุมและป้องกันโรค (สคร.) เขต 12 และโรงพยาบาลทั้งภาครัฐและเอกชนในเขต 4 จังหวัดดังกล่าว ผ่านศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12 สงขลา กรมวิทยาศาสตร์

การแพทย์ โดยเป็นตัวอย่างจากจังหวัดนราธิวาส จำนวน 127 ตัวอย่าง เป็นเพศชาย จำนวน 68 ตัวอย่าง เพศหญิง จำนวน 59 ตัวอย่าง (อัตราส่วนเพศชายต่อเพศหญิง คือ 1.15 : 1) จังหวัดปัตตานี จำนวน 173 ตัวอย่าง เป็นเพศชาย จำนวน 92 ตัวอย่าง เพศหญิง จำนวน 81 ตัวอย่าง (อัตราส่วนเพศชายต่อเพศหญิง คือ 1.14 : 1) จังหวัดยะลา จำนวน 30 ตัวอย่าง เป็นเพศชาย จำนวน 14 ตัวอย่าง เพศหญิง จำนวน 16 ตัวอย่าง (อัตราส่วนเพศชายต่อเพศหญิง คือ 1 : 1.14) และจังหวัดสงขลา จำนวน 98 ตัวอย่าง เป็นเพศชาย จำนวน 44 ตัวอย่าง เพศหญิง จำนวน 54 ตัวอย่าง (อัตราส่วนเพศชายต่อเพศหญิง คือ 1 : 1.22) โดยทั้งหมดพบว่าเป็นตัวอย่างที่เก็บจากผู้ป่วยสงสัยโรคหัด ในช่วงอายุต่ำกว่า 10 ปี มากที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 1 เมื่อพิจารณาประวัติการได้รับวัคซีนป้องกันโรคหัด คางทูม และหัดเยอรมัน พบว่าในทุกช่วงอายุของตัวอย่าง จากจังหวัดนราธิวาส พบไม่มีประวัติการได้รับวัคซีน ได้รับวัคซีน 1 เข็ม หรือ 2 เข็ม หรือไม่แน่ใจ/ไม่ทราบ จำนวน 94, 8, 1 และ 24 ตัวอย่าง ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 74.02, 6.29, 0.79 และ 18.90 ตามลำดับ ตัวอย่างจากจังหวัดปัตตานี พบไม่มีประวัติได้รับวัคซีน ได้รับวัคซีน 1 เข็ม หรือ 2 เข็ม หรือไม่แน่ใจ/ไม่ทราบ จำนวน 124, 4, 4 และ 41 ตัวอย่าง ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 71.68, 2.31, 2.31 และ 23.70 ตามลำดับ ตัวอย่างจากจังหวัดยะลา พบไม่มีประวัติได้รับวัคซีน หรือไม่แน่ใจ/ไม่ทราบ จำนวน 24 และ 6 ตัวอย่าง ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 80 และ 20 ตามลำดับ ตัวอย่างจากจังหวัดสงขลา พบไม่มีประวัติได้รับวัคซีน ได้รับวัคซีน 1 เข็ม หรือ 2 เข็ม หรือไม่แน่ใจ/ไม่ทราบ จำนวน 48, 5, 11 และ 34 ตัวอย่าง ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 48.98, 5.10, 11.22 และ 34.69 ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาในภาพรวมของทั้ง 4 จังหวัด พบว่าไม่มีประวัติได้รับวัคซีน ได้รับวัคซีน 1 เข็ม หรือ 2 เข็ม หรือไม่แน่ใจ/ไม่ทราบ คิดเป็นร้อยละ 67.76, 3.97, 3.74 และ 24.53 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2

การสกัดสารพันธุกรรม และการเพิ่มปริมาณสาร

พันธุกรรมไวรัสหัด ด้วยวิธี Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

ขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมและเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมไวรัสหัดด้วยวิธี (RT-PCR) ดำเนินการโดยศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12 สงขลา ทำการสกัดสารพันธุกรรมไวรัสหัดจากตัวอย่าง throat swab หรือ nasal swab ปริมาตร 140 ไมโครลิตร โดยใช้ชุดสกัดสารพันธุกรรมสำเร็จรูป QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN, Germany)⁽¹⁴⁾ โดยในการสกัดสารพันธุกรรมทุกครั้งจะใช้น้ำที่ปราศจากเอนไซม์ nuclease เป็นตัวอย่างควบคุมผลลบในการสกัดทุกครั้ง (negative extraction control) ตัวอย่างควบคุมผลบวก ความยาว 854 นิวคลีโอไทด์ ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ควบคุมและป้องกันโรคแห่งชาติสหรัฐอเมริกา (US-CDC, USA) และ primers (US-CDC, USA) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ forward primer (MeV216) ดังนี้ 5'-TGG AGC TAT GCC ATG GGA GT -3' และ reverse primer (MeV214) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้ 5'-TAA CAA TGA TGG AGG GTA GG- 3' จากนั้นเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมไวรัสหัดในส่วน Nucleoprotein (N) gene ความยาว 634 นิวคลีโอไทด์ ด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป OneStep RT-PCR kit (QIAGEN, Germany) ตามมาตรฐานวิธีปฏิบัติของศูนย์ควบคุมและป้องกันโรคแห่งชาติสหรัฐอเมริกา⁽¹⁵⁾ เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาตรวจสอบหาแถบ ดีเอ็นเอที่จำเพาะของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ด้วยการทำ gel electrophoresis ผลผลิตพีซีอาร์ของตัวอย่างที่ให้ผลบวกจะถูกส่งควบคู่กับตัวอย่าง throat swab หรือ nasal swab ไปยังฝ่ายไวรัสระบบประสาทและระบบไหลเวียนโลหิต สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เพื่อดำเนินการในขั้นตอนการทำให้ PCR product ให้บริสุทธิ์ ด้วยชุดน้ำยา QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN, Germany) จากนั้นวัดความเข้มข้นดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Spectrophotometer (NanoDrop, ND-1000,

ตารางที่ 1 จำนวนตัวอย่างส่งตรวจแยกตามช่วงอายุและเพศในแต่ละอำเภอของจังหวัดนราธิวาส ปัตตานี ยะลา และสงขลาในปี พ.ศ. 2567

	ช่วงอายุ (ปี)/เพศ															
	< 1 ปี		1-4 ปี		5-9 ปี		10-14 ปี		15-19 ปี		20-29 ปี		> 30 ปี		รวมทุกช่วงอายุ	
จังหวัด/อำเภอ	ชาย	หญิง	ชาย	หญิง	ชาย	หญิง	ชาย	หญิง	ชาย	หญิง	ชาย	หญิง	ชาย	หญิง	ชาย	หญิง
นราธิวาส	13	4	29	33	15	9	7	4	0	2	4	4	0	3	68	59
เจาะไอร้อง	1														1	
เมืองนราธิวาส	4	4	17	23	8	5	3	3	1		1	1	2		33	39
จะแนะ	1		1	2	1										3	2
ตากใบ					2	1					1				2	2
บาเจาะ	1		1												2	
ยี่งอ			1		1										1	1
ระแงะ	6		8	6	3	1	3	1	1		2	2	1		22	12
รือเสาะ			1		1	1					1				3	1
ศรีสาคร				2											2	
สุโหงโกลก							1								1	
ปัตตานี	10	8	44	38	23	20	5	5	4	4	2	3	4	3	92	81
เมืองปัตตานี	1	1	3	1		1	1								5	3
โคกโพธิ์	2	1	2	6	1	4			1		1		1	2	6	15
ไม้แก่น				1											1	
กะพ้อ			2												2	
ทุ่งยางแดง	1			1											1	1
ปะนาเระ						1									1	
มายอ		1			1						1				2	1
ยะรัง			2	1		1									2	2
ยะหริ่ง	3	2	16	17	9	7	3	4	4	1			1		36	31
หนองจิก	3	3	19	11	12	6	1	1		2	1	2	2	1	38	26
ยะลา	4	2	6	7	3	5	1	0	0	0	0	2	0	0	14	16
เบตง	4	2	6	7	3	4					1				13	14
เมืองยะลา						1	1								1	1
บันนังสตา											1				1	
สงขลา	8	5	14	16	7	4	3	4	0	1	5	14	7	10	44	54
เทพา	1	3	6	11	7	3	3	2			3	5	2	5	22	29
เมืองสงขลา			1						1		2		1		2	3
คลองหอยโข่ง	1														1	
จะนะ				1							1		1	1	1	3
บางกล่ำ											2	1		1	2	2
ระโนด													1		1	
สะเดา	2			1											2	1
สะบ้าย้อย			3	2			1								3	3
สิงหนคร							1								1	
หาดใหญ่	4	2	4	1		1					5		3	2	11	11
รวม	35	19	93	94	48	38	16	13	4	7	11	23	11	16	218	210

ตารางที่ 2 ข้อมูลประวัติการได้รับวัคซีนป้องกันโรคหัด คางทูม และหัดเยอรมัน แยกตามช่วงอายุในแต่ละอำเภอของจังหวัดนราธิวาส ปี พ.ศ. 2567

ช่วงอายุ (ปี)/ประวัติการได้รับวัคซีน (MMR vaccine)																							
< 1 ปี			1-4 ปี			5-9 ปี			10-14 ปี			15-19 ปี			20-29 ปี			> 30 ปี			รวมทุกช่วงอายุ		
จังหวัด/อำเภอ	0*	1*	U*	0*	1*	2*	U*	0*	1*	2*	U*	0*	1*	2*	U*	0*	1*	2*	U*	0*	1*	2*	U*
นราธิวาส	13	3	1	53	2	0	7	17	3	0	4	5	0	0	6	2	0	0	0	2	0	0	1
เจาะไอร้อง	1																						1
เมืองนราธิวาส	5	2	1	31	2	2	7	9	1	3	2	4	1			1	1	1	1	1	1	1	17
จะแนะ	1			3				1															5
ตากใบ								1	2								1						1
บาเจาะ	1			1																			2
ยี่งอ				1				1															2
ระแงะ	5	1		14				4			3	1	1			2	2	1					3
รือเสาะ				1				1	1								1						2
ศรีสาคร				2																			2
สุโงโก-ลก												1											1
ปัตตานี	18	0	0	66	4	2	10	29	0	1	13	5	0	0	5	4	0	1	3	1	0	0	6
เมืองปัตตานี	2			2				1				1											3
โคกโพธิ์	3			6			2	4		1						1	1			1	2	15	1
ไม้แก่น				1																			1
กะพ้อ				2																			2
ทุ่งยางแดง	1			1																			2
ปะนาเระ											1												1
มายอ	1							1											1				2
ยะรัง				3						1													3
ยะหริ่ง	5			26	4	2	1	13		3	5	2	4	1							1	53	4
หนองจิก	6			25			5	10		8		2		2		3					3	41	23

ตารางที่ 2 ข้อมูลประวัติการได้รับวัคซีนป้องกันโรคหัด คางทูม และหัดเยอรมัน แยกตามช่วงอายุในแต่ละอำเภอของจังหวัดนราธิวาส ปีตานิยะลา และสงขลา ในปี พ.ศ. 2567 (ต่อ)

ช่วงอายุ (ปี)/ประวัติการได้รับวัคซีน (MMR vaccine)																			
< 1 ปี		1-4 ปี		5-9 ปี		10-14 ปี		15-19 ปี		20-29 ปี		> 30 ปี		รวมทุกช่วงอายุ					
จังหวัด/อำเภอ	0* 1* U*	0* 1* 2* U*	0* 1* 2* U*	0* 1* 2* U*	0* 1* 2* U*	0* 1* 2* U*	0* 1* 2* U*	0* 1* 2* U*	0* 1* 2* U*	0* 1* 2* U*	0* 1* 2* U*	0* 1* 2* U*	0* 1* 2* U*	0* 1* 2* U*	0* 1* 2* U*	0* 1* 2* U*	0* 1* 2* U*	0* 1* 2* U*	0* 1* 2* U*
ยะลา	6 0 0	12 0 0 1	6 0 0 2	0 0 0 1	0 0 0 1	0 0 0 1	0 0 0 1	0 0 0 0	0 0 0 2	0 0 0 2	0 0 0 2	0 0 0 0	0 0 0 0	24 0 0	6 0 6				
เบตง	6	12	1	5	2					1				23	4				
เมืองยะลา				1		1								1	1				
บันนังสตา																			
สงขลา	12 1 0	22 2 3 3	6 0 4 1	2 1 3 1	0 0 0 1	0 0 0 1	0 0 0 1	0 0 0 1	3 0 1 15	3 0 1 15	3 0 1 15	3 1 0 13	48 5 11	34					
เทพา	4	10 2 3 2	5 4 1	2 1 2					3	5	1	6	25 3 9	14					
เมืองสงขลา		1						1		2		1	1	4					
คลองหอยโข่ง	1												1						
จะนะ			1							1	1	1	1	3					
บางกล่ำ										3		1		4					
ระโนด												1							
สะเดา	2	1											3						
สะบ้าย้อย		5				1							5	1					
สิงหนคร						1													1
หาดใหญ่	5 1 1	5		1						1 4	1 4	1 4	11 2 1	8					
รวม	49 4 1	153 8 5 21	58 3 5 20	12 1 3 13	6 0 1 4	6 0 1 4	6 0 1 4	6 0 1 4	6 0 2 26	6 1 0 20	6 1 0 20	290 17 16	105						

หมายเหตุ: O* ไม่เคยได้รับวัคซีน, 1* เคยได้รับวัคซีน 1 ครั้ง, 2* เคยได้รับวัคซีน 2 ครั้ง, U* ไม่ทราบ/ไม่แน่ใจ

USA) เพื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) และหาสายพันธุ์ไวรัสที่ติดต่อไป

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ไวรัสด้วยวิธี Sanger Sequencing

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสด้วยเทคนิค Sanger Sequencing ใช้ primer MeV216 และ MeV214 โดยใช้ชุดน้ำยา BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied BioSystem, USA) โดยเตรียม sequencing reaction จำนวน 2 หลอด แยก forward primer (MeV216) และ reverse primer (MeV214) โดยใช้ DNA template ปริมาตร 5–8 ไมโครลิตร ขึ้นกับความเข้มข้นของ DNA ที่ได้ทำ PCR product ให้บริสุทธิ์ ด้วยชุด DNA purification สำเร็จรูป (Agencourt CleanSEQ, USA) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง Sequencer Genetic Analyzer รุ่น 3500 (Applied BioSystem, USA) นำผลที่ได้ไปวิเคราะห์และตรวจสอบคุณภาพของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Sequencer Version 5.4.6 (Gene Code Corporation, USA) และโปรแกรม RECall ซึ่งเป็นโปรแกรมที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเครือข่ายหัดและหัดเยอรมันทั่วโลก⁽¹⁶⁾ จากนั้นสร้าง Phylogenetic Tree โดยใช้โปรแกรม MEGA12⁽¹⁷⁾ เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายพันธุ์อ้างอิงขององค์การอนามัยโลกเพื่อวิเคราะห์หาสายพันธุ์ไวรัสที่ติดต่อไป

การวิเคราะห์ Phylogenetic Tree ของไวรัส

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไวรัสที่หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ Sanger Sequencing ในส่วนของ Nucleoprotein (N) gene ความยาว 450 นิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสที่หาสายพันธุ์อ้างอิงขององค์การอนามัยโลก (WHO reference strains) จำนวน 24 สายพันธุ์⁽¹⁾ โดยใช้โปรแกรม MEGA12 และสร้าง Phylogenetic

Tree ด้วยวิธี Maximum Parsimony Tree โดยเลือก bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ ซึ่งสายพันธุ์ไวรัสที่หาสายพันธุ์ที่ได้จะรายงานเข้าไปในฐานข้อมูลขององค์การอนามัยโลก (Measles Nucleotide Surveillance: MeaNS2)⁽¹⁸⁾ โดยก่อนการส่งข้อมูลเข้าไปในฐานข้อมูล MeaNS2 จะต้องทำการตั้งชื่อสายพันธุ์ตามแนวทางการตั้งชื่อขององค์การอนามัยโลก ดังนี้ ถ้าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มาจากตัวอย่างผู้ป่วยโดยตรง ให้ตั้งชื่อขึ้นต้นด้วย MVs หากได้จากตัวอย่างที่ได้จากการแยกเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง ให้ตั้งชื่อขึ้นต้นด้วย MVi แล้วตามด้วยชื่อจังหวัดที่มาของตัวอย่าง ตามด้วยชื่อประเทศ โดยใช้ตัวย่อที่เป็นสากลตัวอักษร 3 ตัวแรก ตามด้วยสัปดาห์การระบาดที่เก็บตัวอย่าง (Epi Week) และปี ค.ศ. สุดท้ายคือ จำนวนตัวอย่างที่เก็บใน Epi Week นั้นๆ ตัวอย่างเช่น MVs/Pattani.THA/10.24/2⁽¹⁾

จริยธรรมการวิจัยในมนุษย์

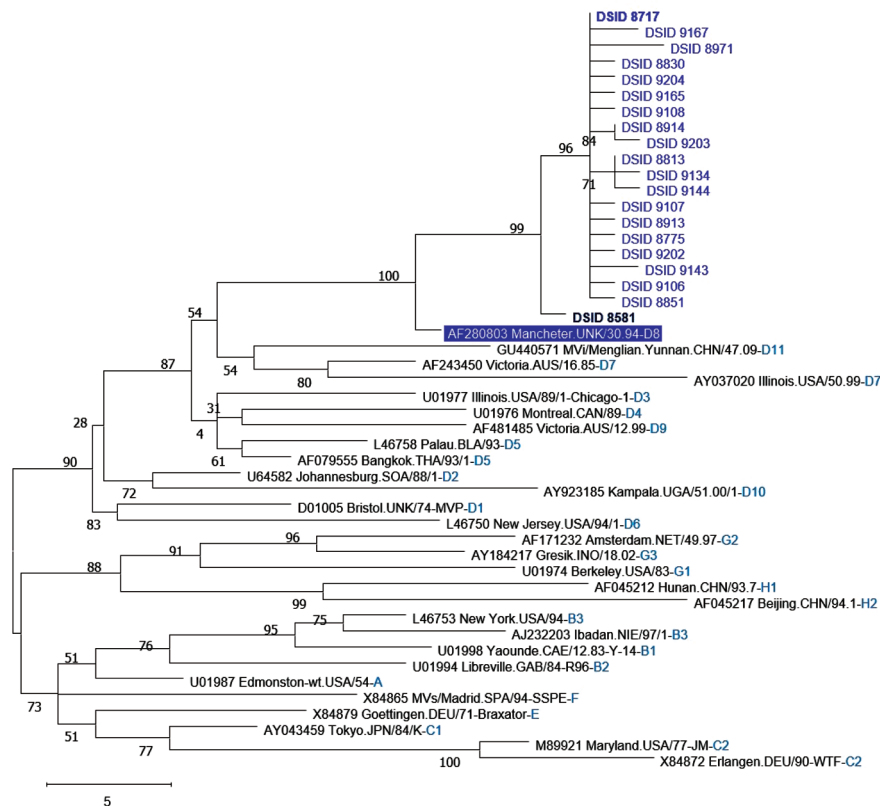
โครงการนี้ผ่านการรับรองด้านจริยธรรมในคนจากคณะกรรมการพิจารณาการศึกษาวิจัยในคน กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ รหัสโครงการวิจัย 6/2568 รหัสเอกสารรับรอง DMSc-EC043 เมื่อวันที่ 15 มกราคม พ.ศ. 2568

ผล

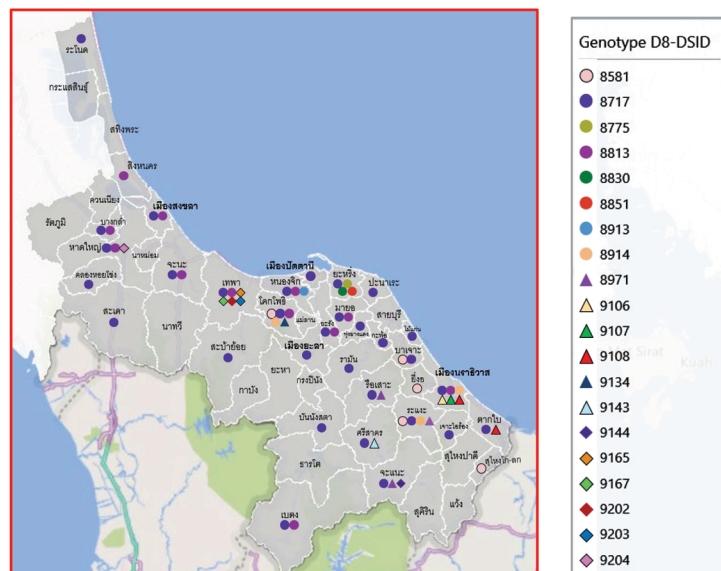
ตัวอย่างจากผู้ป่วยสงสัยติดเชื้อไวรัสที่หาสาเหตุการระบาดในจังหวัดสงขลา ยะลา ปัตตานี และนราธิวาส ที่ผลการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยวิธี RT-PCR ให้ผลเป็นบวก และสามารถวิเคราะห์หาสายพันธุ์ไวรัสด้วยการทำ Sanger Sequencing ได้จำนวน 428 ตัวอย่าง ในจำนวนนี้มี 98 ตัวอย่าง เก็บจาก 10 อำเภอ ในจังหวัดสงขลา (เทพา เมืองสงขลา คลองหอยโข่ง จะนะ บางกล่ำ ระโนด สะเดา สะบ้าย้อย สิงหนคร และหาดใหญ่) จำนวน 127 ตัวอย่าง เก็บจาก 10 อำเภอ ในจังหวัดนราธิวาส (เจาะไอร้อง เมืองนราธิวาส จะแนะ ตากใบ บาเจาะ ยี่งอ ระแงะ รือเสาะ ศรีสาคร และ

สุโข-โก-ลก) 173 ตัวอย่าง จาก 10 อำเภอ ในจังหวัดปัตตานี (เมืองปัตตานี โคกโพธิ์ ไผ่แก่น กะป้อ พังยางแดง ปะนาละ มายอ ยะรัง ยะหริ่ง และหนองจิก) และ 30 ตัวอย่าง จาก 4 อำเภอ ในจังหวัดยะลา (เมืองยะลา เบตง บันนังสตา และยะหา) ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน Nucleoprotein (N) gene ขนาดความยาว 450 นิวคลีโอไทด์ ทั้ง 428 ตัวอย่าง เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสหัดสายพันธุ์อ้างอิงขององค์การอนามัยโลก จำนวน 24 สายพันธุ์ พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับไวรัสหัดสายพันธุ์ D8 แต่ถูกจำแนกออกเป็น 20 Distinct Sequence Identifiers (DSId) ประกอบด้วย DSId8581, 8717, 8775, 8813, 8830, 8851, 8913, 8914, 8971, 9106, 9107, 9108, 9134, 9143, 9144, 9165, 9167, 9202, 9203 และ 9204 ดังแสดงในภาพที่ 1 ซึ่งแพร่กระจายในแต่ละอำเภอของจังหวัดสงขลา ยะลา ปัตตานี และนราธิวาส ดังแสดงในภาพที่ 2 โดยจังหวัดสงขลาพบ 7 DSIds และพบ DSId8717 มากที่สุด จำนวน 68 ตัวอย่าง รองลงมา คือ DSId8813 จำนวน 19 ตัวอย่าง จังหวัดยะลาพบเพียง 2 DSIds คือ DSId8717 และ DSId8813 จำนวน 23 และ 7 ตัวอย่าง ตามลำดับ จังหวัดปัตตานีพบ 9 DSIds โดยพบ DSId8717 มากที่สุด 156 ตัวอย่าง รองลงมา คือ DSId8813 จำนวน 9 ตัวอย่าง จังหวัดนราธิวาสพบ 10 DSIds โดยพบ DSId8717 มากที่สุด จำนวน 70 ตัวอย่าง รองลงมา คือ DSId8914 จำนวน 16 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 3

จากจำนวนที่ตรวจพบ 20 DSIds พบว่ามี 19 DSIds พบเป็นครั้งแรกในประเทศไทย และได้รายงานในฐานข้อมูลขององค์การอนามัยโลก (MeaNS2) เป็นครั้งแรก โดย DSId8717 เป็น DSId ตัวแรกที่ตรวจพบจากการระบาดครั้งนี้ ส่วน DSId8581 ถึงแม้จะตรวจพบครั้งแรกในประเทศไทย แต่เคยมีรายงานในฐานข้อมูลขององค์การอนามัยโลกมาก่อนว่าพบครั้งแรกในประเทศมาเลเซียจากการที่ตรวจพบ DSId ใหม่ในการระบาดครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสหัดสายพันธุ์ D8 ที่พบมีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันในแต่ละ DSId เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของ 19 DSIds ที่พบครั้งแรกในประเทศไทยเปรียบเทียบกับ DSId8717 ซึ่งเป็น DSId ตัวแรกที่ตรวจพบของการระบาดครั้งนี้ พบว่ามีความแตกต่างกันในระดับนิวคลีโอไทด์ 1–3 ตำแหน่ง ดังแสดงในภาพที่ 3 ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน 1–2 ตำแหน่ง โดยกรดอะมิโนเปลี่ยนแปลง 1 ตำแหน่ง ได้แก่ DSId8813, 8830, 8851, 8914, 8971, 9107, 9108, 9134, 9167 และ 9204 ซึ่งเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง 58, 15, 99, 150, 80, 97, 79, 58, 65 และ 150 ตามลำดับ ส่วน DSId ที่มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน 2 ตำแหน่ง ได้แก่ DSId9144 และ DSId9203 ซึ่งเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง 58–59 และ 126, 150 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4



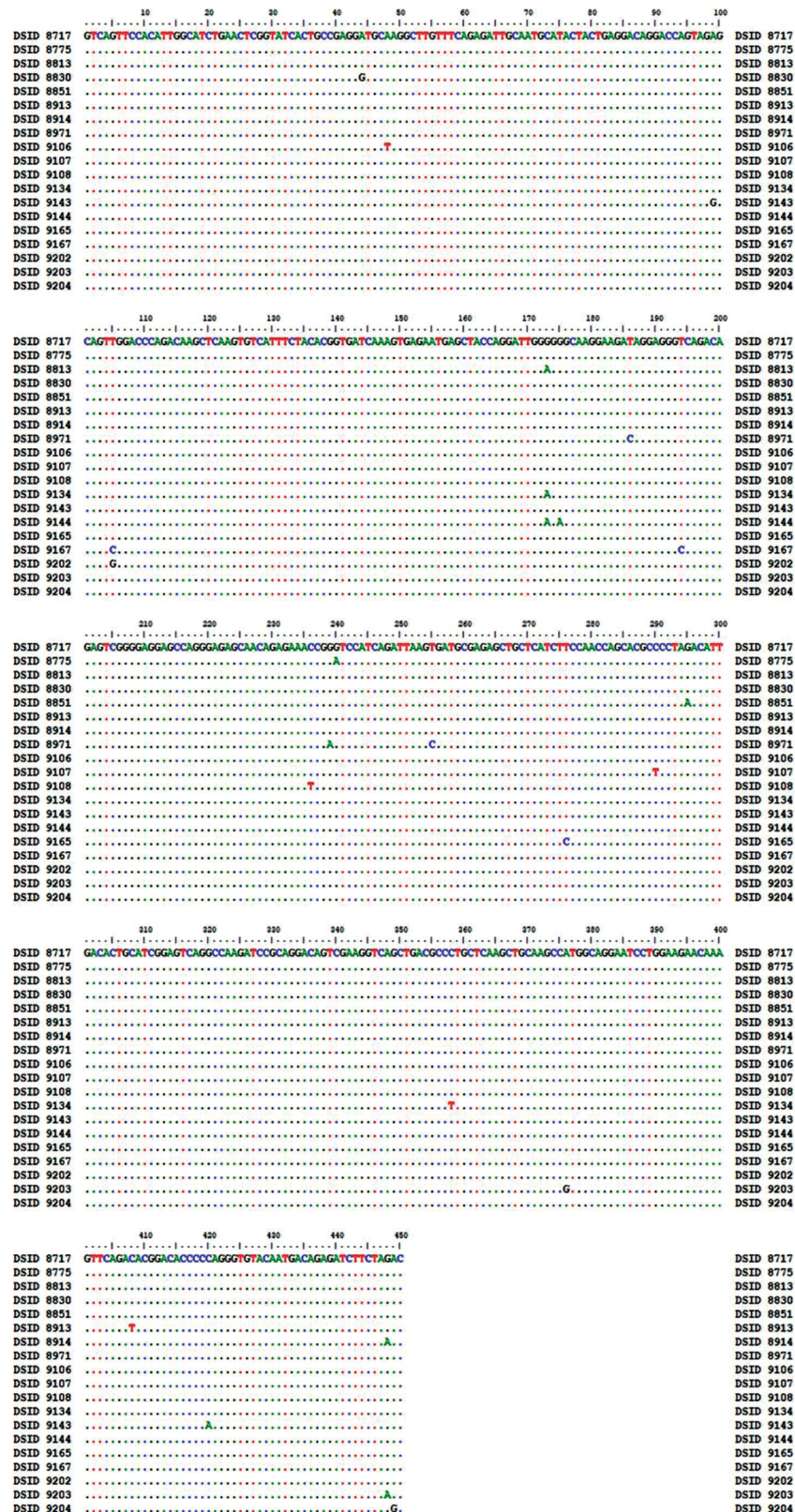
ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของไวรัสหัดสายพันธุ์ D8 จำนวน 19 DSIDs ที่รายงานในฐานข้อมูลขององค์การอนามัยโลกครั้งแรกและตรวจพบครั้งแรกในประเทศไทย เปรียบเทียบกับ 24 สายพันธุ์อ้างอิงขององค์การอนามัยโลกด้วยวิธี Maximum Parsimony โดยใช้ค่า bootstraps ที่ 1,000 replications ตัวเลขบนแผนภาพแสดงค่าร้อยละความเชื่อมั่นของการใช้ bootstraps โดยความยาวของแต่ละ branches อยู่ในหน่วยของจำนวนการเปลี่ยนแปลงตลอดทั้งลำดับ ตามค่าสเกลบาร์แสดงสัดส่วนความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการเปลี่ยนแปลง



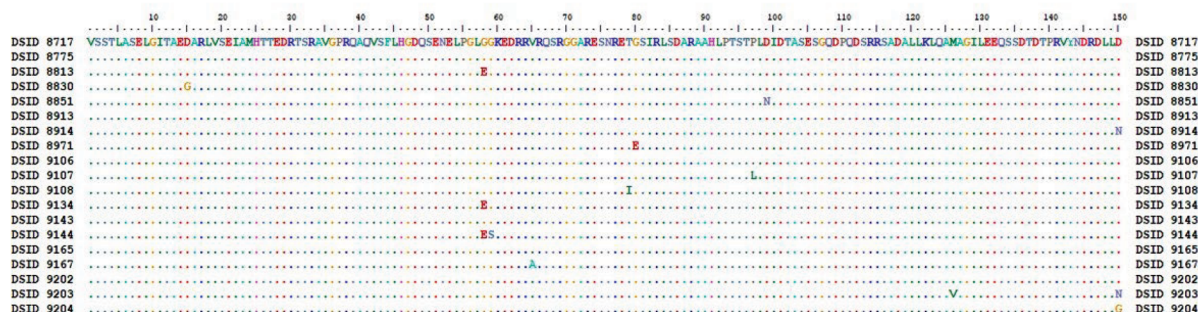
ภาพที่ 2 แผนที่แสดงอำเภอที่เก็บตัวอย่างส่งตรวจหาสายพันธุ์ไวรัสหัด และแสดงการแพร่กระจายของไวรัสหัดสายพันธุ์ D8 จำนวน 20 DSIDs ที่ตรวจพบจากเหตุการณ์การระบาดในจังหวัดสงขลา ยะลา ปัตตานี และนราธิวาส ในปี พ.ศ. 2567

ตารางที่ 3 แสดงจำนวน Distinct Sequence Identifiers (DSId) ของไวรัสหัดสายพันธุ์ D8 ที่ตรวจพบจากเหตุการณ์การระบาดในจังหวัดสงขลา ยะลา ปัตตานี และนราธิวาส ในปี พ.ศ. 2567

จังหวัด/อำเภอ	จำนวนตัวอย่างแยกตาม DSId																				จำนวนรวม
	85	87	87	88	88	88	89	89	89	91	91	91	91	91	91	91	91	92	92	92	
	81	17	75	13	30	51	13	14	71	06	07	08	34	43	44	65	67	02	03	04	
ปัตตานี	1	156	2	9	1	1	1	1					1								173
ยะหริ่ง	1	63	2		1	1															67
หนองจิก		59		4			1														64
โคกโพธิ์		15		3				1					1								21
เมืองปัตตานี		8																			8
ยะรัง		3		1																	4
กะป้อ		2																			2
มายอ		2		1																	3
ทุ่งยางแดง		2																			2
ปะนาเระ		1																			1
ไม้แก่น		1																			1
นราธิวาส	13	70		8				16	5	5	1	7		1	1						127
เมืองนราธิวาส		44		8				9		5	1	5									72
ระแงะ	9	15						7	3												34
รือเสาะ		3							1												4
จะแนะ		3						1							1						5
ตากใบ		2										2									4
เจาะไอร้อง		1																			1
ศรีสาคร		1												1							2
บาเจาะ	1	1																			2
สุโหงโกลก	1																				1
ยี่งอ	2																				2
สงขลา		68		19												1	7	1	1	1	98
เทพา		38		3												1	7	1	1		51
หาดใหญ่		13		8															1		22
สะบ้าย้อย		6																			6
เมืองสงขลา		4		1																	5
สะเดา		3																			3
คลองหอยโข่ง		1																			1
ระโนด		1																			1
จะนะ		1		3																	4
บางกล่ำ		1		3																	4
สิงหนคร				1																	1
ยะลา		23		7																	30
เบตง		20		7																	27
เมืองยะลา		2																			2
บันนังสตา		1																			1
จำนวนรวมทั้งหมด	14	317	2	43	1	1	1	17	5	5	1	7	1	1	1	1	7	1	1	1	428



ภาพที่ 3 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสหัดสายพันธุ์ D8 จำนวน 19 DSIIDs ที่รายงานครั้งแรก
 ในฐานข้อมูลขององค์การอนามัยโลก (Measles Surveillance Nucleotide database: MeaNS2)
 และ ตรวจพบครั้งแรกในประเทศไทยจากเหตุการณ์การระบาดในจังหวัดสงขลา ยะลา ปัตตานี และนราธิวาส
 ในปี พ.ศ. 2567



ภาพที่ 4 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของไวรัสหัดสายพันธุ์ D8 จำนวน 19 DSIs ที่รายงานครั้งแรกในฐานข้อมูลขององค์การอนามัยโลก (MeaNS2) และตรวจพบครั้งแรกในประเทศไทยจากเหตุการณ์การระบาดในจังหวัดสงขลา ยะลา ปัตตานี และนราธิวาส ในปี พ.ศ. 2567

วิจารณ์

สถานการณ์การระบาดของโรคหัดใน 4 จังหวัดภาคใต้ ได้แก่ สงขลา ยะลา ปัตตานี และนราธิวาส ในปี พ.ศ. 2567 เริ่มจากผู้ป่วยยืนยันรายแรกในอำเภอยะหริ่ง จังหวัดปัตตานี แล้วเกิดการระบาดเป็นกลุ่มก้อน (outbreak) สถานที่เกิดการระบาด ประกอบด้วย โรงเรียน หมู่บ้าน ครอบครัวยุโรป และหอพัก โดยพบการระบาดของโรคหัดเป็นกลุ่มก้อนมากที่สุดในจังหวัดปัตตานี รองลงมา คือ ยะลา และนราธิวาส คิดเป็นร้อยละ 45.87, 22.42 และ 21.39 ตามลำดับ โดยจังหวัดยะลา มีอัตราป่วยต่อแสนประชากรสูงสุด 268.33 รองลงมา คือ ปัตตานี นราธิวาส และสงขลา 257.50, 165.66 และ 33.05 ตามลำดับ ทั้งนี้จากข้อมูลความครอบคลุมของวัคซีนหัดเข็มที่ 2 ในฐานข้อมูลระบบคลังข้อมูลด้านการแพทย์และสุขภาพ กระทรวงสาธารณสุข (Health Data Center; HDC) พบว่าจังหวัดสงขลา ยะลา ปัตตานี และนราธิวาส มีความครอบคลุมของวัคซีนหัดเข็มที่ 2 ร้อยละ 86.22, 69.67, 40.90 และ 54.20 ตามลำดับ⁽¹²⁾ ซึ่งต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐาน (เกณฑ์มาตรฐานคือ มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 95)⁽¹³⁾ ถึงแม้ความครอบคลุมของวัคซีนหัดในจังหวัดยะลาจะสูงกว่าปัตตานีและนราธิวาสแต่มีอัตราป่วยสูงสุด เนื่องจากจำนวนประชากรในยะลามีจำนวนน้อยกว่าปัตตานีและนราธิวาส นอกจากนี้จากการตรวจสอบประวัติการได้รับวัคซีนป้องกันโรคหัด คางทูม หัดเยอรมัน

(MMR vaccine) ของผู้ป่วย พบว่าร้อยละ 67.76 ไม่มีประวัติได้รับวัคซีนมาก่อน ร้อยละ 24.53 ไม่ทราบหรือไม่แน่ใจในการรับวัคซีน ร้อยละ 3.97 เคยได้รับวัคซีน 1 ครั้ง ร้อยละ 3.74 เคยได้รับวัคซีน 2 ครั้ง ดังนั้นความครอบคลุมของวัคซีนหัดที่ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการระบาดของโรคหัด และมีการแพร่กระจายเป็นวงกว้างในครั้งนี้นี้ ทั้งนี้จากเหตุการณ์การระบาดของโรคหัดในเขตภาคใต้ในปี พ.ศ. 2561–2562 พบว่าสายพันธุ์ไวรัสหัดที่ก่อให้เกิดการระบาด ได้แก่ สายพันธุ์ B3 (DSID5258, 5616, 5617, 5639, 5640, 5660, 5661, 5805, 5806, 5821, 5959, 6066, 6183 และ 6219) และสายพันธุ์ D8 DSID5981⁽¹¹⁾ ซึ่ง Wacharachaisurapol N. และคณะ ยังได้เคยรายงานว่าสายพันธุ์ไวรัสหัดที่มีการแพร่กระจายในเขตกรุงเทพมหานครในช่วงปี พ.ศ. 2559–2560 คือ สายพันธุ์ D8⁽¹⁹⁾

ข้อมูลสายพันธุ์ไวรัสหัดที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งได้รายงานในฐานข้อมูลขององค์การอนามัยโลกแล้ว จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการกำจัดโรคหัดในทุกประเทศและทุกภูมิภาคของโลก โดยสามารถใช้เป็นแหล่งข้อมูลอ้างอิงในการเฝ้าระวังสายพันธุ์นำเข้าและการติดตามเส้นทางการแพร่กระจายของไวรัสหัด (Chain of Transmission) ซึ่งหากประเทศหรือภูมิภาคใดมีรายงานผู้ป่วยโรคหัดหรือเกิดการระบาดของโรคหัด และสามารถอ้างอิงถึงแหล่งที่มาของไวรัสได้ จะนำไปสู่

การรับรองการกำจัดโรคหัดในประเทศหรือภูมิภาคนั้น ได้ตามเป้าหมายขององค์การอนามัยโลก นอกจากนี้ การพบ DSI_D ใหม่ ถือเป็นข้อมูลสำคัญในการเฝ้าสังเกตการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมภายในสายพันธุ์ของไวรัสหัดแต่ละสายพันธุ์ได้ อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเฉพาะในส่วนยีน Nucleoprotein (N) ความยาว 450 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นประโยชน์ในการเฝ้าระวังสายพันธุ์นำเข้า และติดตามที่มาและเส้นทางการแพร่กระจายของไวรัสหัดที่เป็นสาเหตุของการระบาดเท่านั้น เพื่อสนับสนุนการประเมินความสำเร็จของโครงการกำจัดโรคหัดของประเทศไทย และภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ตามที่องค์การอนามัยโลกกำหนด ซึ่งการเปลี่ยนแปลงในส่วน N gene เพียงยีนเดียวไม่สามารถจัดตั้งสายพันธุ์ (Genotype) ใหม่ได้โดยเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลกได้กำหนดหลายปัจจัยในการจัดตั้งสายพันธุ์ใหม่และที่สำคัญต้องมีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วนของ N gene ความยาว 450 นิวคลีโอไทด์ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Hemagglutinin (H) ที่ถูกแปลรหัสไปเป็นโปรตีนทั้งหมด⁽²⁰⁾ ดังนั้นหากมีการศึกษาเพิ่มเติมในส่วน Hemagglutinin รวมถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของไวรัสหัด (whole genome) นอกจากใช้เป็นข้อมูลในการเฝ้าระวังสายพันธุ์นำเข้า ติดตามที่มาและเส้นทางการแพร่กระจายของไวรัสหัดที่เป็นสาเหตุของการระบาด จะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาการกลายพันธุ์ของตัวเชื้อและเป็นข้อมูลในการพิจารณาจัดตั้งสายพันธุ์ไวรัสใหม่

นอกจากการระบาดของโรคหัดในประเทศไทยแล้ว Mat Daud MRH และคณะ มีการรายงานผู้ป่วยโรคหัดในประเทศมาเลเซีย ในช่วงปี พ.ศ. 2559–2563 จำนวน 2,844 ราย⁽²¹⁾ Vaidya SR และ Chowdhury DT ได้รายงานสายพันธุ์ไวรัสหัดที่แพร่กระจายในประเทศอินเดียในช่วงปี พ.ศ. 2554–2558 ได้แก่ สายพันธุ์ B3, D4 และ D8⁽²²⁾ นอกจากนี้ Bankamp B และคณะ ได้รายงานสถานการณ์ของโรคหัดทั่วโลกที่มีการรายงานจำนวนผู้ป่วยเข้าไปในฐานข้อมูลขององค์การอนามัยโลก

ในช่วงปี พ.ศ. 2562–2566 โดยสายพันธุ์ที่รายงานในฐานข้อมูลมากที่สุด ได้แก่ สายพันธุ์ D8 ประกอบด้วย DSI_D2283, 4683, 2279, 5801, 5963, 5981, 8248 และ 8278 รองลงมา ได้แก่ สายพันธุ์ B3 ประกอบด้วย DSI_D4256, 4299, 6500, 8359, 4298, 5306, 6418 และ 6493⁽¹⁰⁾ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Williams D และคณะ ได้รายงานสายพันธุ์ไวรัสหัดที่พบในปี พ.ศ. 2565 คือ สายพันธุ์ D8 และ B3⁽⁹⁾ อย่างไรก็ตามไวรัสหัดเป็นอาร์เอ็นเอไวรัส ขนาด 15,894 นิวคลีโอไทด์ที่มีลักษณะคงตัวสูง (highly conserved) ดังนั้นการเกิดการกลายพันธุ์ของไวรัส (virus mutation) อาจมีโอกาสดำเนินการได้ต่ำ^(9,23)

ทั้งนี้ข้อจำกัดของการศึกษาครั้งนี้ คือ ในบางพื้นที่ของแต่ละจังหวัดเป็นพื้นที่ภูเขาหรือพื้นที่ห่างไกล เจ้าหน้าที่เข้าถึงได้ยากจึงไม่สามารถเก็บตัวอย่างส่งตรวจได้ ทำให้ข้อมูลที่ได้อาจไม่ครบทุกพื้นที่ของการระบาดและในบางครอบครัวที่มีผู้ป่วยไข่ออกผื่นมีความเชื่อว่าโรคหัดสามารถหายได้เอง จึงปฏิเสธการเข้ารับการรักษา ทำให้พลาดโอกาสในการเก็บตัวอย่างส่งตรวจยืนยันทางห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้ข้อมูลประวัติผู้ป่วยยังไม่ครบถ้วน เช่น ไม่มีประวัติการเดินทางไปในที่มีโอกาสเสี่ยงติดเชื้อในช่วงก่อนป่วย ไม่มีประวัติการสัมผัสใกล้ชิดผู้ป่วย ทำให้ไม่สามารถสอบสวนถึงแหล่งที่มาของไวรัสหัดที่ก่อให้เกิดการระบาดครั้งนี้ได้

อย่างไรก็ตามเพื่อป้องกันและควบคุมการระบาดของโรคหัด และนำไปสู่ความสำเร็จของการกำจัดโรคหัดในประเทศไทยและในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ประชาชนต้องรักษาสุขอนามัย ฉีดวัคซีนป้องกันโรคหัดสำหรับเด็ก และควรได้รับวัคซีนให้ครบ 2 เข็ม โดยเข็มแรกเมื่อเด็กอายุครบ 9 เดือน และเข็มที่ 2 เมื่อเด็กอายุ 18 เดือน หากเด็กยังไม่เคยได้รับวัคซีนมาก่อน ไม่ว่าจะอายุเท่าไรก็ตาม ควรเข้ารับวัคซีนที่สถานพยาบาลใกล้บ้าน แต่ถ้าหากมีอาการไข่ออกผื่น ต้องรีบไปพบแพทย์ทันทีเพื่อรับการรักษาและป้องกันการแพร่กระจายของโรค ซึ่งหน่วยงานสาธารณสุขระดับพื้นที่ควรเพิ่มความเข้มข้น

ของการเฝ้าระวังโรคตามมาตรฐานที่องค์การอนามัยโลกกำหนด โดยติดตามสถานการณ์โรคอย่างใกล้ชิดและควรสำรวจความครอบคลุมของวัคซีนในพื้นที่ นอกจากนี้ กรมควบคุมโรค ควรมีการณรงค์ให้ประชาชนในพื้นที่ที่มีความครอบคลุมของวัคซีนต่ำได้รับวัคซีนมากขึ้นให้ได้อย่างน้อยร้อยละ 95 เพื่อป้องกันการระบาดของโรคในชุมชน และเพิ่มความเข้มแข็งของระบบการสอบสวนโรคเพื่อให้ได้มาซึ่งข้อมูลที่จะสามารถระบุแหล่งที่มาของไวรัสได้

สรุป

การศึกษาครั้งนี้พบว่า สายพันธุ์ไวรัสหัดที่ระบาดในจังหวัดสงขลา ยะลา ปัตตานี และนราธิวาส ในปี พ.ศ. 2567 เป็นสายพันธุ์ D8 จำแนกออกเป็น 20 Distinct Sequence Identifiers (DSId) ได้แก่ DSId8581, 8717, 8775, 8813, 8830, 8851, 8913, 8914, 8971, 9106, 9107, 9108, 9134, 9143, 9144, 9165, 9167, 9202, 9203 และ 9204 ซึ่งทั้ง 20 DSIds เป็นการตรวจพบเป็นครั้งแรกในประเทศไทย โดยมี 19 DSIds รายงานเป็นครั้งแรกในฐานข้อมูลขององค์การอนามัยโลก (Measles Surveillance Nucleotide database: MeaNS2) ยกเว้น DSId8581 มีรายงานก่อนหน้านี้ว่าพบครั้งแรกในประเทศมาเลเซีย อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานการระบาดของ DSId8581 ในประเทศไทยมาก่อน โดยผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 450 นิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน Nucleoprotein (N) ของ 19 DSIds ที่พบครั้งแรกในประเทศไทย และรายงานครั้งแรกในฐานข้อมูล MeaNS2 เปรียบเทียบกับ DSId8717 ซึ่งเป็น DSId ตัวแรกที่พบในการระบาดครั้งนี้ พบว่ามีความแตกต่างกันในระดับนิวคลีโอไทด์ 1–3 ตำแหน่ง ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน โดยลำดับของกรดอะมิโนเปลี่ยนแปลง 1 ตำแหน่ง ได้แก่ DSId8813, 8830, 8851, 8914, 8971, 9107, 9108, 9134, 9167, 9204 โดยเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง 58, 15, 99, 150, 80, 97, 79, 58, 65 และ

150 ตามลำดับ ส่วน DSId ที่มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน 2 ตำแหน่ง ได้แก่ DSId9144 และ DSId9203 โดยเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง 58–59 และ 126, 150 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามผลการศึกษานี้ยังไม่สามารถยืนยันได้ว่าเป็นสายพันธุ์นำเข้า และไม่สามารถติดตามแหล่งที่มาและเส้นทางการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสหัดที่ก่อให้เกิดการระบาดในครั้งนี้ได้เนื่องจากข้อมูลสนับสนุนทางด้านระบาดวิทยามีไม่เพียงพอ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณองค์การอนามัยโลก ศูนย์ควบคุมและป้องกันโรคแห่งสหรัฐอเมริกา ที่สนับสนุนงบประมาณในการศึกษานี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กองระบาด กองโรคติดต่อทั่วไป กรมควบคุมโรค ที่สนับสนุนข้อมูลประวัติผู้ป่วย และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเครือข่ายตรวจหัดและหัดเยอรมัน ณ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12 สงขลา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ช่วยประสานงานในพื้นที่ในการเก็บและรับตัวอย่างส่งตรวจ

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. Measles virus nomenclature update: 2012. Wkly Epidemiol Rec. [online]. 2012; [cited 2025 Jan 27]; 87(9): [8 screens]. Available from: URL: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/241889/WER8709_73-80.PDF?ua=1.
2. กองระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค. แนวทางการเฝ้าระวังและสอบสวนโรคหัด และแนวทางการเฝ้าระวังโรคหัด หัดเยอรมันในหญิงตั้งครรภ์ฉบับวันที่ 9 กันยายน 2567. [ออนไลน์]. 2567; [สืบค้น 26 ม.ค. 2568]; [84 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://ddc.moph.go.th/uploads/publish/1643220241125074353.pdf>.
3. กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. กำหนดการ

- ให้วัคซีนตามแผนงานสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคของกระทรวงสาธารณสุข ปี 2567. [ออนไลน์]. 2568; [สืบค้น 27 ม.ค. 2568]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://ddc.moph.go.th/uploads/publish/1510320231225092421.pdf>.
4. World Health Organization. Immunization data. [online]. 2025; [cited 2025 Jan 27]; [182 screens]. Available from: URL: <https://immunizationdata.who.int/global?topic=Provisional-measles-and-rubella-data&location=>.
 5. World Health Organization. Strategic plan for measles and rubella elimination and sustenance in the WHO South-East Asia Region:2024-2028. [online]. 2024; [cited 2025 Jan 28]; [64 screens]. Available from: URL: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/379066/9789290229476-eng.pdf?sequence=1>.
 6. World Health Organization. WHO South-East Asia Region sets new target for measles and rubella elimination. [online]. 2024; [cited 2025 Jan 27]; [1 screen]. Available from: URL: <https://www.who.int/southeastasia/news/detail/10-10-2024-who-south-east-asia-region-sets-new-target-for-measles-and-rubella-elimination>.
 7. กองโรคป้องกันด้วยวัคซีน กรมควบคุมโรค. แนวทางการเฝ้าระวังควบคุมโรค การตรวจรักษาและส่งตัวอย่างตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อการกำจัดโรคหัดตามโครงการกำจัดโรคหัด ตามพันธะสัญญานานาชาติ (ฉบับปรับปรุง สิงหาคม 2559). พิมพ์ครั้งที่ 3. [ออนไลน์]. 2559; [สืบค้น 28 ม.ค. 2568]; [56 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: http://www.ppho.go.th/web-ppho/dl_strat/F20181225153948.pdf.
 8. Brown KE, Rota PA, Goodson JL, Williams D, Abernathy E, Takeda M, et al. Genetic characterization of measles and rubella viruses detected through global measles and rubella elimination surveillance, 2016-2018. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2019; 68(26): 587-91.
 9. Williams D, Penedos A, Bankamp B, Anderson R, Hübschen J, Mamou MB, et al. Update: circulation of active genotypes of measles virus and recommendations for use of sequence analysis to monitor viral transmission. *Wkly Epidemiol Rec* 2022; 97(39): 485-92.
 10. Bankamp B, Kim G, Hart D, Beck A, Mamou MB, Penedos A, et al. Global update on measles molecular epidemiology. *Vaccine* 2024; 12(7): 810. (13 pages).
 11. กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. สถานการณ์โรคหัด หัดเยอรมัน CRS ประจำปี 2568 ประเทศไทย. [ออนไลน์]. 2568; [สืบค้น 26 ม.ค. 2568]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://apps-doe.moph.go.th/measles>.
 12. กระทรวงสาธารณสุข. ระบบคลังข้อมูลด้านการแพทย์และสุขภาพ (HDC). [ออนไลน์]. 2568; [สืบค้น 29 ม.ค. 2568]; เข้าถึงได้ที่: URL: <https://hdc.moph.go.th/center/public/main>.
 13. กองระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค. สถานการณ์โรคหัด (Measles) ประเทศไทย ข้อมูล ณ วันที่ 31 ธันวาคม 2567. [ออนไลน์]. 2567; [สืบค้น 21 ม.ค. 2568]; [5 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://ddc.moph.go.th/uploads/ckeditor2/files/แจ้งเดือนโรคหัด%20ข้อมูล%20ณ%2031%20ธันวาคม%202567.2.pdf>.
 14. QIAGEN. QIAamp viral RNA mini handbook for purification of viral RNA from plasma, serum, cell-free body fluids, and culture supernatant. [online]. 2023; [cited 2025 Jan 28]; [52 screens]. Available from: URL: <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=c80685c0-4103-49ea-aa72->

- 8989420e3018&lang=en.
15. Mulders MN. Annex C1 Measles genotyping RT-PCR (CDC). [online]. 2020; [cited 2025 Jan 28]; [6 screens]. Available from: URL: [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/immunization/vpd_surveillance/lab_networks/measles_rubella/manual/updated-annexes-\(as-on-2-aug-2021\)/annex-c1-measles-genotyping-rt-pcr-\(cdc\).docx](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/immunization/vpd_surveillance/lab_networks/measles_rubella/manual/updated-annexes-(as-on-2-aug-2021)/annex-c1-measles-genotyping-rt-pcr-(cdc).docx).
16. Mulders MN. Annex C15 Using the RECall program for on-line sequence analysis of measles and rubella. [online]. 2024; [cited 2025 Jan 27]; [6 screens]. Available from: URL: https://www.technet-21.org/media/com_resources/trl/7641/multi_upload/UsingtheRECallprogram_V6.pdf.
17. MEGA-Help. Phylogenetic tree MEGA12. [online]. 2025; [cited 2025 Jan 29]; [21 screens]. Available from: URL: https://www.megasoftware.net/web_help.
18. MeaNS2. Measles virus nucleotide surveillance. [online]. 2025; [cited 2025 Jan 28]. Available from: URL: <https://who-gmrln.org/means2>.
19. Wacharachaisurapol N, Jantarabenjakul W, Jitrungruengnij N, Anugulruengkitt S, Puthanakit T, Kowitdamrong E, et al. Re-emergence of measles genotype D8 among Thai children, 2016–2017. [online]. 2025; [cited 2025 Mar 6]. Available from: URL: https://docs.google.com/viewer?srcid=1V3bd8as_7EKYrmYZi_L2l1cUbrgGNaeW&pid=explorer&efh=false&a=v&chrome=false&embedded=true.
20. Chapter 7. Molecular epidemiology of measles and rubella. In: Mulders M. Manual for the laboratory-based surveillance of measles, rubella, and congenital rubella syndrome. 3rd ed. [online]. 2018; [cited 2025 Feb 22]. Available from: URL: <https://www.technet-21.org/en/manual-introduction>.
21. Mat Daud MRH, Yaacob NA, Ibrahim MI, Wan Muhammad WAR. Five-year trend of measles and its associated factors in Pahang, Malaysia: a population-based study. Int J Environ Res Public Health 2022; 19(13): 8017. (10 pages).
22. Vaidya SR, Chowdhury DT. Measles Virus genotype circulating in India, 2011–2015. J Med Virol 2017; 89(5): 753–8.
23. Bankamp B, Liu C, Rivallier P, Bera J, Shrivastava S, Kirkness EF, et al. Wild-type measles viruses with non-standard genome lengths. PloS One 2014; 9(4): e95470. (8 pages).

First Identification of Novel Distinct Sequence Identifiers in Measles Virus Genotype D8 During the 2024 Outbreak in Southern Thailand

Atchariya Lukebua¹, Kannikar Kwanchum¹, Narawan Punngam¹,
Prasopchai Aramrungraj¹, Duanpen Chuapudee¹, Thanapol Preamkamom¹,
Sutatip Treepolauksorn², Pawinee Doung-ngern³, Chatmongkon Sompan³,
and Pilailuk Akkapaiboon Okada¹

¹National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

²Regional Medical Sciences Center 12 Songkhla, Department of Medical Sciences, Muang District, Songkhla 90100, Thailand

³Division Of Epidemiology, Department of Diseases Control, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT In this study, genetic analysis of the measles virus genotypes was based on nucleotide sequences of the nucleoprotein (N) gene and phylogenetic analysis in 428 samples from measles outbreaks in Songkhla, Yala, Pattani, and Narathiwat provinces, Thailand, in 2024. When compared with the World Health Organization (WHO) reference nucleotide sequences of 24 measles virus genotypes, the identified sequences belonged to genotype D8. However, these sequences were classified into 20 Distinct Sequence Identifiers (DSIDs), indicating variations in the nucleotide sequences within the D8 genotype. The 20 DSIDs identified in this study were DSId8581, 8717, 8775, 8813, 8830, 8851, 8913, 8914, 8971, 9106, 9107, 9108, 9134, 9143, 9144, 9165, 9167, 9202, 9203, and 9204. All of these DSIDs were detected for the first time in Thailand. Notably, 19 DSIDs were newly reported in the WHO Measles Surveillance Nucleotide Database (MeaNS2), except for DSId8581, which had been previously reported in Malaysia. However, this study was unable to determine the origin of the virus due to insufficient epidemiological data.

Keywords: Measles, Measles genotype, Measles in the Southern of Thailand

การศึกษาการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของแอนติเจน *Mycobacterium tuberculosis* ชนิด Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion ในหนูทดลอง

ปนัดดา เทพอัศร อภิชัย ประชาสุภาพ ญัฐธัญ ภิญโญสุชี รัตนาวดี วิชาจารย์ ณรัตน์ชา ศรีเพ็ชร
รุจิราพร พิทักษ์สาลิ อณิชา เลื่องชัยเขวง ศชาภรณ์ เมฆขยาย นลินี แสงทอง สมปอง ทรัพย์สุทธิภาสน์
และ ภาณุพันธ์ ปัญญาใจ

สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพญาไท 11000

บทคัดย่อ วัณโรคยังคงเป็นมหาโรคภัยที่สำคัญของโลก โดยมีวัคซินบีซีจี (Bacillus Calmette-Guérin) เป็นวัคซินป้องกันวัณโรคชนิดเดียว ซึ่งสามารถป้องกันวัณโรคชนิดรุนแรงในเด็กแต่พบว่ามีประสิทธิภาพลดลงในผู้ใหญ่ การวิจัยและพัฒนาวัคซินวัณโรคชนิดใหม่ๆ จึงมีความสำคัญเพื่อการยุติวัณโรค การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของแอนติเจนชนิดรีคอมบิแนนท์ของ *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) ในหนูทดลอง จำนวน 3 ชนิด 4 รูปแบบ ประกอบด้วย Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion ซึ่งมีรายงานว่าแอนติเจนทั้งในระยะติดเชื้อและระยะแฝง เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการออกแบบและพัฒนาวัคซินชนิด mRNA โดยการสร้างและผลิตโปรตีนแอนติเจนรีคอมบิแนนท์ใน *Escherichia coli* สายพันธุ์ ClearColi™ BL21 (DE3) และนำไปฉีดในหนูทดลองสายพันธุ์ C57BL/6 จากนั้นทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิด humoral immune response โดยวิธี Western blot และ ELISA และทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิด cellular immune response โดยการตรวจ cytokine ได้แก่ IFN- γ , IL-2 และ TNF- α ด้วยวิธี Multiplex assay โดยการกระตุ้นซ้ำแบบ *ex vivo* จากการศึกษาพบว่า Ag85B, ESAT-6 และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion มีความสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิด humoral immune response และ cellular immune response ส่วน Rv2660c ซึ่งเป็นแอนติเจนที่พบในระยะแฝงมีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันเฉพาะชนิด cellular immune response ดังนั้นแอนติเจนทั้ง 3 ชนิด จึงมีความเหมาะสมในการนำไปพัฒนาเป็นวัคซินต่อไป

คำสำคัญ: Ag85B, ESAT-6, Rv2660c, การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในหนู

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

Received: 20 March 2025

Revised: 25 March 2025

Accepted: 28 March 2025

บทนำ

วัณโรค หรือ tuberculosis (TB) เป็นโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจาก *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) ซึ่งเมื่อมีการติดเชื้อ Mtb สามารถแฝงอยู่ในร่างกายของมนุษย์โดยไม่แสดงอาการหรือเป็นวัณโรคระยะแฝง ซึ่งจะมีเพียงร้อยละ 5-10 ที่มีการดำเนินของโรคไปเป็นวัณโรคระยะแสดงอาการ (active TB) เนื่องจากร่างกายของผู้ติดเชื้อมีภูมิคุ้มกันต่ำลง ทำให้ไม่สามารถควบคุมการเพิ่มจำนวนของเชื้อได้ ส่งผลให้เชื้อลุกลามไปยังอวัยวะอื่นผ่านทางระบบน้ำเหลือง และมีการเจ็บป่วยตามมา⁽¹⁾

วัคซีน Bacillus Calmette-Guérin (BCG) เป็นวัคซีนวัณโรคเพียงชนิดเดียวที่ใช้ในปัจจุบันตั้งแต่ปี ค.ศ. 1921 ซึ่งเป็นวัคซีนเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ (live attenuated vaccine) ผลิตจากเชื้อ *Mycobacterium bovis* โดยสามารถป้องกันวัณโรคชนิดรุนแรงในเด็ก แต่ประสิทธิภาพในการป้องกันวัณโรคจะลดลงในผู้ใหญ่⁽²⁾ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการพัฒนาวัคซีนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพให้สูงขึ้นกว่าเดิม โดยเฉพาะประเทศไทย ซึ่งมีปัญหาการแพร่ระบาดของวัณโรคสูงเป็นอันดับต้นของโลก ซึ่งสอดคล้องกับแผนยุทธศาสตร์ในการยุติวัณโรค เรื่อง การส่งเสริมการวิจัยและพัฒนานวัตกรรม การป้องกัน ดูแลรักษา และควบคุมวัณโรค โดยแนวนโยบายในการพัฒนาวัคซีนวัณโรคในปัจจุบันมีการใช้แอนติเจนมากกว่า 1 ชนิด มาพัฒนาวัคซีนในรูปแบบต่างๆ อาทิ วัคซีนเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ (live attenuated vaccine), วัคซีนเชื้อตาย, viral vector vaccine, protein subunit และ DNA vaccine โดยผลการศึกษาพบว่าวัคซีนสามารถกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลอง และมีชนิด subunit ที่อยู่ระหว่างการทดสอบในมนุษย์⁽³⁾

จากองค์ความรู้ในปัจจุบันทำให้ทราบถึงการดำเนินของโรคในแต่ละระยะ ซึ่งเชื่อจะมีการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของ host ที่แตกต่างกัน ทำให้ปัจจุบันแนวนโยบายการพัฒนาวัคซีนวัณโรคจะมีการออกแบบวัคซีนที่ประกอบด้วยแอนติเจนที่แสดงออกในระยะต้นของการติดเชื้อและระยะแฝง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันในการป้องกันวัณโรคในทุกระยะ คณะผู้วิจัยจึงมีเป้าหมายในการออกแบบวัคซีน

ป้องกันวัณโรคในรูปแบบวัคซีน mRNA โดยใช้แอนติเจน Ag85B (Rv1886c หรือ Mycolyl transferase 85B) ซึ่งเป็นแอนติเจนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างผนังเซลล์ โดยจะทำหน้าที่เชื่อม mycolic acid กับ arabinogalactan ของผนังเซลล์ Mtb⁽⁴⁾ โดย Ag85B จะแสดงออกในระยะเริ่มต้นของการติดเชื้อและจะลดลงเมื่อเวลาผ่านไป Ag85B กระตุ้นได้ทั้ง humoral และ cell-mediated immune response ได้ทั้งในผู้ป่วยวัณโรคระยะแสดงอาการและระยะแฝง⁽⁵⁾ แอนติเจน ESAT-6 (Rv3875 หรือ Early Secreted Antigenic Target 6 kDa) ผลิตจากเชื้อ Mtb และหลั่งออกมานอกเซลล์ มีความสามารถในการกระตุ้น T-cell โดยการจับกับ TLR-2 receptor แล้วยับยั้ง Downstream Signal Transduction⁽⁶⁾ และมีการศึกษาว่าการยับยั้งโปรตีน ESAT-6 จะลดความรุนแรงของเชื้อ Mtb และกระตุ้นการหลั่ง IL-8 ของ epithelial cells บริเวณปอด ซึ่งเป็นแอนติเจนในไม่กี่ชนิดที่ Mtb แสดงออกอย่างต่อเนื่องในปริมาณที่สูงทุกระยะของการติดเชื้อ ดังนั้นจึงเป็นเป้าหมายในการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยและวัคซีนป้องกันวัณโรค⁽⁷⁾ นอกจากนี้ยังมีรายงานที่พบว่าแอนติเจน Rv2660c ซึ่งเป็นโปรตีนแอนติเจนที่พบได้มากในระยะแฝง ทำหน้าที่กระตุ้น human macrophage ให้สร้าง Pro-inflammatory cytokine ผ่าน TLR-2 signal โดยมีการศึกษาพบว่า Rv2660c สามารถกระตุ้นการสร้าง IFN- γ ในผู้ติดเชื้อระยะแฝงได้สูงกว่าผู้ติดเชื้อระยะแสดงอาการ ซึ่งมีความเป็นไปได้ในการนำมาพัฒนา Post-exposure TB vaccine⁽⁸⁾ โดยการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาวัคซีน H56:IC31 ซึ่งเป็นชนิด subunit vaccine ที่ประกอบด้วยแอนติเจน 3 ชนิดดังกล่าว และมีการศึกษาในระดับ clinical phase โดยใช้ IC31 เป็น adjuvant ผลการศึกษาพบว่าวัคซีนมีความปลอดภัย และสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดี ซึ่งวัคซีนชนิดนี้มีการศึกษาถึงระยะ clinical phase 2b⁽⁹⁾

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของแอนติเจน Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c รูปแบบ fusion protein เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการออกแบบและพัฒนาวัคซีนป้องกันวัณโรครูปแบบ mRNA ต่อไป

วัสดุและวิธีการ

การเตรียมแอนติเจน Mtb ในรูปแบบโปรตีนลูกผสมจากเซลล์ *Escherichia coli*

เตรียม Mtb antigen จำนวน 4 รูปแบบ ได้แก่ Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c รูปแบบ fusion protein โดยออกแบบและสังเคราะห์ยีนของเชื้อ Mtb ได้แก่ *Ag85B*, *ESAT-6*, *Rv2660c* และ *Ag85B-ESAT-6-Rv2660c* โดยยีน *Ag85B* และ *Rv2660c* สังเคราะห์ส่วน FLAG tag sequences เชื่อมต่อกับปลายด้าน 5' ส่วนยีน *Ag85B-ESAT-6-Rv2660c* สังเคราะห์ส่วน FLAG tag sequences เชื่อมต่อกับปลายด้าน 3' ในขณะที่ยีน *ESAT-6* ใช้ส่วน 6xHis tag sequence ที่อยู่บนพาหะพลาสมิด จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณยีนที่สังเคราะห์ขึ้นด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้เอนไซม์ Q5 DNA polymerase (New England Biolabs, USA) แล้วนำยีนที่ได้เชื่อมต่อกับพลาสมิด pET21a(+) (Merck Millipore, USA) ด้วยเอนไซม์ ligase (Promega, USA) ในตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *XhoI* จากนั้น transform เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ TG1 แล้วนำโคลนลูกผสมมาสกัดพลาสมิดและตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่แทรกอยู่ในพลาสมิดด้วย BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) ก่อนนำไป transform เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ ClearColi™ BL21 (DE3) (Biosearch Technologies, USA) เพื่อผลิตโปรตีนลูกผสม โดยเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตโปรตีนด้วย Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (Thermo Scientific, Italy) โดยใช้อุณหภูมิและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม⁽¹⁰⁾ ดังนี้ สำหรับรีคอมบิแนนท์โคลน Ag85B เติม 0.04 mM IPTG เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง รีคอมบิแนนท์โคลน ESAT-6 และ Rv2660c เติม 0.4 mM IPTG เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และรีคอมบิแนนท์โคลน Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion เติม 0.4 mM IPTG เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค affinity chromatography สำหรับโปรตีน Ag85B, Rv2660c

และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion protein ใช้ Anti-FLAG affinity column chromatography (Millipore, USA)⁽¹¹⁾ โปรตีน ESAT-6 ใช้ Anti-His affinity column chromatography (Novagen, USA)⁽¹²⁾ แล้ว dialyze ให้อยู่ในสารละลาย PBS pH 7.4 นำไปวิเคราะห์ปริมาณ endotoxin โดยใช้ชุดน้ำยา Pierce™ Chromogenic Endotoxin Quant Kit (Thermo Scientific, USA)⁽¹³⁾ ก่อนนำไปฉีดทดสอบกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูทดลองต่อไป

การศึกษาการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของแอนติเจน Mtb ในรูปแบบโปรตีนลูกผสมในสัตว์ทดลอง

ทำการฉีดกระตุ้นหนูทดลองสายพันธุ์ C57BL/6 เพศเมีย อายุ 6-8 สัปดาห์ (Nomura Siam International Co., Ltd, Thailand) โดยแบ่งเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว ได้แก่ กลุ่มที่ฉีดด้วยแอนติเจนชนิดต่าง ๆ 4 กลุ่ม ได้แก่ Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion และกลุ่มควบคุมผลลบ (negative control) ซึ่งฉีดด้วยสารละลาย PBS (Cytiva, USA) ปริมาณ 5 ไมโครกรัม/dose ใช้ Aluminum hydroxide (OZBiosciences, USA) ปริมาณ 0.1 มิลลิกรัม เป็น adjuvant โดยฉีดส่วนผสมปริมาตร 50 ไมโครลิตร/dose เข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous) ของหนูจำนวน 2 ครั้ง ระยะเวลาห่างกัน 4 สัปดาห์ ทำการเจาะเก็บเลือด จำนวน 3 ครั้ง โดยเจาะเลือดจากข้างแก้มหนู จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 0.2 มิลลิลิตร ที่เวลาก่อนฉีดครั้งที่ 1 และก่อนฉีดกระตุ้นครั้งที่ 2 และเมื่อสิ้นสุดการทดลองหลังฉีดกระตุ้นครบ 4 สัปดาห์ ทำการ Euthanasia หนู ด้วยยาสลบ Isofurane (Attane, USA) เก็บเลือดจากหัวใจ จำนวน 1 ครั้ง ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และเก็บม้าม นำเลือดไปปั่นแยกซีรัมเพื่อใช้ทดสอบการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบ humoral immune response และนำม้ามไปทดสอบการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบ cell mediated immune response

จริยธรรมการวิจัยในสัตว์

การศึกษาวิจัยในสัตว์ทดลองนี้ผ่านการพิจารณาจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ เลขที่ 012/2023 ลงวันที่ 21 กุมภาพันธ์ 2567 และ

ผ่านการพิจารณาความปลอดภัยทางชีวภาพ
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ตามหนังสือรับรองเลขที่
030/2567 ลงวันที่ 19 เมษายน พ.ศ. 2567

การทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ **humoral immune response** โดยวิธี **Western blot**

เพื่อศึกษาความจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัม
หนูที่ได้รับการฉีดกระตุ้นต่อโปรตีนแอนติเจน Ag85B,
ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c
fusion โดยวิธี Western blot เริ่มต้นด้วยการเตรียม
โปรตีนที่บริสุทธิ์ในปริมาณ 3-5 ไมโครกรัม และ
เตรียม Polyacrylamide gel ที่ความเข้มข้น 12-15%
ทำการแยกโปรตีนตามน้ำหนักโมเลกุลด้วย Sodium
dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
(SDS-PAGE) ด้วยเครื่องแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า
(Bio-Rad, USA) จากนั้นทำการย้ายโปรตีนจาก gel
ไปยังแผ่น PVDF membrane (Bio-Rad, USA)
โดยใช้ระบบการถ่ายโอนด้วยกระแสไฟฟ้า (transfer)
ด้วยเครื่อง Mini Trans-Blot cell (Bio-Rad, USA)
จากนั้นทำการ block membrane ด้วยสารละลาย 5.0%
skim milk (Millipore, USA) ในบัฟเฟอร์ TBST
(Tris buffer saline pH 7.2, 0.05% Tween-20)
โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือที่ 4 องศา-
เซลเซียส นานข้ามคืน เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการจับแบบ
ไม่จำเพาะ จากนั้นเติมซีรัมของหนูที่เจือจางในสารละลาย
1.0% skim milk ในบัฟเฟอร์ TBST ในอัตราส่วน
1:100 นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องโดยเขย่าเบาๆ เป็นเวลา
1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการล้าง membrane ด้วย
สารละลาย TBST จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 2 นาที แล้วล้าง
อีกครั้งด้วยสารละลาย TBS (Tris buffer saline pH 7.2)
เพื่อกำจัดซีรัมที่ไม่ได้จับกับโปรตีนบน membrane
จากนั้นเติม goat anti-mouse-HRP (Dako, USA)
ที่เจือจางใน TBST ในอัตราส่วน 1:1,000 และบ่มที่
อุณหภูมิห้องโดยเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้าง
membrane จำนวน 5 ครั้ง แล้วจึงเติมสารละลาย
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) substrate
(SeraCare, USA) ลงไปบน membrane เพื่อทำให้
เกิดสีบนแถบโปรตีนและอ่านผลด้วยตาเปล่า

การทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ **humoral immune response** โดยวิธี **Enzyme- linked immunosorbent assay (ELISA)**

เพื่อศึกษาผลการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะในซีรัม
หนูที่ได้รับการฉีดกระตุ้นต่อโปรตีนแอนติเจน Ag85B,
ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c
fusion โดยวิธี ELISA เริ่มต้นด้วยการเคลือบเพลท
ELISA strip (Thermo Scientific, Denmark)
ด้วยโปรตีนชนิดใดชนิดหนึ่ง ดังนี้ Ag85B, ESAT-6,
Rv2660c หรือ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion
ในปริมาณ 0.5 ไมโครกรัมต่อหลุม บ่มเพลทที่อุณหภูมิ
4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน ทำการ block เพลทด้วย
สารละลาย 5.0% skim milk ในสารละลาย PBST บ่ม
ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างเพลทด้วย
PBST จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติมตัวอย่างซีรัมที่เจือจางใน
สารละลาย 1.0% skim milk ในอัตราส่วน 1:100 ปริมาตร
50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
ล้างเพลทด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง เติม Rabbit
anti mouse (DAKO, USA) ในอัตราส่วน 1:10,000
ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง
เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเพลทด้วย PBST จำนวน 4 ครั้ง
จากนั้นเติม TMB substrate (Thermo Fisher
Scientific, USA) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่
อุณหภูมิห้องในที่มืดไม่โดนแสง เป็นเวลา 30 นาที แล้วหยุด
ปฏิกิริยาด้วย 2.0 M sulfuric acid (Merck, Germany)
ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง
ด้วยเครื่อง Absorbance Microplate Reader
Sunrise (TECAN, Switzerland) ที่ความยาวคลื่น
450/630 นาโนเมตร วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม
GraphPad Prism V.9 (GraphPad, USA) โดย
การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม โดยใช้สถิติ
Two-Way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่าง
ระหว่างคู่ด้วยวิธี Bonferroni⁽¹⁴⁾

การกระตุ้นเซลล์ม้ามเพื่อทดสอบการตอบสนองทาง ภูมิคุ้มกันแบบ **cellular immune response**

นำม้ามของหนูแต่ละตัวที่อยู่ในสารละลาย PBS
เทลงใน cell-strainer ขนาด 70 ไมครอน (SPL Life
Sciences, Korea) กรองลง petri dish (Greiner

Bio-One, Thailand) และบดม้ามด้วย syringe plunger (Terumo, Japan) จากนั้นนำเซลล์ใน petri dish ที่ได้ไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 700× g เวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำ cell pellet มาทำให้เม็ดเลือดแดงแตก โดยใช้ ACK Lysis Buffer (Invitrogen, USA) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที โดยเขย่าเบาๆ เป็นระยะ จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม Complete RPMI Medium (Gibco, USA) ที่มี 10% Fetal Bovine Serum, FBS (Gibco, USA) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 700× g เวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วล้างเซลล์ splenocyte ที่ได้ด้วย Complete RPMI Medium อีก 1 ครั้ง ละลายเซลล์ด้วย 5 มิลลิลิตร Complete RPMI Medium นับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Zeiss, Germany) จากนั้นกระตุ้นเซลล์ splenocyte ที่ได้ด้วยสารกระตุ้นชนิดต่างๆ โดยกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Ag85B, ESAT-6 และ RV2660c กระตุ้นเซลล์ด้วย 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร Ag85B (Abcam, United Kingdom), ESAT-6 (Abcam, United Kingdom) และ Rv2660c ที่ผลิตขึ้นเอง ตามลำดับ ส่วนกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion กระตุ้นเซลล์ด้วยโปรตีนทั้งสามชนิดพร้อมกันได้แก่ Ag85B, ESAT-6 และ Rv2660c ที่ความเข้มข้นแต่ละชนิด 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีกลุ่มที่ฉีดด้วย PBS เป็นกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ในแต่ละกลุ่มที่ฉีดแอนติเจนมี negative control ที่ไม่กระตุ้นเซลล์ด้วยโปรตีนใดๆ ในหลอดทดลอง (unstimulated) และ positive control ที่กระตุ้นเซลล์ด้วย 25 นาโนกรัม/มิลลิลิตร Phorbol myristate acetate, PMA (Sigma-Aldrich, USA) ร่วมกับ 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร Ionomycin (Sigma-Aldrich, USA) และทุกการทดลองเติม co-stimulator ได้แก่ 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร anti-CD28 antibody (Biolegend, Canada) และ 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร anti-CD49 antibody (Biolegend, Canada) เติม 5×10^5 splenocyte ใน complete RPMI medium ที่มี 10% FBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม 96-well plate (Thermo Scientific, Denmark) ผสมกับสารกระตุ้นปริมาณ 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มเพลทที่อุณหภูมิ 37 องศา-

เซลเซียส 5% CO₂ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นเติม Brefeldin A solution, BFA (Biolegend, Canada) ที่เจือจาง 1:10 ปริมาตร 2 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วบ่มเพลทต่ออีก 4 ชั่วโมง เพื่อหยุดการหลั่งของ cytokine ออกนอกเซลล์ ปั่นตกตะกอนที่ 500x g เวลา 5 นาที นำส่วนของ supernatant ไปทดสอบหาปริมาณ cytokine ที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ด้วยเทคนิค multiplex assay

การวิเคราะห์ปริมาณ cytokine: IFN- γ , IL-2 และ TNF- α โดยวิธี Multiplex assay

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณ cytokine ที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ โดยนำน้ำเลี้ยงเซลล์ splenocyte หลังการกระตุ้นมาทดสอบโดยใช้ชุดน้ำยา MILLIPLEX® Mouse High Sensitivity T Cell Magnetic Bead Panel 96-Well Plate Assay (Millipore, USA) โดยเตรียมสารมาตรฐาน ได้แก่ interferon gamma (IFN- γ) และ tumor necrosis factor- α (TNF- α) ให้มีความเข้มข้น 0-2,000 พิโคกรัม/มิลลิลิตร และ interleukin-2 (IL-2) ให้มีความเข้มข้น 0-4,000 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ใน Assay Buffer ของชุดน้ำยาข้างต้น จากนั้นเตรียมเพลท 96 หลุมโดยเติม Wash Buffer ของชุดน้ำยา ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่ต้องการทดสอบ เขย่าเพลท เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงเท Wash Buffer ออก เติมหาสารมาตรฐาน 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่กำหนด จากนั้นเติม Assay Buffer 25 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดสอบตัวอย่าง และเติมตัวอย่าง 25 ไมโครลิตร ลงในหลุมเดียวกัน เขย่าขวด Magnetic Bead เพื่อป้องกันการตกตะกอน แล้วเติม Magnetic Bead ของชุดน้ำยาที่ติดฉลากด้วย Anti-mouse antiserum ชนิดต่างๆ ได้แก่ anti-IFN- γ , anti-IL-2 และ anti-TNF- α เติมโดยไม่เจือจาง ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม ปิดเพลทด้วยแผ่นฟิล์ม (plate sealer) จากนั้นห่อเพลทด้วยแผ่นฟอยล์เพื่อป้องกันแสง และนำเพลทไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน หรือ 16-18 ชั่วโมง ล้างเพลทด้วย Wash Buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง แล้วเติม Detection Antibody ของชุดน้ำยา ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม ปิดเพลท

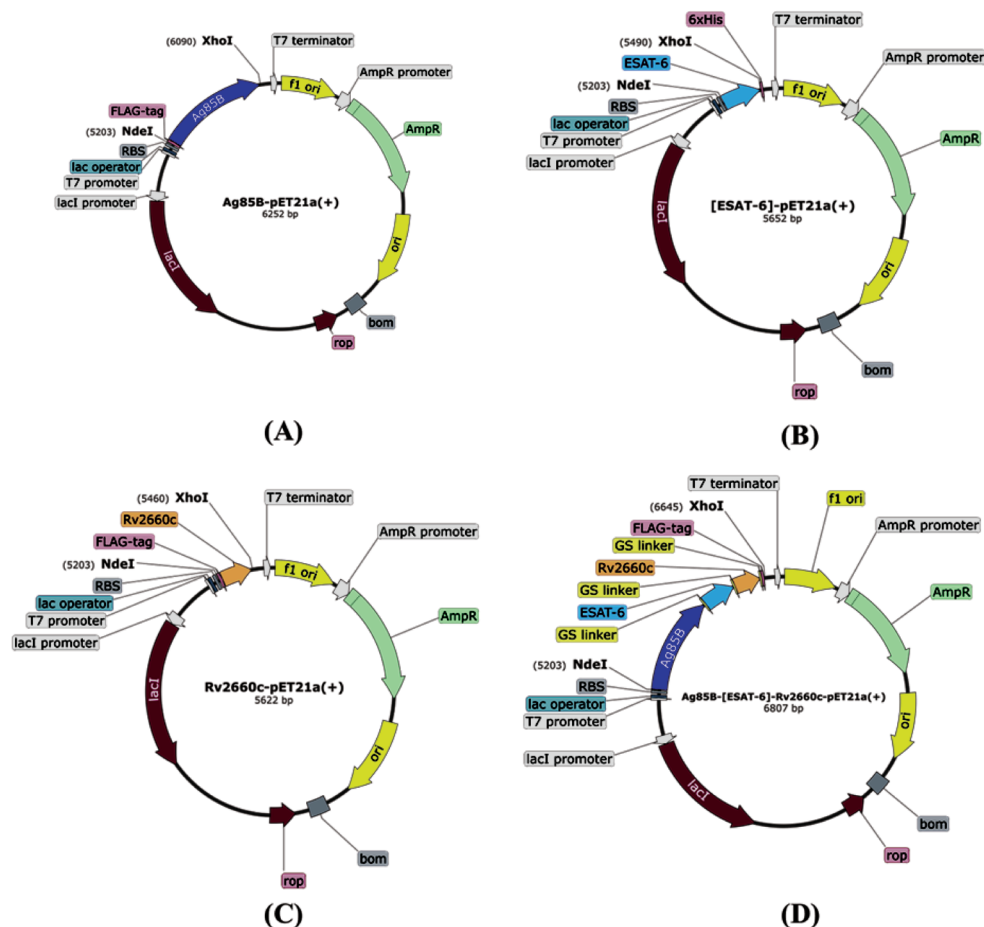
ด้วยแผ่นฟิล์ม และท่อเพลทด้วยแผ่นฟอยล์ เชยาเพลท
ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม Streptavidin-
Phycoerythrin ของชุดน้ำยา ปริมาตร 25 ไมโครลิตร
ปิดเพลทด้วยแผ่นฟิล์ม และท่อเพลทด้วยแผ่นฟอยล์
นำเพลทไปบ่มบนเครื่องเชยา ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา
30 นาที เมื่อครบเวลาดึงเพลทด้วย Wash Buffer จำนวน
3 ครั้ง จากนั้นเติม Sheath Fluid PLUS ของชุดน้ำยา
ลงในแต่ละหลุม ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ทำการเชยา
เพลท เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง
xMAP® INTELLIFLEX System (Thermo Fisher
Scientific, USA) โดยใช้โปรแกรม Belysa® Immuno-
assay curve fitting V.1.2.2 (Merck, Germany)
จากนั้นนำผลที่อ่านได้มาวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม

GraphPad Prism V.9 โดยการเปรียบเทียบความ
แตกต่างระหว่าง 2 กลุ่ม ด้วย Mann-Whitney Test

ผล

การเตรียมแอนติเจน Ag85B, ESAT-6, Rv2660c
และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion จากเซลล์
E. coli

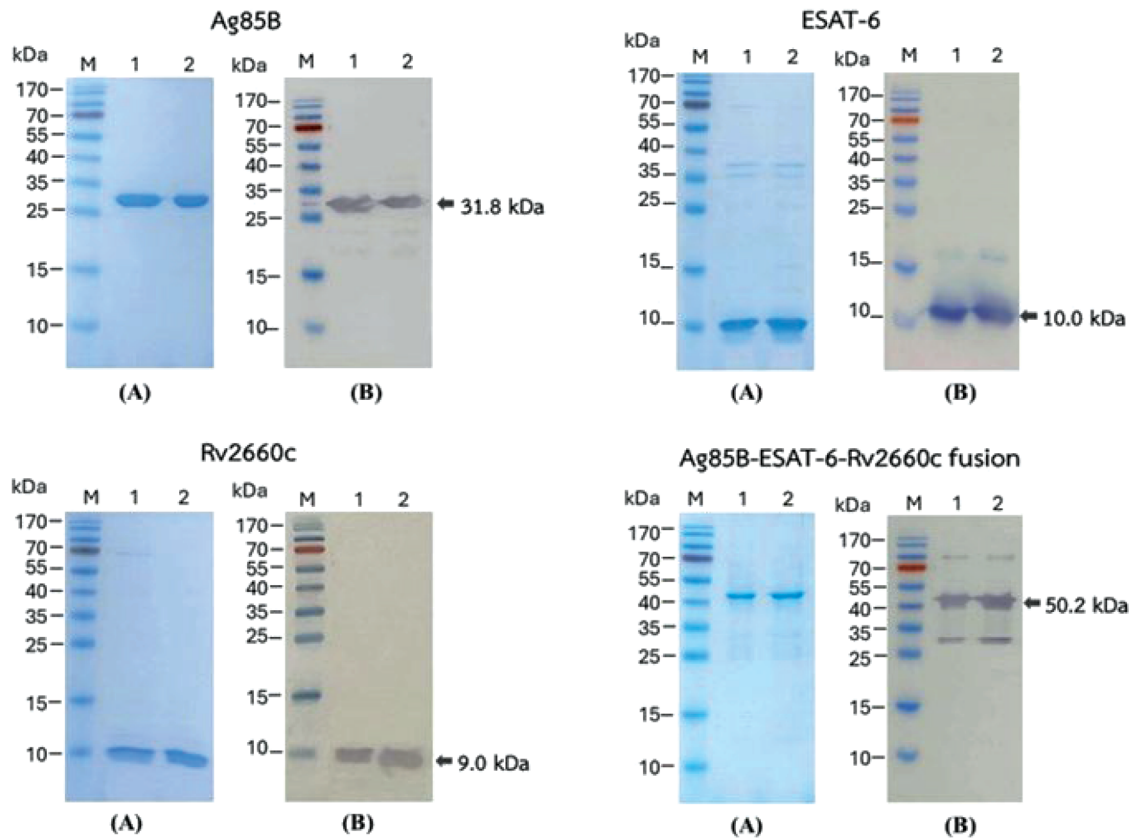
การโคลนยีน *Ag85B*, *Rv2660c* และ *Ag85B-ESAT-6-Rv2660c* เข้าสู่พลาสมิด pET21a(+) ซึ่งเติม
ส่วน FLAG tag sequences ส่วนยีน *ESAT-6* ถูกโคลน
เข้าสู่พลาสมิด pET21a(+) ซึ่งเติมส่วน ของ 6xHis tag
sequence สำหรับใช้ในการติดตามการแสดงออกและ
แยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แผนภาพของพาหะพลาสมิด ที่บรรจุชิ้นส่วนยีนที่ใช้ในการสร้างโปรตีนแอนติเจนของเชื้อ Mtb โดยการโคลน
เข้าพาหะที่ตำแหน่งการตัดจำเพาะ *NdeI* และ *XhoI* ตามลำดับ โดย (A) การโคลนยีน *Ag85B*,
(B) การโคลนยีน *ESAT-6*, (C) การโคลนยีน *Rv2660c* และ (D) การโคลนยีน *Ag85B-ESAT-6-
Rv2660c* เข้าสู่ pET21a(+) ตามลำดับ

เมื่อนำโปรตีนที่ได้มาทำการวิเคราะห์ขนาดและความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE และวิธี Western blot analysis พบแถบของโปรตีนที่ขนาดเดียวกันประมาณ 31.8, 10.0, 9.0, 50.2 kDa ของโปรตีน Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-

ESAT-6-Rv2660c fusion ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับขนาดโมเลกุลจากการคำนวณด้วยลำดับกรดอะมิโนดังแสดงในภาพที่ 2 และจากการตรวจหาปริมาณ Endotoxin ในโปรตีนตัวอย่างภายหลังการทำให้บริสุทธิ์พบว่ามีความอยู่ระหว่าง 0.01184-0.02604 EU/ μ g



ภาพที่ 2 การตรวจสอบความบริสุทธิ์และความจำเพาะของ Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion (A) SDS-PAGE และย้อมด้วย Coomassie G-250 (B) Western blot analysis โดยโปรตีน Ag85B, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion ใช้ anti-FLAG polyclonal antibody และโปรตีน ESAT-6 ใช้ anti-6xHis monoclonal antibody ในการตรวจสอบ โดย M: protein marker, 1-2: โปรตีนที่เตรียมได้ lot 1 และ 2 ตามลำดับ

การตรวจหาแอนติบอดีจากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ humoral immune response ด้วยวิธี Western blot

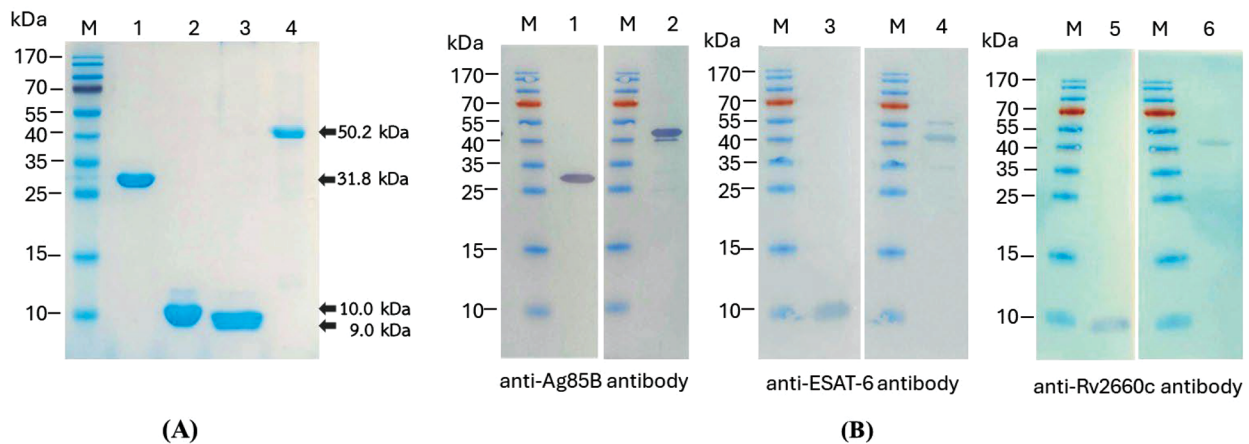
จากการตรวจสอบความจำเพาะของโปรตีน Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion ที่นำมาใช้ในการฉีดกระตุ้น โดยใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะ ได้แก่ anti-ag85B rabbit polyclonal antibody (Abcam, UK), anti-ESAT-6 mouse monoclonal antibody (Alpha Diagnostic,

USA) และ anti-Rv2660c rabbit polyclonal antibody (GenScript, Republic of Korea) พบว่าแอนติบอดีดังกล่าวสามารถจับจำเพาะกับโปรตีนทั้งรูปแบบเดี่ยวและรูปแบบ fusion ได้โดยมีขนาดสอดคล้องกับแถบโปรตีนที่ย้อมด้วย Coomassie ดังแสดงในภาพที่ 3

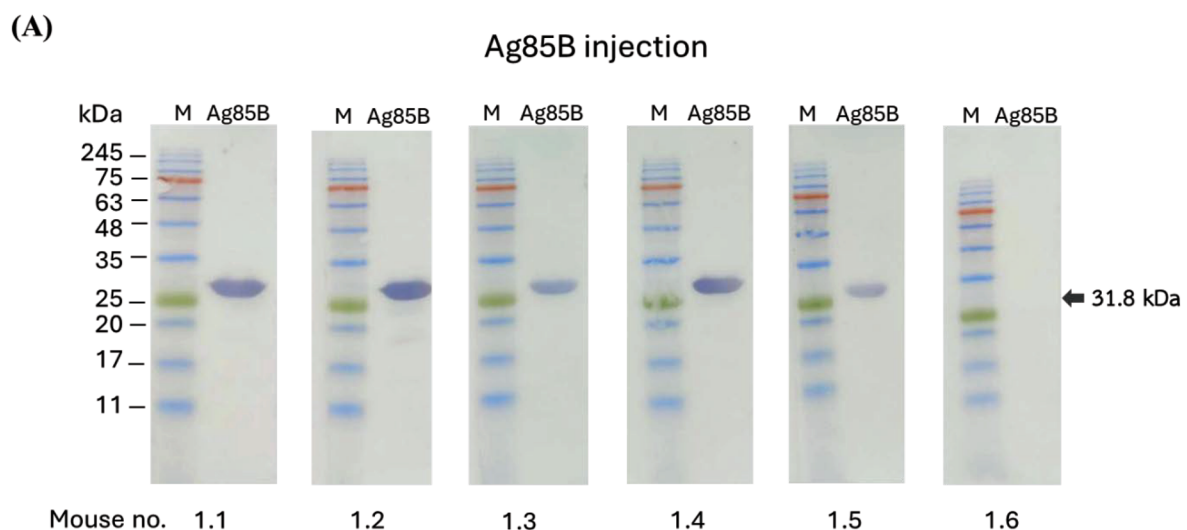
และจากการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของแอนติบอดีในซีรัมหนูกลุ่มต่างๆ ด้วยวิธี Western blot โดยนำซีรัมหลังฉีดเข็มที่ 2 ที่ 28 วัน เจือจางในอัตราส่วน

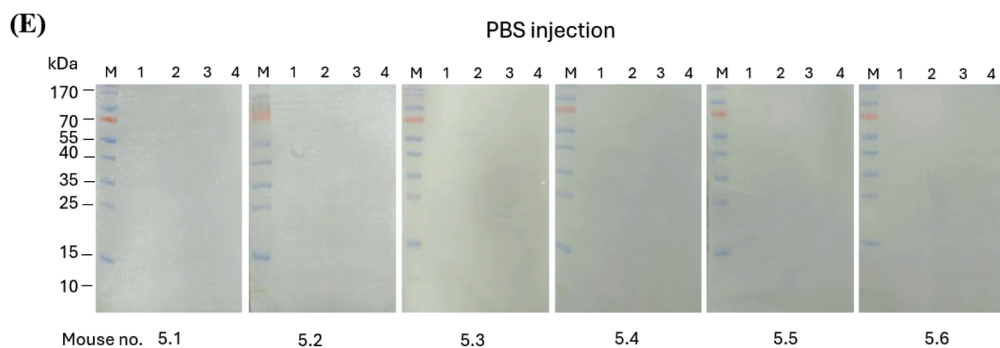
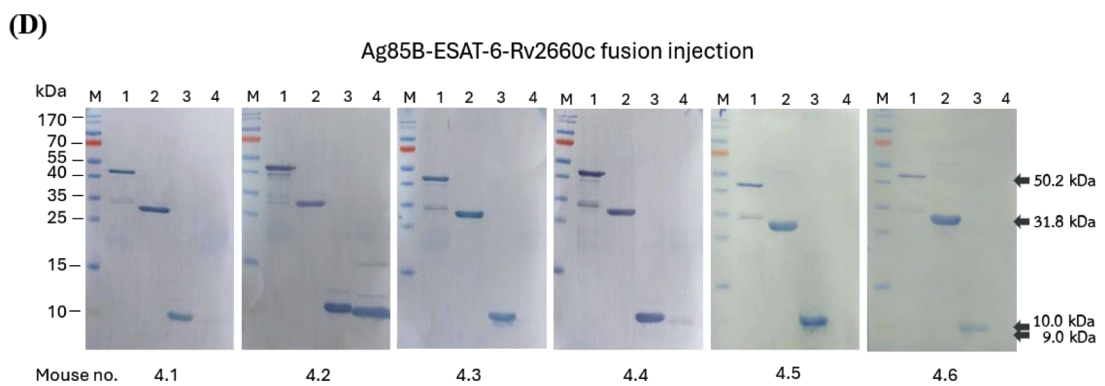
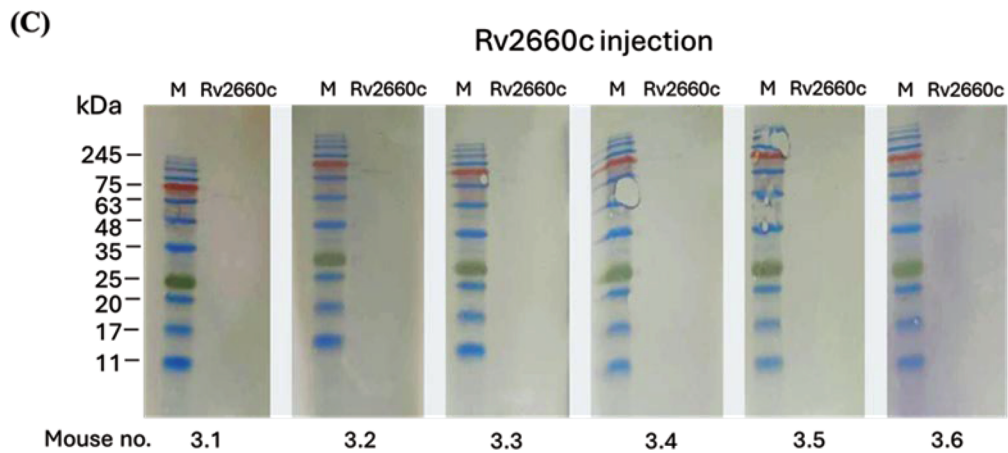
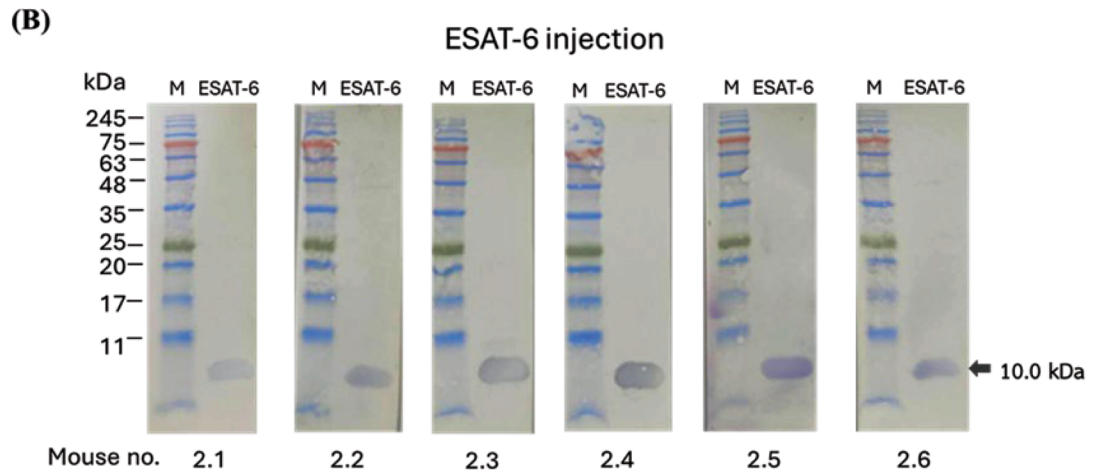
1:100 พบว่าหนูกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Ag85B จำนวน 5 ใน 6 ตัว และหนูกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน ESAT-6 ทุกตัว มีการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน Ag85B และ ESAT-6 ตามลำดับ แต่ไม่พบการจับจำเพาะของ แอนติบอดีในซีรัมของหนูกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Rv2660c สำหรับหนูกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion เมื่อนำมาทดสอบการจับจำเพาะต่อ โปรตีนทั้ง 4 ชนิด โดยพบว่าแอนติบอดีในซีรัมของหนู

กลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion สามารถจับจำเพาะได้กับโปรตีน Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion, Ag85B และ ESAT-6 ได้ทั้งหมด แต่พบว่ามีเพียงซีรัมจากหนูตัวที่ 2 และ 4 ที่สามารถจับกับโปรตีน Rv2660c ได้ และไม่พบการจับจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัมของหนูทุกตัวในกลุ่มที่ฉีดด้วย PBS ต่อโปรตีนทุกชนิด ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 3 (A) SDS-PAGE แสดงขนาดและความบริสุทธิ์ของโปรตีน Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion ใน lane ที่ 1-4 ตามลำดับ (B) ผล Western blot แสดงการจับจำเพาะของแอนติบอดี anti-Ag85B rabbit polyclonal antibody, anti-ESAT-6 mouse monoclonal antibody และ anti-Rv2660c rabbit polyclonal antibody ใน lane ที่ 1, 3 และ 5 ตามลำดับ และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion ใน lane ที่ 2, 4 และ 6 ตามลำดับ โดย M: protein marker





ภาพที่ 4 Western blot แสดงการจับจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัมของหนูกับโปรตีนที่ใช้ในการฉีดกระตุ้น (A) กลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Ag85B (B) กลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน ESAT-6 (C) กลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Rv2660c (D) กลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion ต่อโปรตีน Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion, Ag85B, ESAT-6 และ Rv2660c ใน lane ที่ 1-4 ตามลำดับ และ (E) กลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย PBS ต่อโปรตีน Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion, Ag85B, ESAT-6 และ Rv2660c ใน lane ที่ 1-4 ตามลำดับ โดย M: protein marker

การตรวจหาแอนติบอดีจากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ humoral immune response ด้วยวิธี ELISA

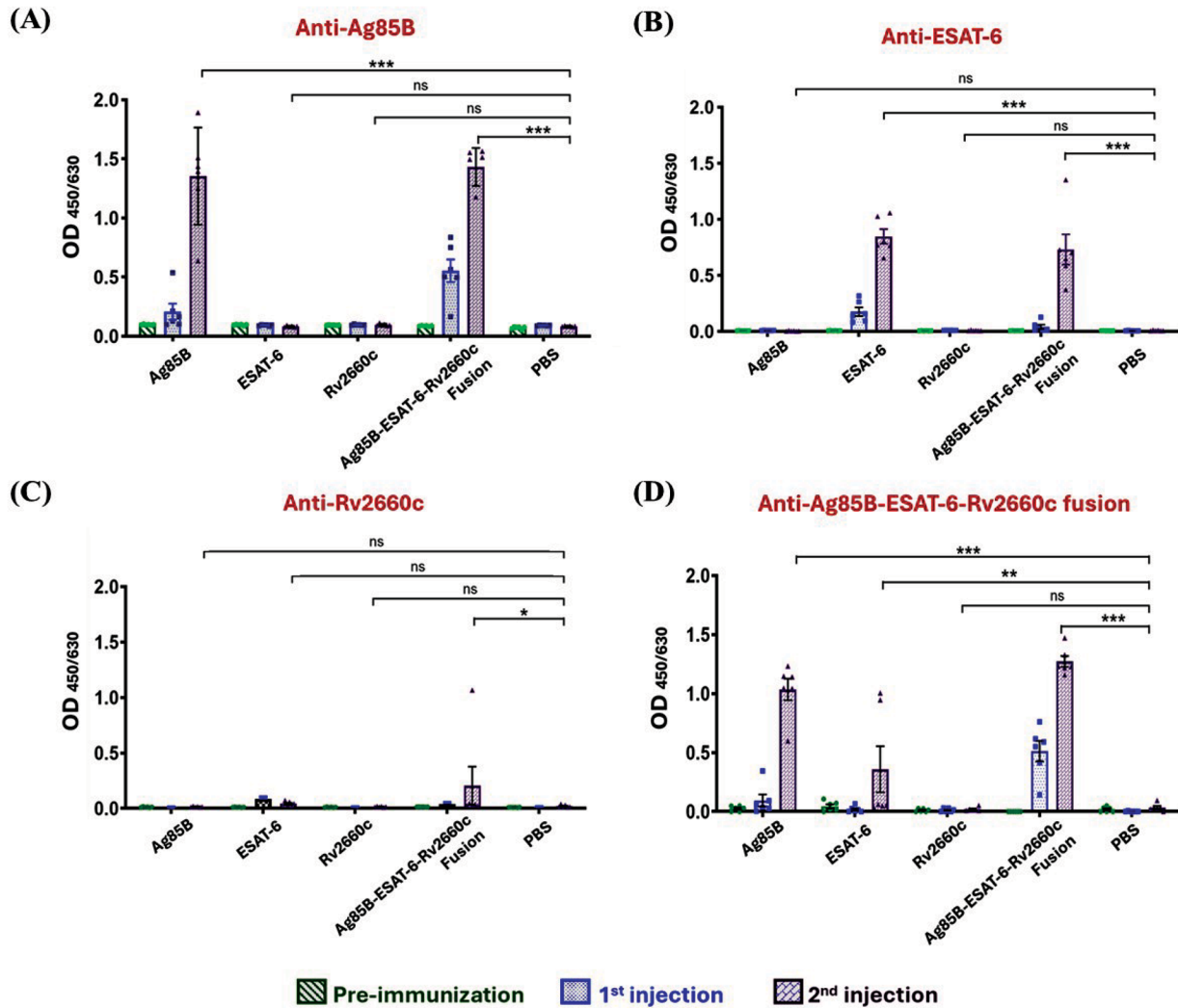
ผลการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของแอนติบอดีในซีรัมของหนูกลุ่มต่างๆ ด้วยวิธี ELISA โดยนำซีรัมที่เก็บก่อนฉีดกระตุ้น ซีรัมหลังฉีดครั้งที่ 1 และซีรัมหลังฉีดครั้งที่ 2 ของหนูแต่ละตัว มาเจือจางในอัตราส่วน 1:100 และทดสอบการจับจำเพาะกับโปรตีนทุกตัวที่สภาวะการทดสอบเดียวกัน โดยพบว่าหนูกลุ่มทดสอบที่ฉีดด้วยโปรตีน Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion มีการตอบสนองที่แตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย PBS โดยพบว่าหนูกลุ่มควบคุม การตรวจหาแอนติบอดีต่อโปรตีน Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion มีค่า OD_{450/630} ต่ำกว่า 0.1 หลังจากการฉีดทั้ง 2 ครั้ง

ในการวิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดีต่อโปรตีน Ag85B พบว่าหนูกลุ่มที่ฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีน Ag85B มีค่า OD_{450/630} เฉลี่ยเพิ่มสูงขึ้นหลังการฉีดครั้งที่ 1 และ 2 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.213 และ 1.354 ตามลำดับ เช่นเดียวกับกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion พบว่าในการฉีดครั้งที่ 1 และ 2 มีค่า OD_{450/630} เฉลี่ยเพิ่มสูงขึ้นเป็น 0.553 และ 1.431 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่หนูกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน ESAT-6 และกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Rv2660c มีค่า OD_{450/630} ต่ำกว่า 0.1 ทุกช่วงการทดสอบ ดังแสดงในภาพที่ 5(A) ส่วนปริมาณแอนติบอดีต่อโปรตีน ESAT-6 ในหนูกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน ESAT-6 มีค่า OD_{450/630} เฉลี่ยเพิ่มสูงขึ้นหลังการฉีดทดสอบครั้งที่ 1 และ 2 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.159 และ 0.847 ตามลำดับ

และพบว่ากลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion หลังฉีดครั้งที่ 2 มีค่า OD_{450/630} เฉลี่ยเพิ่มสูงขึ้นเป็น 0.732 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่หนูกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Ag85B และกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Rv2660c มีค่า OD_{450/630} ต่ำกว่า 0.1 ทุกช่วงการทดสอบ ดังแสดงในภาพที่ 5(B) และพบว่าปริมาณแอนติบอดีต่อโปรตีน Rv2660c ในหนูกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion หลังฉีดครั้งที่ 2 มีค่า OD_{450/630} เฉลี่ยเพิ่มสูงขึ้นเป็น 0.204 โดยมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ไม่พบการตอบสนองในกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Ag85B, ESAT-6 และ Rv2660c ดังแสดงในภาพที่ 5(C) ปริมาณแอนติบอดีต่อโปรตีน Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion ในหนูกลุ่มที่ฉีดครั้งที่ 2 ด้วยโปรตีน Ag85B และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion มีค่า OD_{450/630} เฉลี่ยเพิ่มสูงขึ้นเป็น 1.030 และ 1.272 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เช่นเดียวกับกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน ESAT-6 พบว่าในการฉีดครั้งที่ 2 มีค่า OD_{450/630} เฉลี่ยเพิ่มสูงขึ้นเป็น 0.358 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่หนูกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Rv2660c มีค่า OD_{450/630} ต่ำกว่า 0.1 ทุกช่วงการทดสอบ ดังแสดงในภาพที่ 5(D)

การวิเคราะห์ปริมาณ cytokine จากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ cellular immune response ด้วยวิธี Multiplex assay

เพื่อศึกษาภูมิคุ้มกันชนิด cellular immune response ชนิด cytokine ที่เกิดจากการฉีดกระตุ้นหนู



ภาพที่ 5 แสดงผลการวิเคราะห์ระดับภูมิคุ้มกันของแอนติบอดีในซีรัมของหนูกลุ่มที่ฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีน Ag85B, ESAT-6, Rv2660c, Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion และ PBS ต่อโปรตีน (A) Ag85B, (B) ESAT-6, (C) Rv2660c และ (D) Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion โดยวิธี ELISA

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ และ *** $p < 0.001$

ด้วยโปรตีนแอนติเจนแต่ละชนิด โดยการคัดแยกเซลล์ splenocyte จากม้ามหนูและกระตุ้นซ้ำแบบ *ex vivo* ด้วยโปรตีนที่ใช้ฉีดกระตุ้น ผลการวิเคราะห์ปริมาณ cytokine ได้แก่ IFN- γ , IL-2 และ TNF- α ที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ splenocyte ของหนูทดลอง ด้วยเทคนิค Multiplex assay มีค่าเฉลี่ย (mean) ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยพบว่าปริมาณ IFN- γ ที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ของหนูกลุ่มที่ฉีดทดสอบด้วยโปรตีน Ag85B แล้วกระตุ้นด้วยโปรตีน Ag85B มีค่าเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย PBS และกระตุ้นด้วยโปรตีน Ag85B อย่าง

มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 256.74 และ 31.42 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนปริมาณ IFN- γ ของหนูกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion แล้วกระตุ้นด้วยโปรตีนชนิดเดียวกับที่ฉีดในหนู มีค่าเฉลี่ยของปริมาณของ IFN- γ เท่ากับ 16.46, 239.99 และ 501.65 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ สูงกว่ากลุ่มที่ฉีดด้วย PBS แล้วกระตุ้นด้วยโปรตีน ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) โดยหนูกลุ่มที่ฉีดด้วย PBS

มีค่าเฉลี่ยของปริมาณของ IFN- γ เท่ากับ 0.34, 0.51 และ 25.30 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 6(A) และการวิเคราะห์ปริมาณ IL-2 ที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ในหนูกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion แล้วกระตุ้นเซลล์ด้วยโปรตีนชนิดเดียวกับที่ฉีดในหนู มีค่าเฉลี่ยของปริมาณของ IL-2 เท่ากับ 4,187.63, 68.95, 1,048.22 และ 466.20 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่าหนูกลุ่มที่ฉีดด้วย PBS และกระตุ้นด้วยโปรตีน Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) โดยหนูกลุ่มที่ฉีดด้วย PBS มีค่าเฉลี่ยของปริมาณของ IL-2 เท่ากับ 28.26, 21.75, 40.22 และ 42.34 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 6(B) ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณ TNF- α พบว่าหนูกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน ESAT-6 และ Rv2660c แล้วกระตุ้นด้วยโปรตีนชนิดเดียวกัน มีค่าเฉลี่ยของปริมาณของ TNF- α เท่ากับ 63.80 และ 142.36 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าหนูกลุ่มที่ฉีดด้วย PBS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ซึ่งมีค่าเฉลี่ยของปริมาณของ TNF- α เท่ากับ 31.67 และ 42.84 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ พบว่าในหนูกลุ่มที่ฉีดด้วย Ag85B และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion แล้วกระตุ้นด้วยโปรตีนชนิดเดียวกัน มีค่าเฉลี่ยของปริมาณของ TNF- α สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ splenocyte ที่ไม่ได้มีการกระตุ้น แต่พบว่าในกลุ่มควบคุมมีค่าเฉลี่ยของปริมาณของ TNF- α สูงขึ้น

เมื่อกระตุ้นด้วยโปรตีน Ag85B และโปรตีนรวม Ag85B+ESAT-6+Rv2660c ดังแสดงในภาพที่ 6(C)

สำหรับผลการวิเคราะห์ปริมาณ IFN- γ , IL-2 และ TNF- α ระหว่างกลุ่มที่ฉีดทดสอบด้วยโปรตีน Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion แล้วกระตุ้นด้วยโปรตีน Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และโปรตีนรวม Ag85B+ESAT-6+Rv2660c เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในภาพที่ 7 พบว่าการกระตุ้นด้วยโปรตีน Ag85B, ESAT-6 และ Ag85B+ESAT-6+Rv2660c มีค่าเฉลี่ยปริมาณ IFN- γ สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) โดยมีค่าเฉลี่ยปริมาณ IFN- γ เท่ากับ 638.39, 2.98 และ 501.65 พิโคกรัม/มิลลิลิตร และ 31.42, 0.34 และ 25.30 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 7(A) และมีค่าเฉลี่ยปริมาณ IL-2 สูงขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) โดยมีค่าเฉลี่ย เท่ากับ 302.44, 99.46 และ 466.20 พิโคกรัม/มิลลิลิตร และ 28.26, 21.75 และ 42.34 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยไม่พบการเพิ่มสูงขึ้นของ cytokine ทั้ง 2 ชนิด จากการกระตุ้นด้วยโปรตีน Rv2660c ดังแสดงในภาพที่ 7(B) ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณ TNF- α พบว่าเมื่อกระตุ้นด้วยโปรตีน Ag85B มีค่าเฉลี่ยปริมาณ TNF- α สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ย เท่ากับ 353.23 และ 189.39 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยปริมาณ TNF- α เมื่อกระตุ้นด้วยโปรตีน ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B+ESAT-6+Rv2660c ดังแสดงในภาพที่ 7(C)

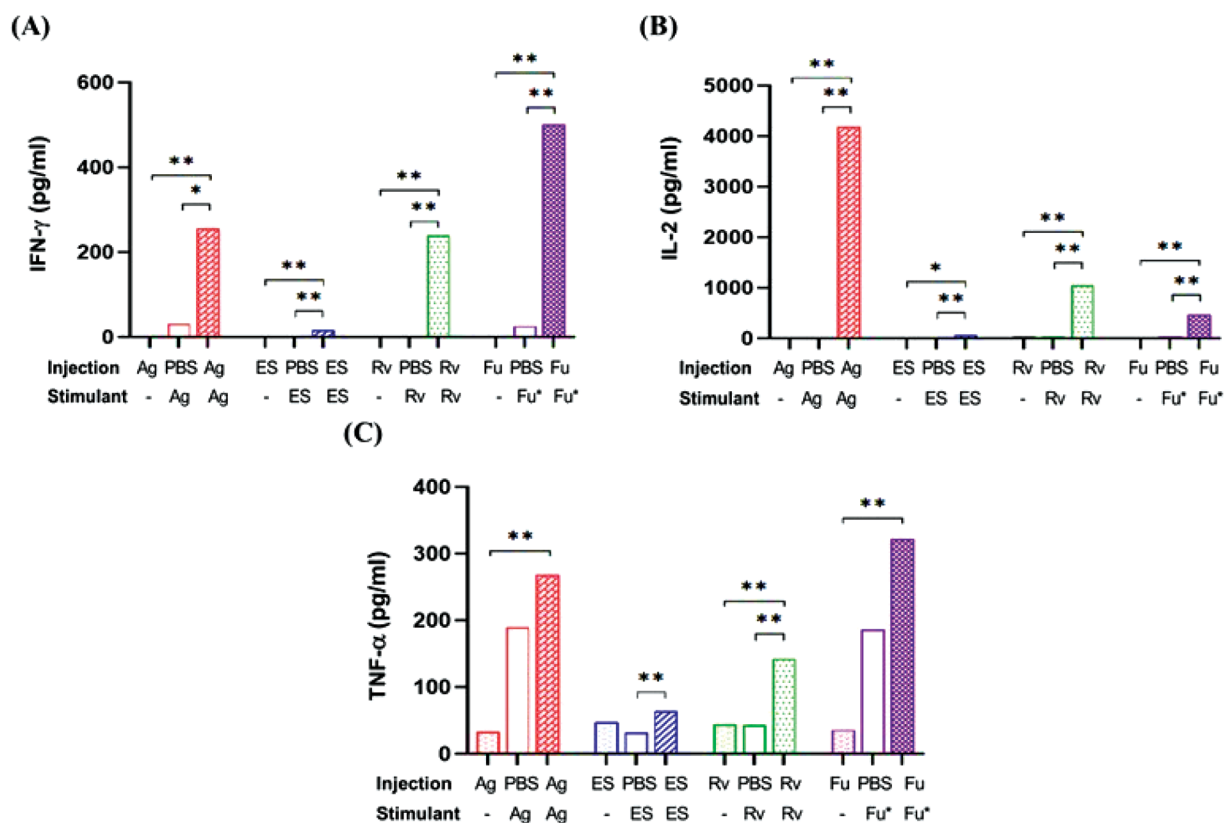
ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ cytokine ที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ splenocyte ของหนูทดลองด้วยเทคนิค Multiplex assay

Injection	Stimulant	Concentration (pg/ml)		
		IFN- γ Mean (min-max)	IL-2 Mean (min-max)	TNF- α Mean (min-max)
PBS	unstimulated	0.41 (0.00-1.73)	19.92 (15.42-26.72)	35.13 (22.91-56.10)
PBS	Ag85B	31.42 (1.58-139.52)	28.26 (12.98-40.47)	189.39 (72.48-356.26)
Ag85B	unstimulated	0.67 (0.50-1.10)	26.41 (21.77-32.62)	33.28 (19.08-46.64)
Ag85B	Ag85B	256.74 (17.47-1,005.13)	4,187.63 (1,889.54-5,503.64)	268.50 (118.81-467.89)
PBS	ESAT-6	0.34 (0.00-0.82)	21.75 (8.93-36.29)	31.67 (18.23-43.20)
ESAT-6	unstimulated	0.77 (0.55-1.10)	30.18 (20.80-47.98)	47.27 (38.82-50.95)
ESAT-6	ESAT-6	16.46 (1.20-89.19)	68.95 (34.77-138.78)	63.80 (46.43-100.85)

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ cytokine ที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ splenocyte ของหนูทดลองด้วยเทคนิค Multiplex assay (ต่อ)

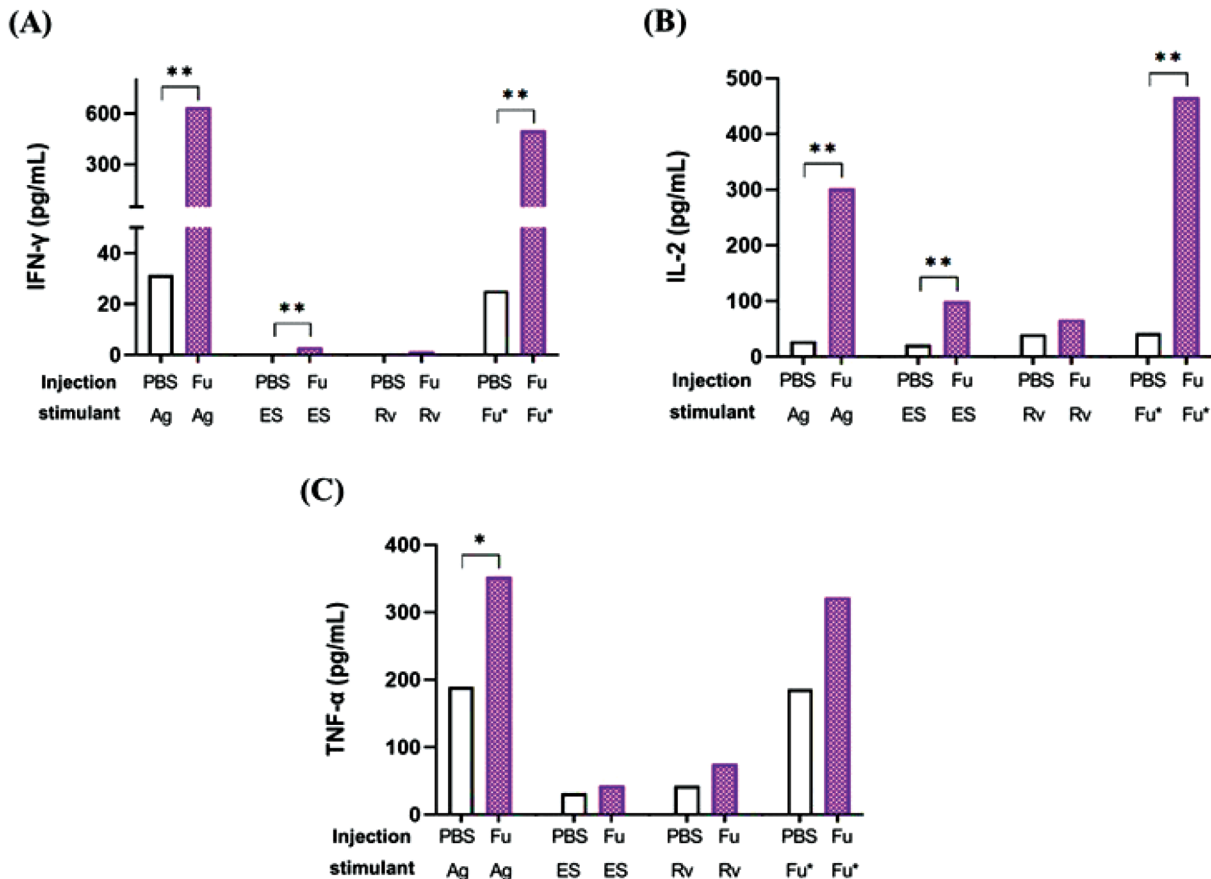
Injection	Stimulant	Concentration (pg/ml)		
		IFN- γ Mean (min-max)	IL-2 Mean (min-max)	TNF- α Mean (min-max)
PBS	Rv2660c	0.51 (0.00-1.43)	40.22 (25.28-68.39)	42.84 (24.40-56.80)
Rv2660c	unstimulated	1.10 (0.50-3.54)	41.86 (20.18-125.18)	44.13 (25.80-82.63)
Rv2660c	Rv2660c	239.99 (33.05-470.61)	1,048.22 (120.42-2,643.29)	104.36 (100.99-157.60)
PBS	Ag85B+ESAT-6 +Rv2660c	25.30 (0.88-88.07)	42.34 (25.16-58.22)	142.36 (71.32-304.84)
Fusion ¹	unstimulated	0.64 (0.28-1.08)	16.79 (9.49-24.17)	35.89 (22.34-58.64)
Fusion ¹	Ag85B+ESAT-6 +Rv2660c	501.65 (81.19-1,953.84),	466.20 (154.73-993.18)	322.11 (151.69-546.81)
Fusion ¹	Ag85B	638.39 (55.73-1,377.26)	302.44 (81.71-735.17)	353.23 (296.70-439.27)
Fusion ¹	ESAT-6	2.98 (0.80-5.06)	99.46 (43.41-149.65)	43.06 (26.70-61.87)
Fusion ¹	Rv2660c	9.24 (0.59-47.55)	66.82 (21.10-94.55)	74.97 (33.83-167.43)

หมายเหตุ: Fusion¹: Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion



Ag: Ag85B, ES: ESAT-6, Rv: Rv2660c, Fu: Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion, Fu*: Ag85B+ESAT-6+Rv2660c

ภาพที่ 6 แสดงปริมาณ cytokine ได้แก่ (A) IFN- γ และ (B) IL-2 ที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ splenocyte ภายหลังกระตุ้นด้วยโปรตีน Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion โดยเปรียบเทียบระหว่างหนูกลุ่มที่ฉีดทดสอบด้วยโปรตีน Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion กับหนูกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย PBS โดยเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง 2 กลุ่ม ด้วย Mann-Whitney Test (* p < 0.05, ** p < 0.01)



Ag: Ag85B, ES: ESAT-6, Rv: Rv2660c, Fu: Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion, Fu*: Ag85B+ESAT-6+Rv2660c

ภาพที่ 7 แสดงปริมาณ cytokine ได้แก่ (A) IFN-γ และ (B) IL-2 ที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ splenocyte โดยเปรียบเทียบระหว่างหนูกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion และหนูกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย PBS แล้วกระตุ้นด้วยโปรตีน Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion โดยเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง 2 กลุ่ม ด้วย Mann-Whitney Test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

วิจารณ์

ประเทศไทยประสบปัญหาการแพร่ระบาดของ วัณโรคสูงเป็นอันดับต้นของโลก และกำหนดแผน ยุทธศาสตร์ในการยุติวัณโรคของประเทศภายในปี พ.ศ. 2578 ที่สอดคล้องกับยุทธศาสตร์ขององค์การอนามัย โลก⁽¹⁵⁾ ด้วยเหตุนี้คณะผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์ในการ พัฒนาวัคซีนป้องกันวัณโรคที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถ กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันทั้งชนิด humoral และ cellular immune response ต่อแอนติเจนจำเพาะของเชื้อ Mtb ที่ครอบคลุมในทุกระยะของการติดเชื้อ การศึกษานี้ได้ พัฒนาโปรตีนรีคอมบิแนนท์ ซึ่งเป็นแอนติเจนของเชื้อ Mtb 3 ชนิด จำนวน 4 รูปแบบ ได้แก่ Ag85B, ESAT-6,

Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion จากการทดลองพบว่าสามารถโคลนและสร้าง พลาสมิดรีคอมบิแนนท์ของยีนแต่ละแอนติเจน และ ยีนรวมทั้งสามชนิด แล้วผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์จาก เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ClearColi™ BL21 (DE3) ซึ่งสามารถเตรียมโปรตีนให้มีความบริสุทธิ์ ทั้งนี้ผลการ ตรวจสอบคุณสมบัติลักษณะของโปรตีนด้วยเทคนิค electrophoresis พบว่าโปรตีนมีขนาดสอดคล้องกับ ขนาดโมเลกุลจากการคำนวณด้วยลำดับกรดอะมิโน โดยใช้โปรแกรม SnapGene และจากการตรวจสอบ โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนแต่ละชนิดด้วย เทคนิค Western blot นอกจากนี้พบว่าโปรตีนมี

ปริมาณ endotoxin ภายหลังการทำให้บริสุทธิ์อยู่ระหว่าง 0.01184-0.02604 EU/ μ g ซึ่งผ่านเกณฑ์ที่กำหนดสำหรับการฉีดทดสอบในหนูทดลองโดยมีค่าไม่เกิน 0.03 EU/ μ g⁽¹⁶⁾

ในการทดสอบความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูทดลองโดยฉีดทดสอบด้วยแอนติเจนในรูปแบบเดี่ยว ได้แก่ Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และรูปแบบผสม Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion และใช้ aluminum hydroxide เป็นสารเสริมฤทธิ์ (adjuvant) จากผลทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ humoral immune response ด้วยเทคนิค Western blot และ ELISA พบว่าโปรตีนแอนติเจน Ag85B, ESAT-6 และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion มีผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีในหนูทดลอง โดยแอนติบอดีต่อโปรตีน Ag85B มีปริมาณสูงกว่าแอนติบอดีต่อโปรตีน ESAT-6 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นที่ทดสอบผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูทดลองของวัคซินรูปแบบ DNA ที่สร้างโปรตีน Ag85B และ ESAT-6 โดยพบปริมาณแอนติบอดีต่อโปรตีน Ag85B สูงกว่าเช่นเดียวกันเมื่อทดสอบด้วยเทคนิค ELISA⁽¹⁷⁾ ส่วนกลุ่มที่ฉีดด้วยแอนติเจน Rv2660c ไม่พบแอนติบอดีที่สามารถจับจำเพาะต่อโปรตีน Rv2660c ทั้งวิธี Western blot และ ELISA ซึ่งแตกต่างจากโปรตีนอื่น อาจเนื่องมาจากคุณสมบัติของโปรตีนแอนติเจน รูปแบบที่ฉีดและจำนวนครั้งที่เหมาะสมในการฉีด รวมถึงปริมาณที่ฉีดเป็นต้น ซึ่งโปรตีน Rv2660c เป็นโปรตีนที่สร้างในระยะพักตัว (dormant stage) และมีรายงานการตรวจแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนชนิดนี้ในผู้ติดเชื้อระยะแฝง⁽¹⁸⁾ และพบรายงานการศึกษา B-cell epitope ของโปรตีน Mtb โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ พบว่าโปรตีน Rv2660c มีจำนวน B-cell epitope น้อยกว่าโปรตีน Ag85B และ ESAT-6⁽¹⁹⁾ นอกจากนี้มีรายงานการฉีดหนูด้วย plasmid DNA ที่ผลิตโปรตีน Rv2660c ปริมาณ 50 ไมโครกรัม โดยฉีดกระตุ้นรวม 3 ครั้ง ซึ่งสามารถกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีต่อโปรตีน Rv2660c⁽²⁰⁾ แต่ในการศึกษานี้ฉีดด้วยโปรตีนปริมาณ 5 ไมโครกรัม และฉีดจำนวน 2 ครั้ง อาจทำให้ไม่เกิดการสร้างแอนติบอดีเนื่องจากปริมาณแอนติเจนที่ฉีดน้อย

ผลการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ cellular immune response โดยการกระตุ้นเซลล์ splenocyte จากม้ามของหนูแบบ ex vivo stimulation ด้วยโปรตีน Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และรวมโปรตีนทั้ง 3 ชนิด Ag85B, ESAT-6, Rv2660c พร้อมกัน ซึ่งผลการวิเคราะห์ปริมาณ cytokine ที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ด้วยเทคนิค Multiplex assay โดยการวัดปริมาณ IFN- γ , IL-2 และ TNF- α ซึ่งเป็น cytokine ในกลุ่ม Th1 เกี่ยวข้องกับกระบวนการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิด cellular immune response และมีบทบาทเกี่ยวข้องในการกำจัดเชื้อ Mtb โดยอาศัยการทำงานร่วมกันแบบ polyfunctional T cell ซึ่ง IFN- γ ทำหน้าที่ในการกระตุ้น macrophage และ CD4 helper T cell ส่วน IL-2 ทำหน้าที่กระตุ้น T cell ให้เกิด proliferation และ differentiation และสำหรับ TNF- α เกี่ยวข้องกับกระบวนการ proinflammatory effect โดยการชักนำ immune cell อื่น ๆ⁽²¹⁾ จากผลการทดลองพบว่าหนูกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Ag85B แล้วกระตุ้นด้วยโปรตีน Ag85B มีการกระตุ้นให้หลั่ง cytokine ชนิด IFN- γ , IL-2 และ TNF- α สูงกว่าหนูกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน ESAT-6 แล้วกระตุ้นด้วยโปรตีน ESAT-6 และหนูกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Rv2660c แล้วกระตุ้นด้วยโปรตีน Rv2660c ซึ่งผลการทดลองในหนูกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion แล้วกระตุ้นด้วยโปรตีน Ag85B มีการกระตุ้นให้หลั่ง cytokine ทั้ง 3 ชนิด สูงกว่าเมื่อกระตุ้นด้วยโปรตีน ESAT-6 หรือกระตุ้นด้วยโปรตีน Rv2660c แสดงว่าโปรตีน Ag85B มีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้สูงกว่าโปรตีน ESAT-6 และ Rv2660c นอกจากนี้ยังพบว่าหนูที่ฉีดด้วยโปรตีน Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion แล้วกระตุ้นด้วยโปรตีนรวม Ag85B+ESAT-6+Rv2660c มีการหลั่ง cytokine ทั้ง 3 ชนิด สูงกว่าการกระตุ้นด้วยโปรตีนเดี่ยว Ag85B, ESAT-6 และ Rv2660c ซึ่งผลการกระตุ้นการหลั่ง cytokine ที่สูงน่าจะเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติของโปรตีน Ag85B⁽²²⁾ ได้แก่ ขนาดของโปรตีน Ag85B มีขนาด 31.8 kDa และจำนวน T cell epitope เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองในหนูกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย

adjuvant แล้วกระตุ้นด้วยโปรตีน Ag85B และโปรตีนรวม Ag85B+ESAT-6+Rv2660c ซึ่งมี Ag85B เป็นส่วนประกอบ พบว่ามีค่า TNF- α ที่หลั่งออกมาสูง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากโปรตีน Ag85B ที่ใช้ในการกระตุ้น มีคุณสมบัติในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบ innate โดยเซลล์ macrophage ผ่าน Toll-like receptor (TLR)⁽²³⁾ จากการศึกษาพบว่าหนูกลุ่มที่ฉีดด้วยโปรตีน Rv2660c แล้วกระตุ้นด้วยโปรตีน Rv2660c มีการหลั่ง cytokine ทั้ง 3 ชนิด สูงกว่าหนูที่ฉีดด้วยโปรตีน ESAT-6 แล้วกระตุ้นด้วยโปรตีน ESAT-6 แสดงว่าโปรตีน Rv2660c ซึ่งเป็นโปรตีนขนาดเล็ก 9.0 kDa ที่มีขนาดใกล้เคียงกันกับโปรตีน ESAT-6 ขนาด 10.0 kDa มีคุณสมบัติในการกระตุ้น cellular immune response ได้ดีกว่าโปรตีน ESAT-6 แต่ไม่กระตุ้น humoral immune response ในขณะที่โปรตีน ESAT-6 สามารถกระตุ้น humoral immune response ได้ดี แต่กระตุ้น cellular immune response ได้น้อยกว่า

จากผลการศึกษาพบว่ามีความสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ ที่กล่าวถึงความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของโปรตีนแต่ละชนิด คือ โปรตีน Ag85B สามารถกระตุ้น Th1 cytokine ได้แก่ IFN- γ และ TNF- α และ Th2 cytokine ได้แก่ IL-4 และ IL-10 และการสร้างแอนติบอดีในหนูทดลอง⁽²²⁾ และสามารถกระตุ้น T-cell proliferation และการสร้าง IFN- γ ได้สูงในผู้สัมผัสเชื้อ *Mtb*⁽²⁴⁾ และเป็นแอนติเจนสำคัญที่มักนำไปพัฒนาเป็นวัคซีนสำหรับป้องกันวัณโรคชนิดใหม่⁽²⁵⁾ โปรตีน ESAT-6 สามารถกระตุ้น T cell รวมทั้งการสร้างแอนติบอดีในหนูทดลอง⁽²⁶⁾ และสามารถกระตุ้น Th1/Th2/Th17 และการสร้าง cytokine ในหนูทดลอง⁽²⁷⁾ และเป็นแอนติเจนสำคัญที่มักนำไปพัฒนาเป็นวัคซีนสำหรับป้องกันวัณโรคชนิดใหม่⁽²⁶⁾ เช่นเดียวกับโปรตีน Ag85B และโปรตีน Rv2660c สามารถกระตุ้นเซลล์ macrophage ของมนุษย์ให้หลั่ง proinflammatory cytokine ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง granuloma และการรักษาสภาพ ซึ่งได้แก่ IL-1 β , IL-8, TNF- α และ IL-12p70 โดยผ่าน Toll-like receptor 2 (TLR2)⁽⁸⁾

นอกจากนี้ความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันยังขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสารเสริมฤทธิ์หรือ adjuvant

โดยในการศึกษานี้ใช้ aluminum hydroxide ซึ่งเป็น adjuvant ที่ใช้ในวัคซีนที่ได้รับการอนุมัติให้ใช้ในมนุษย์มานาน มีความปลอดภัยสูง มีคุณสมบัติเสริมการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของวัคซีนโดยสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้งชนิด humoral และ cellular ซึ่งมีรายงานว่าสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบ innate และ antigen presenting cell^(28,29) ด้วยเหตุนี้เมื่อฉีดโปรตีน Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion ร่วมกับ adjuvant จึงสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูทดลองทั้งชนิด humoral immune response และ cellular immune response ซึ่งโปรตีนดังกล่าวมีคุณสมบัติเหมาะสมในการนำไปพัฒนาเป็นวัคซีนและศึกษาในขั้นต่อไป

สรุป

จากการศึกษานี้ สามารถสร้างและผลิตแอนติเจนของเชื้อ *Mtb* ชนิดรีคอมบิแนนท์ใน *E. coli* และสามารถทดสอบการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของแอนติเจน จำนวน 3 ชนิด 4 รูปแบบ ในหนูทดลอง ประกอบด้วย Ag85B, ESAT-6, Rv2660c และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion และจากผลการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทั้งชนิด humoral immune response และ cellular immune response พบว่า Ag85B, ESAT-6 และ Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion มีความสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิด humoral immune response และ cellular immune response ส่วนโปรตีน Rv2660c ซึ่งเป็นแอนติเจนที่พบในระยะแฝงมีความสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันเฉพาะชนิด cellular immune response ดังนั้นแอนติเจนทั้ง 3 ชนิด จึงมีความเหมาะสมในการนำไปพัฒนาเป็นวัคซีนป้องกันวัณโรคต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ในการสนับสนุนทุนวิจัยผ่านสถาบันวัคซีนแห่งชาติ ในการดำเนินโครงการวิจัยและพัฒนาวัคซีน Modified *Ag85B-ESAT6-Rv2660c* mRNA สำหรับป้องกันวัณโรค ภายใต้สัญญาเลขที่ 2566.1/22

เอกสารอ้างอิง

1. Kiazky S, Ball TB. Latent tuberculosis infection: an overview. *Can Commun Dis Rep* 2017; 43(3-4): 62-6.
2. Setiabudiawan TP, Reurink RK, Hill PC, Netea MG, van Crevel R, Koeken VA. Protection against tuberculosis by *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) vaccination: a historical perspective. *Med* 2022; 3(1): 6-24.
3. Zhou F, Zhang D. Recent advance in the development of tuberculosis vaccines in clinical trials and virus-like particle-based vaccine candidates. *Front Immunol* 2023; 14: 1238649. (12 pages).
4. Huygen K. The immunodominant T-cell epitopes of the mycolyl-transferases of the antigen 85 complex of *M. tuberculosis*. *Front Immunol* 2014; 5: 321. (11 pages).
5. Macedo GC, Bozzi A, Weinreich HR, Bafica A, Teixeira HC, Oliveira SC. Human T cell and antibody-mediated responses to the *Mycobacterium tuberculosis* recombinant 85A, 85B, and ESAT-6 antigens. *Clin Dev Immunol* 2011; 2011: 351573. (10 pages).
6. Pathak SK, Basu S, Basu KK, Banerjee A, Pathak S, Bhattacharyya A, et al. Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages. *Nat Immunol* 2007; 8(6): 610-8.
7. Boggaram V, Gottipati KR, Wang X, Samten B. Early secreted antigenic target of 6 kDa (ESAT-6) protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces interleukin-8 (IL-8) expression in lung epithelial cells via protein kinase signaling and reactive oxygen species. *J Biol Chem* 2013; 288(35): 25500-11.
8. Yihao D, Hongyun H, Maodan T. Latency-associated protein Rv2660c of *Mycobacterium tuberculosis* augments expression of proinflammatory cytokines in human macrophages by interacting with TLR2. *Infect Dis (Lond)* 2015; 47(3): 168-77.
9. Jenum S, Tonby K, Rueegg CS, Rühwald M, Kristiansen MP, Bang P, et al. A Phase I/II randomized trial of H56:IC31 vaccination and adjunctive cyclooxygenase-2-inhibitor treatment in tuberculosis patients. *Nat Commun* 2021; 12(1): 6774. (13 pages).
10. Novagen. pET System Manual. 11th ed. [online]. 2005; [cited 2023 Apr 12]; [80 screens]. Available from: URL: https://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/Novagen_petsys-tem.pdf.
11. Merck. ANTI-FLAG[®] M2 affinity gel. [online]. 2021; [cited 2023 Mar 10]; [8 screens]. Available from: URL: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/236/831/a2220bul-mk.pdf>.
12. Novagen. Ni-NTA His•Bind[®] Resins. [online]. 2023; [cited 2023 Mar 10]; [32 screens]. Available from: URL: https://www.merckmillipore.com/TH/en/product/Ni-NTA-Buffer-Kit,EMD_BIO-70899#anchor_BRO.
13. Thermo Fisher Scientific. Pierce[™] chromogenic endotoxin quant kit user guide. [online]. 2023; [cited 2023 Mar 10]; [6 screens]. Available from: URL: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0017902_ChromogenicEndotoxinQuantKit_UG.pdf.
14. Zar JH. Biostatistical analysis. London: Pearson Education Limited; 2013.
15. กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. แผนปฏิบัติการระดับชาติ ด้านการต่อต้านวัณโรค ระยะที่ 2 (พ.ศ. 2566 - 2570). นนทบุรี: กองวัณโรค กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข; 2566.
16. Brito LA, Singh M. Acceptable levels of endotoxin in vaccine formulations during preclinical research. *J Pharm Sci* 2011; 100(1): 34-7.
17. Wang P, Wang L, Zhang W, Bai Y, Kang J, Hao Y, et al. Immunotherapeutic efficacy

- of recombinant *Mycobacterium smegmatis* expressing Ag85B-ESAT6 fusion protein against persistent tuberculosis infection in mice. *Hum Vaccin Immunother* 2014; 10(1): 150-8.
18. He H, Yang H, Deng Y. *Mycobacterium tuberculosis* dormancy-associated antigen of Rv2660c induces stronger immune response in latent *Mycobacterium tuberculosis* infection than that in active tuberculosis in a Chinese population. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015; 34(6): 1103-9.
19. Thangamariappan E, Mohan M, Sundar K. Computational prediction of B cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* – implications in vaccine design. *Mediterr J Infect Microbes Antimicrob* 2021; 10: 23. (6 pages).
20. Kong H, Dong C, Xiong S. A novel vaccine p846 encoding Rv3615c, Mtb10.4, and Rv2660c elicits robust immune response and alleviates lung injury induced by *Mycobacterium* infection. *Hum Vaccin Immunother* 2014; 10(2): 378-90.
21. Ahmad F, Zubair S, Gupta P, Gupta UD, Patel R, Owais M. Evaluation of aggregated Ag85B antigen for its biophysical properties, immunogenicity, and vaccination potential in a murine model of tuberculosis infection. *Front Immunol* 2017; 8: 1608. (19 pages).
22. Dong H, Jing W, Yingru X, Wenyang W, Ru C, Shengfa N, et al. Enhanced anti-tuberculosis immunity by a TAT-Ag85B protein vaccine in a murine tuberculosis model. *Pathog Glob Health* 2015; 109(8): 363-8.
23. Zhou L, Luo L, Luo L, Luo H, Ding Y, Lu Z, et al. Ag85B-induced M1 macrophage polarization via the TLR4/TRAF6/NF- κ B axis leading to bronchial epithelial cell damage and TH17/Treg imbalance. *Curr Mol Med*. [online]. 2025; [cited 2025 Feb 1]; [16 screens]. Available from: URL: <https://www.eurekaselect.com/article/145790>.
24. Launois P, Drowart A, Bourreau E, Couppie P, Farber CM, Van Vooren JP, et al. T cell reactivity against mycolyl transferase antigen 85 of *M. tuberculosis* in HIV-TB coinfecting subjects and in AIDS patients suffering from tuberculosis and nontuberculous mycobacterial infections. *Clin Dev Immunol* 2011; 2011: 640309. (10 pages).
25. Komine-Aizawa S, Jiang J, Mizuno S, Hayakawa S, Matsuo K, Boyd LF, et al. MHC-restricted Ag85B-specific CD8(+) T cells are enhanced by recombinant BCG prime and DNA boost immunization in mice. *Eur J Immunol* 2019; 49(9): 1399-414.
26. Passos BBS, Araujo-Pereira M, Vinhaes CL, Amaral EP, Andrade BB. The role of ESAT-6 in tuberculosis immunopathology. *Front Immunol* 2024; 15: 1383098. (11 pages).
27. Ning H, Zhang W, Kang J, Ding T, Liang X, Lu Y, et al. Subunit vaccine ESAT-6:c-di-AMP delivered by intranasal route elicits immune responses and protects against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Front Cell Infect Microbiol* 2021; 11: 647220. (14 pages).
28. Kooijman S, Vrieling H, Verhagen L, de Ridder J, de Haan A, van Riet E, et al. Aluminum hydroxide and aluminum phosphate adjuvants elicit a different innate immune response. *J Pharm Sci* 2022; 111(4): 982-90.
29. OZ Biosciences. AlumVax hydroxide. [online]. [cited 2023 Jul 10]. Available from: URL: <https://ozbiosciences.com/aluminum-gels/79-alumvax-hydroxide.html>.

Immunogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* Antigens: Ag85B, ESAT-6, Rv2660c, and Ag85B-ESAT-6-Rv2660c Fusion in Mice

Panadda Dhepakson, Apichai Prachasuphap, Nadthanan Pinyosukhee, Rattanawadee Wichajarn, Naratcha Sripetch, Rujiraporn Pitaksalee, Anicha Luengchaichaweng, Kachaporn Mekkhayai, Naline Sangthong, Sompong Sapsutthipas, and Parnuphan Panyajai

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

ABSTRACT Tuberculosis (TB) remains a major global public health concern. The Bacillus Calmette–Guérin (BCG) vaccine is currently the only available TB vaccine, offering protection against severe TB in children but showing limited efficacy in adults. Developing new TB vaccines is therefore essential for achieving TB eradication. This study aimed to evaluate the immunogenicity of four recombinant *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) antigens: Ag85B, ESAT-6, Rv2660c, and Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion in mice, reported as active and latent infection stages to support the design and development of an mRNA-based TB vaccine. Recombinant proteins were designed and expressed in *Escherichia coli* ClearColi™ BL21(DE3) and used to immunize C57BL/6 mice. Subsequently, humoral immune responses were assessed using Western blot and ELISA, whereas cellular immune responses were analyzed through cytokine detection (IFN- γ , IL-2, and TNF- α) via a Multiplex assay following *ex vivo* restimulation. The results showed that Ag85B, ESAT-6, and Ag85B-ESAT-6-Rv2660c fusion proteins induced both humoral and cellular immune responses, while Rv2660c, an antigen associated with latent TB infection, primarily stimulated a cellular immune response. These findings suggest the antigens enrolled are promising candidates for further TB vaccine development.

Keywords: Ag85B, ESAT-6, Rv2660c, Immunogenicity in mice

Design and Preliminary Characterization of *Ag85B-ESAT-6-Rv2660c* mRNA-Lipid Nanoparticles for TB Vaccine Development

Panadda Dhepakson, Apichai Prachasuphap, Kodcharad Jongpitisub,
Pantida Treeyoung, Sirawit Wet-osot, Anicha Luengchaichaweng,
Rujiraporn Pitaksalee, and Parnuphan Panyajai

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

ABSTRACT Tuberculosis (TB) remains a major global public health challenge, and Thailand is one of the High Burden Country Lists due to its incidence rate exceeding the global average. The only TB vaccine available, Bacillus Calmette–Guérin (BCG), effectively protects against severe TB in children but has limited efficacy in preventing pulmonary TB in adults. Therefore, developing new TB vaccines is crucial to achieving Thailand’s goal of TB elimination and sustainable disease control. This study focused on designing and characterizing modified mRNA constructs for a TB vaccine development using three key antigens: Ag85B, ESAT-6, and Rv2660c, which target different stages of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) infection. Five mRNA constructs encoding TB antigens were designed and synthesized *in vitro*, including three single-antigen constructs and two fusion proteins composed of all three antigens. Notably, the fusion mRNA constructs *Ag85B-G4S-ESAT-6-G4S-Rv2660c* mRNA and *Ag85B-AAY-ESAT-6-AAY-Rv2660c* mRNA exhibited greater secondary structure stability compared to single-antigen constructs. Encapsulation of both fusion mRNA constructs in lipid nanoparticles (mRNA-LNPs) demonstrated high encapsulation efficiency, excellent size uniformity (~140 nm), and reliable stability. Moreover, the delivery of mRNA-LNPs into HEK293 cells confirmed the successful expression of fusion proteins for both mRNA constructs, as indicated by TB antigen-specific antibody staining. Therefore, the modified *Ag85B-ESAT-6-Rv2660c* mRNAs exhibited suitable characteristics and significant potential for further development as the tuberculosis vaccine.

Keywords: Tuberculosis, mRNA vaccine, *Ag85B-ESAT-6-Rv2660c*, Lipid nanoparticle

Corresponding author E-mail: panadda.d@dmsc.mail.go.th

Received: 18 March 2025

Revised: 25 March 2025

Accepted: 28 March 2025

Introduction

Tuberculosis (TB), caused by *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), remains a major global health challenge.⁽¹⁾ After infection, MTB can persist in a latent state within the human body without causing symptoms, referred to as latent TB infection. However, approximately 5–10% of individuals with latent TB progress to active TB when their immune system is weakened, leading to bacterial proliferation, systemic spread via the lymphatic system, and symptomatic illness.⁽²⁾

The Bacillus Calmette–Guérin (BCG) vaccine, developed in 1921 from *Mycobacterium bovis*, is the only TB vaccine available. As a live attenuated vaccine, BCG effectively prevents severe TB in children.⁽³⁾ However, its efficacy diminishes in adults,⁽³⁾ highlighting the need for the development of more effective TB vaccines, particularly in high-burden countries like Thailand, which ranks among the top countries globally for TB prevalence.⁽¹⁾ This aligns with Thailand's national strategy to eliminate TB through research and innovation in prevention, treatment, and control measures.⁽⁴⁾

Recent advancements in TB vaccine development have focused on incorporating multiple antigens to target various stages of *M. tuberculosis* infection. Vaccines based on fusion antigens, such as Ag85B-ESAT-6 (H1) and Ag85B-TB10.4 (H4) in protein subunit platforms, as well as Ag85B-ESAT-6 delivered via a DNA platform, have demonstrated enhanced protection in animal models compared to BCG.^(5–7) Notably, the multistage subunit vaccine H56, which combines early antigens Ag85B, ESAT-6, and the latency-associated protein Rv2660c, has demonstrated superior protection

in animal models. This combination elicits a more comprehensive immune response by targeting both active infection and latent stages of MTB, outperforming Ag85B-ESAT-6 (H1) and BCG in terms of protective efficacy.⁽⁸⁾ Further clinical evaluations of the H56:IC31 vaccine in Phase 1b trials have yielded promising results, with no safety concerns observed in adults vaccinated within one month of completing TB treatment. The vaccine successfully induced CD4+ T-cell responses and antibodies specific to the vaccine proteins.^(9,10)

While vaccine platforms such as protein subunits and DNA vaccines have shown promise in preclinical and clinical studies, mRNA-based TB vaccines, particularly those incorporating multiple antigens targeting different stages of infection, remain largely unexplored. The potential of mRNA vaccine technology for TB was first demonstrated in 2004 with an mRNA vaccine encoding a single antigen, MPT83, which induced robust humoral and T-cell immune responses in murine models. Although the protective efficacy against MTB infection was lower compared to BCG, this study provided strong evidence that mRNA vaccines could be adapted to improve efficacy by including multiple antigens.⁽¹¹⁾

This study aimed to design and characterize modified mRNA constructs for a TB vaccine using three antigens: Ag85B, ESAT-6, and Rv2660c, which targeted different stages of MTB infection. The research included both individual mRNA sequences for each antigen and fusion proteins, *Ag85B-G4S-ESAT-6-G4S-Rv2660c* and *Ag85B-AAY-ESAT-6-AAY-Rv2660c*. These modified mRNA constructs provide a foundation for developing mRNA-based TB vaccines.

Materials and Methods

mRNA Design

The coding sequences for the MTB target antigen genes were designed as the followings: 1) *Ag85B*, 2) *ESAT-6*, 3) *Rv2660c*, 4) *Ag85B-G4S-ESAT-6-G4S-Rv2660c* fusion, and 5) *Ag85B-AY-ESAT-6-AY-Rv2660c* fusion. Each sequence was modified by adding the tissue plasminogen activator (tPA) secretory signal and the MHC class I trafficking signal (MITD) to enhance secretion and antigen presentation via MHC molecules. The sequences were optimized using a codon optimization approach, with additional adjustments for uridine depletion, and GC content to ensure efficient translation in human cells⁽¹²⁾ using mRNAid software (version 1.0.0) (<https://mrnaid.dichlab.org/>).⁽¹³⁾ The minimum Free Energy (MFE) and the structure of the mRNA were predicted via the RNAfold web server (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>).

mRNA Synthesis

For template preparation and vector construction, the DNA constructs encoding the MTB antigen genes were synthesized (Gene Universal Inc., USA) and cloned into a linearized template vector (Takara Bio Inc., USA) to serve as a template for *in vitro* transcription. The constructed plasmid DNA (pDNA) was then transformed into *Escherichia coli* (*E. coli*) strain Stbl2 for propagation. Positive clones were identified through colony PCR, using primers specific to all inserts (Forward 5'-AGAGAA CCC GCC ACC ATG-3', Reverse 5'-CGA GGC TCC AGC TCA TCA-3'). Clones were further confirmed by Sanger sequencing using BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific,

USA) on ABI PRISM® 3500xL Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, USA). The verified plasmids were propagated in LB medium at 30 °C for 16 hours (shaken at 225 rpm) and purified using the QIAGEN Plasmid Midi Kit following the manufacturer's protocol. pDNA concentration was determined via absorbance at 260 nm using a NanoDrop™ spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA). Plasmids were linearized using the *HindIII* restriction enzyme digestion (16 hours at 37 °C), followed by purification through ethanol precipitation. Complete linearization was confirmed using agarose gel electrophoresis before proceeding to *in vitro* transcription.

For *in vitro* transcription, linearized pDNA served as the template for mRNA synthesis using an IVTpro T7 mRNA Synthesis Kit (Takara Bio Inc., USA). N1-methylpseudouridine-5'-triphosphate was incorporated during synthesis, replacing UTP to enhance stability and reduce immunogenicity. The synthesized mRNA contained essential regulatory elements, including a 5' untranslated region (UTR), a 3' UTR, and a poly(A) tail. A co-transcriptional capping strategy was employed using the CleanCap® AG (TriLink Biotechnologies, USA) system, incorporating N7-methyl-3'-O-methyl-guanosine at the 5' end to ensure efficient and accurate capping. Purification of mRNA was then performed by LiCl precipitation according to the IVTpro T7 mRNA Synthesis Kit protocol. Once purified, mRNA was analyzed using the Agilent TapeStation automated electrophoresis system with RNA ScreenTape (Agilent Technologies, USA) following the manufacturer's protocol and the mRNA Synthesis and Encapsulation in Ionizable Lipid Nanoparticles protocol⁽¹⁴⁾ to assess mRNA integrity, size, and poly(A) tail presence and length.

Encapsulation of mRNA with Lipid Nanoparticles (LNPs)

For the production of mRNA-Moderna-like LNPs, the lipid components used for the preparation of LNPs including 9-heptadecanyl 8-((2-hydroxyethyl)[6-oxo-6-(undecyloxy)hexyl]amino)octanoate (SM-102) (Cayman Chemical Company, USA), 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC) (Avanti Polar Lipids, AL, USA), 1,2-dimyristoyl-rac-glycero-3-methoxypolyethylene glycol-2000 (DMG-PEG-2000) (Avanti Polar Lipids, AL, USA), and cholesterol (Sigma, UK). Individual stock solutions of SM-102, DSPC, cholesterol, and DMG-PEG-2000 were prepared by dissolving each lipid component in anhydrous ethanol. These were then combined in a molar ratio of 50:10:38.5:1.5 (SM-102: DSPC: cholesterol: DMG-PEG-2000) to achieve a total lipid concentration of 12.5 mM (1.8 mg/mL). In parallel, mRNA was diluted in a 100 mM acetate buffer (pH 4.0) to achieve a lipid-to-mRNA molar ratio of 4:1 (cationic ionizable lipid: nucleotide). The ethanol-based lipid mixture and the aqueous mRNA solution were then combined using a NanoAssemblr microfluidic device (Precision Nanosystems, Vancouver, BC, Canada) at a 3:1 volume ratio, with a total flow rate of 12 mL/min. The mRNA-LNPs were diluted 40X in PBS and concentrated using an Amicon® Ultra Centrifugal Filter Device with a 10 kDa molecular weight cutoff (Merck Millipore, USA). Finally, the mRNA-LNPs were aliquoted and stored at 4 °C until use.⁽¹⁵⁾

For the production of mRNA-GenVoy-ILM™ LNPs (Precision NanoSystems, Vancouver, Canada), GenVoy-ILM™ lipid was purchased from Precision NanoSystems (Vancouver,

BC, Canada). A stock lipid solution was prepared by diluting GenVoy-ILM™ in anhydrous ethanol to achieve a total lipid concentration of 12.5 mM. In parallel, mRNA was diluted in a 100 mM acetate buffer (pH 4.0) to achieve a lipid-to-mRNA molar ratio of 4:1 (cationic ionizable lipid: nucleotide). The ethanol-based lipid mixture and the aqueous mRNA solution were then combined using the same NanoAssemblr microfluidic device and processed under identical conditions as the Moderna formulation.

Characterization of the mRNA-LNPs

The hydrodynamic size and polydispersity index (PDI) of the mRNA-LNPs were assessed using dynamic light scattering (DLS) on a Malvern Zetasizer Advance (Malvern Instruments Ltd., Malvern, U.K.). The mRNA-LNPs were diluted 200-fold in PBS before measurement, which was performed at 25°C and a backscattering angle of 173°. The zeta potential of the mRNA-LNPs was measured using the same instrument. Before analysis, concentrated mRNA-LNP stock was diluted 30-fold in sterile PBS (pH 7.4). Measurements were conducted at 25°C using a folded capillary cell (DTS1070).

The % encapsulation efficiency (%EE) of nucleic acid in the LNPs was quantified using the Quant-iT Ribogreen RNA assay kit (Invitrogen, Paisley, Scotland). Briefly, equal concentrations of mRNA-LNPs were prepared with and without treatment by Triton X-100 (Sigma-Aldrich) to lyse the nanoparticles. The samples were incubated for 10 minutes and then transferred to 96-well plates in triplicate, alongside RNA standards. The fluorescent Ribogreen reagent was added according to the manufacturer's instructions, and fluorescence

was measured using a Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, USA). A standard

curve was generated to quantify RNA content and %EE was calculated using the following formula:

$$\%EE = \left(\frac{\text{mass of encapsulated mRNA}}{\text{total mass of mRNA detected in the sample}} \right) \times 100\%$$

Transfection and Immunofluorescence Analysis

FreeStyle™ 293-F cells (Thermo Fisher Scientific, USA) were transfected with LNP-formulated mRNA constructs to evaluate functionality. The cells were maintained in FreeStyle™ 293 Expression Medium (Thermo Fisher Scientific, USA) at 37°C with an orbital shaking at 125 rpm in an 8% CO₂ incubator. For transfection, cells were seeded into six-well plates at a density of 2×10^5 cells per well and incubated overnight. The LNP-formulated mRNA was added directly to the cells at 1.0 ug/well. At 72 hours post-transfection, transfection efficiency was assessed by evaluating TB antigen protein expression through immunofluorescence staining. Briefly, cells were harvested, smeared onto slides, and fixed with 4% paraformaldehyde for 15 minutes. Permeabilization was performed using 0.1% Triton X-100. The slides were then incubated with primary antibodies, Rabbit Anti-Ag85B antibody (Abcam, cat. no. ab312328), followed by a secondary incubation with FITC-conjugated Polyclonal Swine Anti-Rabbit Immunoglobulins (DakoCytomation, Denmark). Fluorescence imaging was conducted using a Nikon Eclipse E600 fluorescence microscope (USA) to confirm the expression of TB antigens.

Result

mRNA Design

Five MTB genes; *Ag85B*, *ESAT-6*, *Rv2660c*, *Ag85B-G4S-ESAT-6-G4S-Rv2660c* fusion, and *Ag85B-AAV-ESAT-6-AAV-Rv2660c* fusion were successfully designed for pDNA construction (Figure 1). By optimizing the codons of MTB genes to be suitable for human cells, it was found that the designed genes had a higher codon adaptation index (CAI) value than 0.9, which could enhance protein expression compared to the original genes. Secondary structure analysis of the optimized mRNAs revealed MFE values of -565.1, -296.8, -272.8, -810.7, and -790 kcal/mol for *Ag85B*, *ESAT-6*, *Rv2660c*, *Ag85B-G4S-ESAT-6-G4S-Rv2660c* fusion, and *Ag85B-AAV-ESAT-6-AAV-Rv2660c* fusion, respectively (Figure 2).

MFE values indicate the thermodynamic stability of an mRNA's secondary structure, and a lower (more negative) ΔG indicates a more stable molecule with reduced structural fluctuations.⁽¹⁶⁾ The fusion constructs showed lower MFE values than their components, with MFE values of -810.7 and -790.0 kcal/mol for *Ag85B-G4S-ESAT-6-G4S-Rv2660c* mRNA and *Ag85B-AAV-ESAT-6-AAV-Rv2660c* mRNA, suggesting that these constructs adopt more stable secondary structures. This increased stability reduces susceptibility to mRNA degradation and enhances translational efficiency.

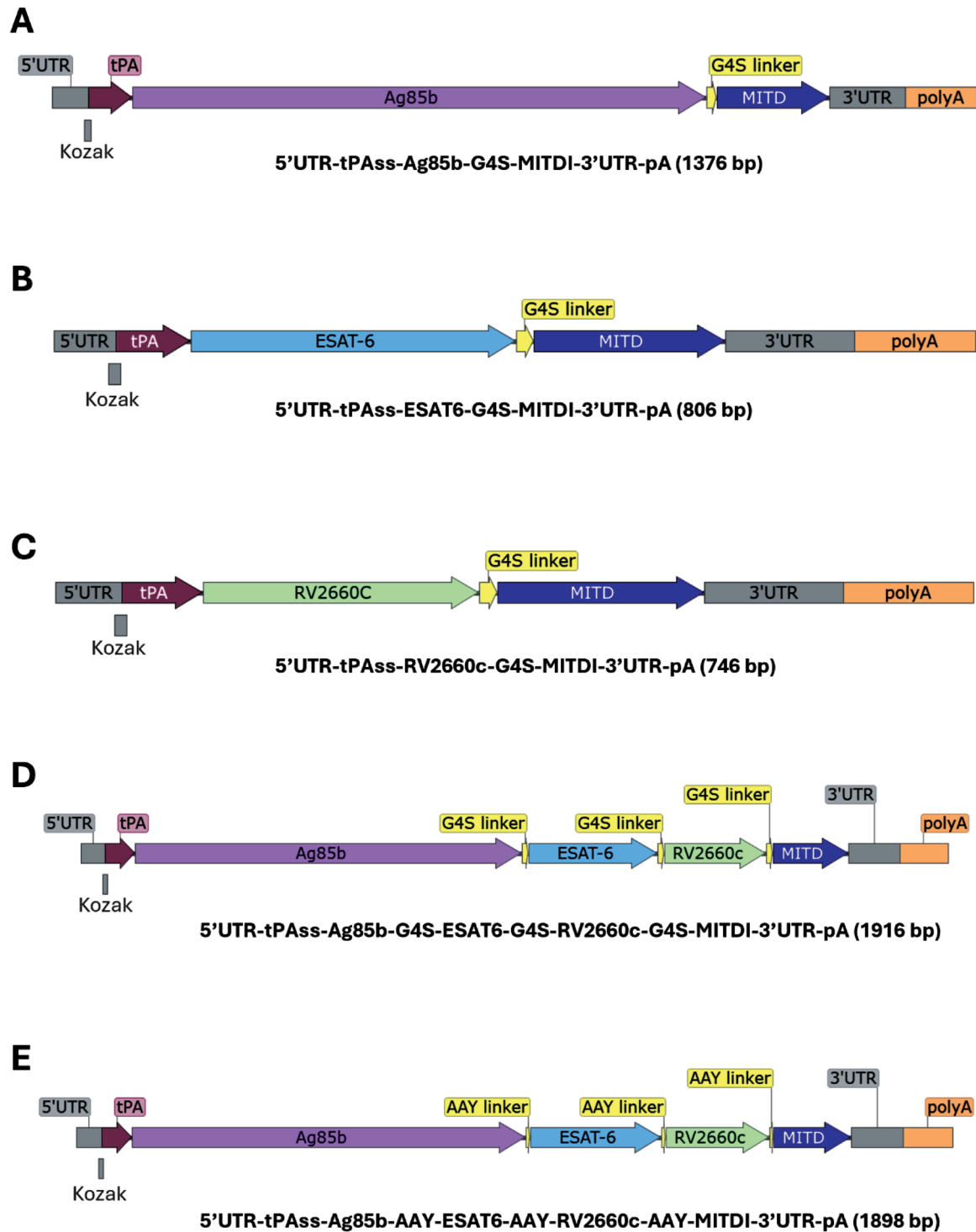


Figure 1 Schematic representation of the five MTB genes used for pDNA construction and subsequent mRNA synthesis via *in vitro* transcription: (A) *Ag85B*, (B) *ESAT-6*, (C) *Rv2660c*, (D) *Ag85B-G4S-ESAT-6-G4S-Rv2660c* fusion, and (E) *Ag85B-AAV-ESAT-6-AAV-Rv2660c* fusion.

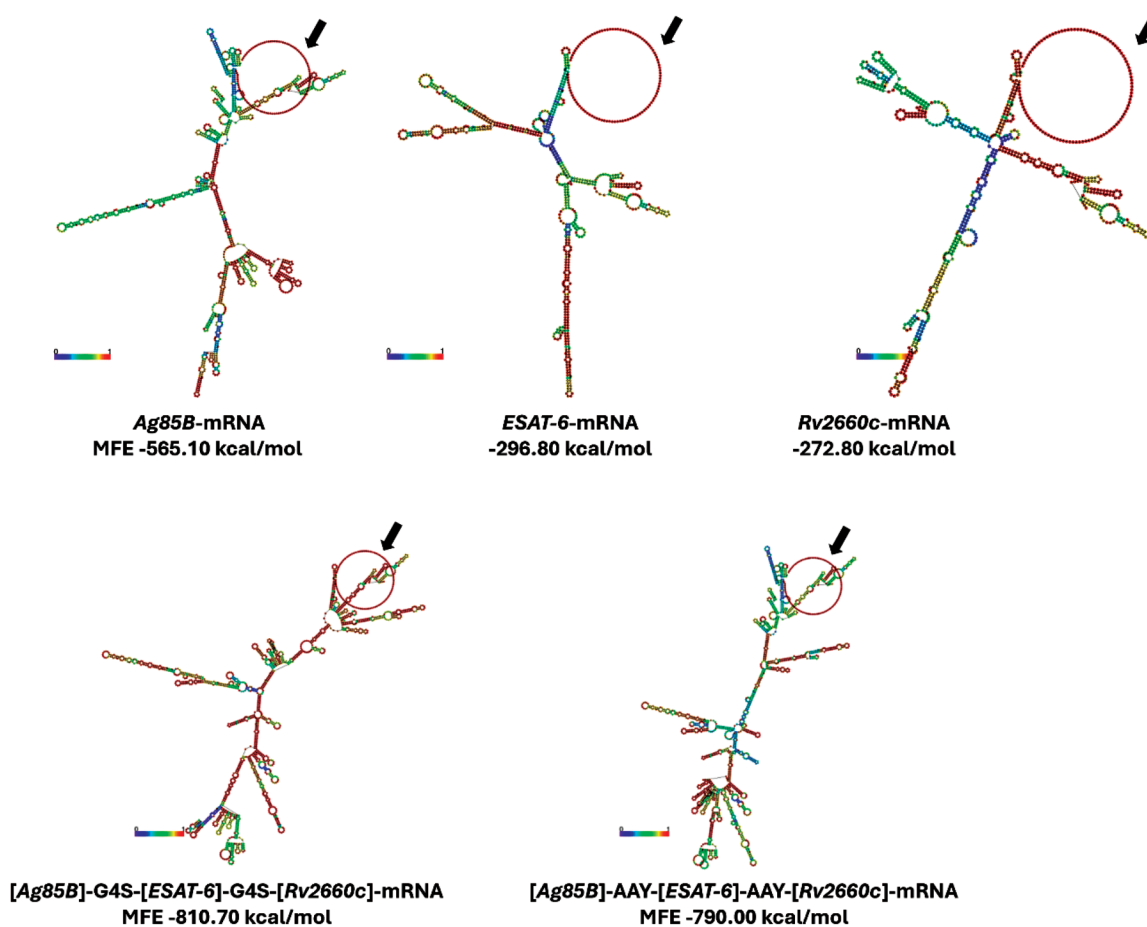


Figure 2 Predicted secondary structures of codon-optimized mRNA generated using the RNAfold web server. The structures are color-coded based on base-pairing probabilities, where red indicates highly unpaired regions (low pairing probability) and blue represents highly paired regions (high pairing probability). Secondary structures such as hairpins and stem-loop structures are shown. The poly(A) tail at the 3' end of the mRNA is indicated with a black arrow.

mRNA Synthesis

The five MTB genes were successfully cloned into pDNA vectors, verified via colony PCR (Figure 3), and confirmed through Sanger sequencing. Positive clones were expanded in cultures, and pDNA was isolated and linearized using the *HindIII* restriction enzyme (Figure 4). These linearized constructs served as templates for *in vitro* transcription. The transcription reactions successfully generated mRNAs, which were analyzed using an automated gel electrophoresis system (Agilent TapeStation

Automated Electrophoresis System with RNA ScreenTape Kit) to assess their molecular size and integrity. The results confirmed that the synthesized mRNAs, including their poly(A) tails, corresponded to the expected sizes for all five genes: 1376 bp (*Ag85B*), 806 bp (*ESAT-6*), 746 bp (*Rv2660c*), 1916 bp (*Ag85B-G4S-ESAT-6-G4S-Rv2660c fusion*), and 1898 bp (*Ag85B-AAY-ESAT-6-AAY-Rv2660c fusion*) (Figure 5). The synthesized mRNAs were intact, with no detectable fragmented mRNAs.

Among the synthesized mRNAs, the fusion constructs *Ag85B-G4S-ESAT-6-G4S-Rv2660c* and *Ag85B-AAY-ESAT-6-AAY-Rv2660c* were

selected for encapsulation into LNPs due to their superior MFE values, indicating higher structural stability and translational efficiency.

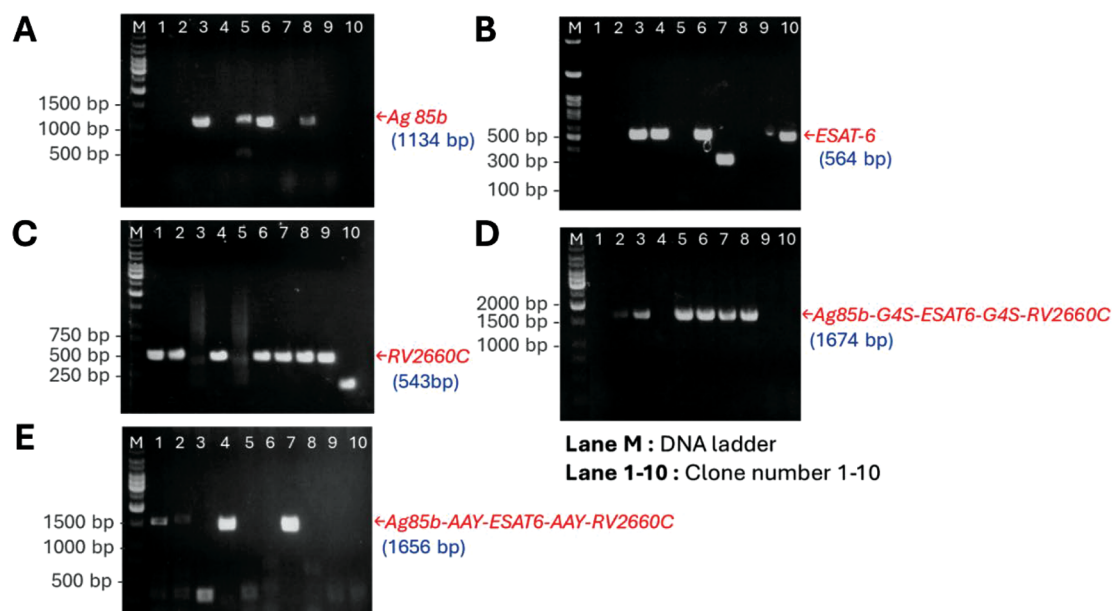


Figure 3 Colony PCR results confirming recombinant pDNA clones in *E. coli* Stbl2 for the five MTB genes: (A) *Ag85B*, (B) *ESAT-6*, (C) *Rv2660c*, (D) *Ag85B-G4S-ESAT-6-G4S-Rv2660c* fusion, and (E) *Ag85B-AAY-ESAT-6-AAY-Rv2660c* fusion.

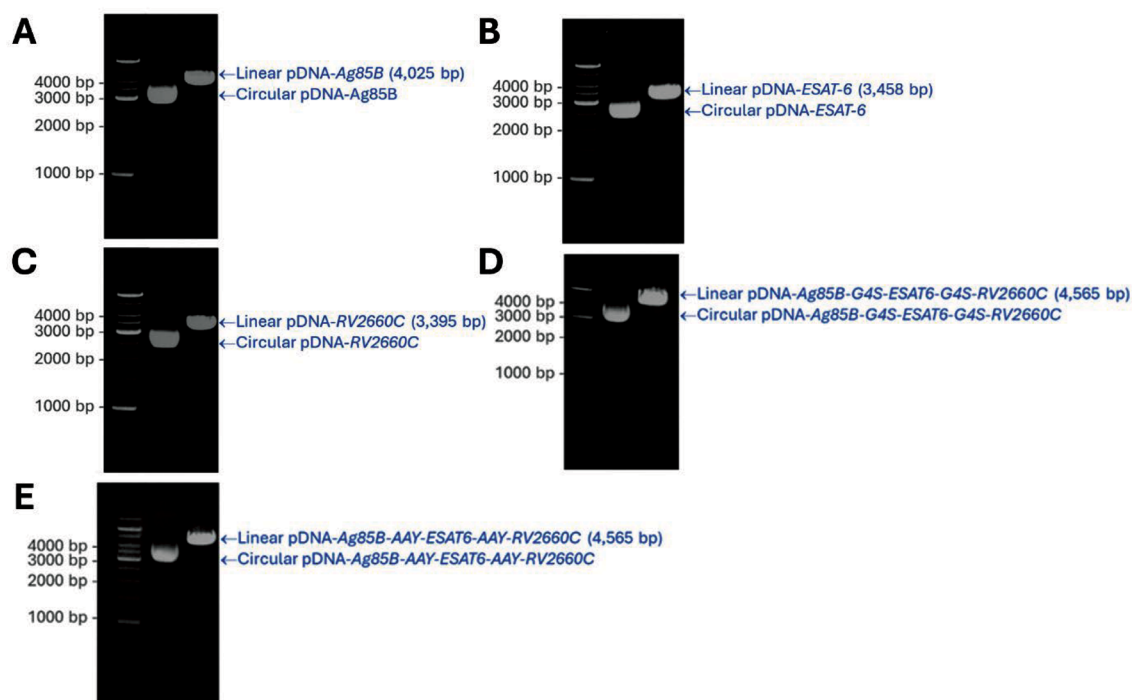


Figure 4 Agarose gel electrophoresis of linearized recombinant pDNA for the five MTB genes following restriction enzyme digestion: (A) *Ag85B*, (B) *ESAT-6*, (C) *Rv2660c*, (D) *Ag85B-G4S-ESAT-6-G4S-Rv2660c* fusion, and (E) *Ag85B-AAY-ESAT-6-AAY-Rv2660c* fusion.

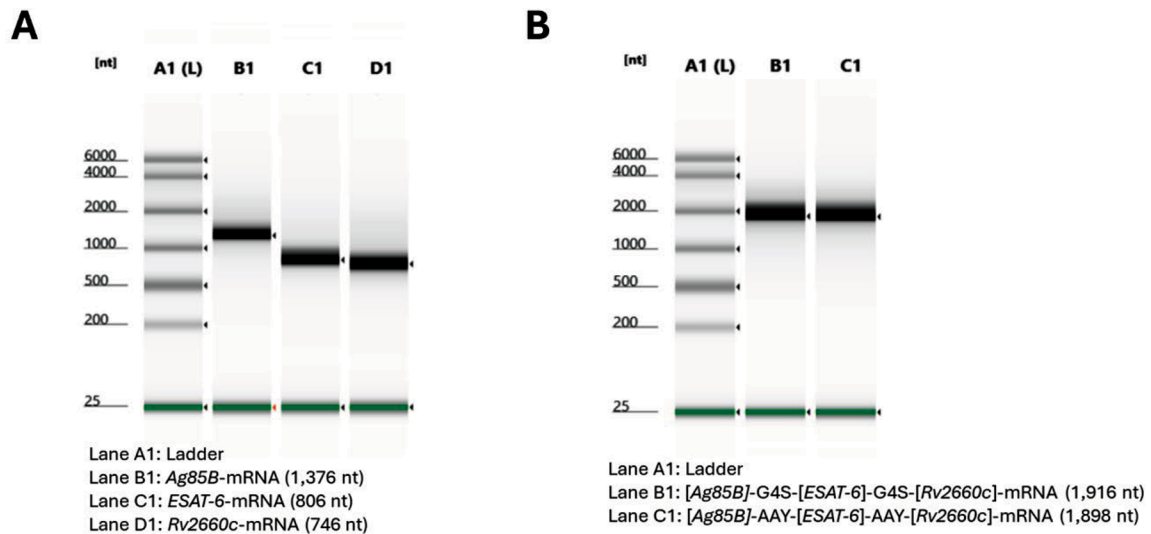


Figure 5 Analysis of synthesized mRNAs using the Agilent TapeStation Automated Electrophoresis System with the RNA ScreenTape kit, assessing the molecular size and quality of five MTB mRNA constructs. (A) *Ag85B*, *ESAT-6*, and *Rv2660c* individual mRNAs. (B) *Ag85B-G4S-ESAT-6-G4S-Rv2660c* fusion and *Ag85B-AAY-ESAT-6-AAY-Rv2660c* fusion mRNAs.

mRNA-LNPs Characterization

To evaluate the efficacy of LNP formulations in delivering mRNA, two systems, GenVoy-ILM™ and Moderna-like formulation, were initially compared using Fluc-mRNA as a control. GenVoy-ILM™ LNPs demonstrated encapsulation efficiency of 82.31%, significantly higher than Moderna's 68.55%, while achieving

comparable average particle sizes (105.1 ± 2.4 nm vs. 111.6 ± 6.8 nm, respectively) and polydispersity index ($PDI < 0.3$) (Table 1). The zeta potential of both formulations was slightly negative (-8.1 ± 1.4 mV for GenVoy-ILM™ and -5.9 ± 1.2 mV for Moderna), supporting suspension stability. Based on this evaluation, GenVoy-ILM™ was selected for further studies due to its superior encapsulation efficiency.

Table 1 Physicochemical Properties of LNPs Formulations for Control and Target mRNA Constructs

mRNA	LNPs	RNA concentration (μg/mL)		Encapsulated mRNA (μg/mL)	Encapsulation efficiency (%EE)	Average Particle size (Z-Average ^a) (nm)	PDI ^b	Zeta potential (mV)
		Without Triton X-100	With 1 % Triton X-100					
Fluc-mRNA	GenVoy-ILM™	2.09	11.79	9.70	82.31	105.1 ± 2.4	0.199 ± 0.024	-8.1 ± 1.4

Table 1 Physicochemical Properties of LNPs Formulations for Control and Target mRNA Constructs (continued)

mRNA	LNPs	RNA concentration (µg/mL)		Encapsulated mRNA (µg/mL)	Encapsulation efficiency (%EE)	Average Particle size (Z-Average ^a) (nm)	PDI ^b	Zeta potential (mV)
		Without Triton X-100	With 1 % Triton X-100					
<i>Fluc</i> -mRNA	mRNA-1273 (Moderna)	5.59	17.78	12.18	68.55	111.6± 6.8	0.128± 0.054	-5.9±1.2
<i>Ag85B-G4S-ESAT-6-G4S-Rv2660c</i> mRNA	GenVoy-ILM TM	18.98	94.88	75.89	79.99	143.2± 2.3	0.099± 0.065	-2.9±0.4
<i>Ag85B-AAY-ESAT-6-AAY-Rv2660c</i> mRNA	GenVoy-ILM TM	18.98	90.79	71.81	79.09	140.4± 4.1	0.089± 0.037	-22.7± 0.3

Note: ^a Z-average, Intensity-weighted mean hydrodynamic size

^b PDI, polydispersity index. Data are expressed as mean±SD (n = 3)

GenVoy-ILMTM LNPs encapsulating *Ag85B-G4S-ESAT-6-G4S-Rv2660c* and *Ag85B-AAY-ESAT-6-AAY-Rv2660c* mRNAs yielded concentrations between 90.79 and 94.88 µg/mL, with both formulations achieving high encapsulation efficiency (%EE ~80%) (Table 1). *Ag85B-G4S-ESAT-6-G4S-Rv2660c* mRNA-LNPs had slightly larger average particle sizes (143.2±2.3 nm) compared to *Ag85B-AAY-ESAT-6-AAY-Rv2660c* mRNA-LNPs (140.4±4.1 nm), while both exhibited excellent size uniformity (PDI < 0.1) (Table1). Surface charge analysis revealed a more negative zeta potential for *Ag85B-AAY-ESAT-6-AAY-Rv2660c* mRNA-LNPs (-22.7±0.3 mV) compared

to *Ag85B-G4S-ESAT-6-G4S-Rv2660c* mRNA-LNPs (-2.9±0.4 mV), suggesting higher colloidal stability for the former, as greater negative zeta potential is associated with improved stability in suspension.⁽¹⁷⁾ These results confirmed the successful formulation and characterization of MTB-specific mRNA-LNPs, supporting their potential for further evaluation in preclinical applications.

In Vitro Protein Expression Studies

The functionality of the mRNA constructs was assessed through *in vitro* transfection of HEK293 cells using mRNA-LNP formulations containing either *Ag85B-G4S-ESAT-6-G4S-*

Rv2660c mRNA or *Ag85B-AAV-ESAT-6-AAV-Rv2660c* mRNA. Immunofluorescence assays demonstrated successful intracellular expression of the encoded fusion proteins, as indicated by distinct fluorescence signals corresponding to the target TB antigens. This observation further confirmed that the tPA secretory signal and MITD, as designed in the mRNA constructs, successfully facilitated the trafficking of the antigen to the cell surface. These signals resulted in effective antigen

presentation, allowing the cells to be stained with specific antibodies against the TB antigens. In contrast, un-transfected HEK293 cells (without mRNA-LNP treatment) served as a negative control and showed no detectable fluorescence, confirming the specificity of the observed signals (Figure 6). These results demonstrated the successful delivery, translation, and trafficking of the mRNA constructs, enhancing antigen presentation at the cell surface.

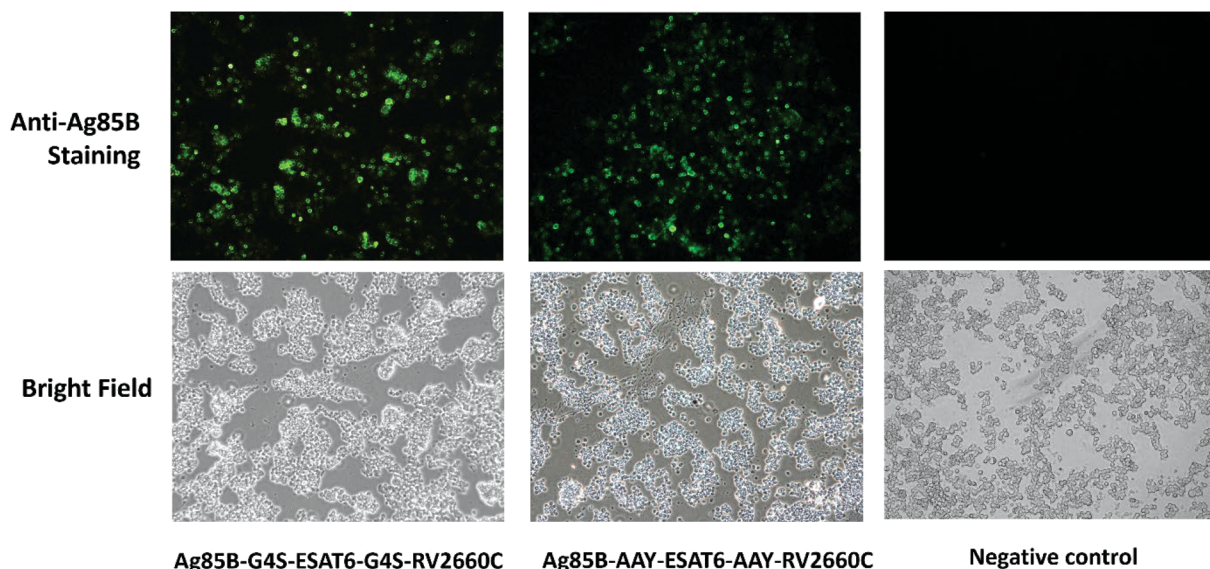


Figure 6. Immunofluorescence assay showing intracellular expression of TB antigens in HEK293 cells transfected with mRNA-LNP formulations (*Ag85B-G4S-ESAT-6-G4S-Rv2660c* mRNA and *Ag85B-AAV-ESAT-6-AAV-Rv2660c* mRNA). Green fluorescence indicated the expression of Ag85B in the transfected cells. Un-transfected HEK293 cells (negative control) exhibited no fluorescence, confirming the specificity of the observed signals. Images were captured at 10X magnification. Bright-field images show the overall morphology of the cells.

Discussion

This study successfully designed, synthesized, and encapsulated mRNA encoding MTB antigens into LNPs, demonstrating acceptable stability and efficient encapsulation, and target protein expression *in vitro*. These findings lay

the groundwork for the future development of mRNA-based TB vaccines.

Five antigen mRNA constructs were designed, including individual antigens (*Ag85B*, *ESAT-6*, and *Rv2660c*) and fusion proteins (*Ag85B-G4S-ESAT-6-G4S-Rv2660c* and

Ag85B-AAV-ESAT-6-AAV-Rv2660c). These constructs were modified for efficient expression in human cells and structural stability with codon optimization parameters ensuring compatibility with the transcription and translation machinery.⁽¹²⁾

pDNA templates for *in vitro* transcription were successfully constructed, with homology confirmed across all nucleotide sequences. It is essential to verify the sequence, particularly in the region of the poly(A) tail, as its length and composition directly influence mRNA stability and translation efficiency.⁽¹⁸⁾ To ensure the production of high-quality pDNA, the choice of *E. coli* strains and culture conditions played a crucial role in optimizing both yield and quality.⁽¹⁹⁾

mRNA synthesis was carried out using T7 RNA polymerase, with uridine triphosphate (UTP) replaced by N1-methylpseudouridine-5'-triphosphate and N7-methyl-3'-O-methylguanosine added to generate a cap 1 structure. These modifications significantly enhanced mRNA stability and translational efficiency while reducing innate immune activation.^(20,21) The synthesis was performed on a small-scale using LiCl precipitation for purification. However, scaling up production will likely require advanced chromatography techniques to achieve higher purity and yield.⁽²²⁾ Our study confirmed that the synthesized mRNAs were intact and aligned with the expected sizes for all five genes.

The use of mRNA-loaded lipid nanoparticles (mRNA-LNPs) for vaccination and disease treatment has gained significant attention due to their ability to enhance mRNA stability, facilitate cellular uptake, and elicit robust immune responses. A critical factor

in LNP formulation is achieving an optimal particle size, typically between 20 and 200 nm, to ensure stability in physiological fluids and effective tissue penetration.^(20,23,24) In this study, we employed a microfluidic device for mRNA-LNP synthesis, enabling precise control over particle size and high reproducibility. The resulting LNPs carrying fusion antigen mRNAs had an average diameter of approximately 140 nm (Table 1) and an mRNA encapsulation efficiency of about 80%, regardless of the specific mRNA used. These findings were consistent with prior studies indicating that LNPs within this size range supported efficient delivery and immunogenicity.^(20,23,24)

To ensure the safety and performance of mRNA-LNPs for future production, several additional analyses must be considered. These include physical characterization through visual inspection, evaluation of the lipid content after LNP formulation to ensure the desired ratio, and the determination of the optimal pH for the final formulation.^(25,26) It is important to note that RNA integrity analysis is critical to confirm the quality of the encapsulated mRNA. Depending on the *in vitro* transcription conditions and subsequent purification steps, various byproducts, such as double-stranded RNA (dsRNA), abortive RNAs, and RNA-DNA hybrids, may be generated. If these byproducts are not adequately removed, they could be co-formulated with the full-length mRNA and potentially trigger unwanted immune responses in host cells by activating host pattern recognition receptors.⁽²⁷⁾ Additionally, endotoxin testing is essential to ensure the safety of the LNPs, as endotoxin contamination could lead to unwanted inflammatory responses.

Two LNP formulations, GenVoy-ILM™ and Moderna-like formulation, were evaluated for their mRNA encapsulation efficiency, particle size, and physicochemical properties. Both formulations showed similar performance; however, under our laboratory conditions, the GenVoy-ILM™ formulation achieved slightly higher encapsulation efficiency, highlighting its potential as a promising candidate for vaccine development. Stability testing remains a crucial next step to assess long-term viability under different storage conditions, as temperature sensitivity is a known challenge for mRNA-based vaccines.⁽²⁸⁾

This work built upon existing mRNA vaccine technologies by incorporating enhanced design features, such as fusion constructs and chemical modifications, to improve mRNA stability and translational efficiency. Several vaccine platforms, including traditional live attenuated vaccines,⁽³⁾ protein subunit vaccines,⁽²⁹⁾ and viral vector vaccines⁽³⁰⁾ have been explored for TB. However, compared to these platforms, the mRNA approach offers significant advantages in terms of rapid production, scalability, and the ability to elicit robust humoral and cellular immune responses. Previous research has demonstrated that mRNA vaccines can effectively stimulate antigen-specific T-cell responses, a crucial factor for TB immunity.⁽³¹⁾ Moreover, fusion protein constructs may provide broader antigenic coverage, potentially enhance immune responses when compared to single-antigen vaccines. By encoding multiple antigens within a single mRNA construct, this approach allowed for a more comprehensive immune response, potentially improving vaccine efficacy against diverse *M. tuberculosis* strains.

While this study demonstrated promising potential, further research is needed to advance these mRNA constructs toward clinical application. We have designed and characterized mRNA vaccine candidates for tuberculosis (TB) prevention. The preliminary data presented in this study outline the design of templates incorporating antigens, including *Ag85B*, *ESAT-6*, and *Rv2660c*, used to create mRNA sequences encoding both individual and fusion antigens. These coding sequences were synthesized into mRNA via *in vitro* transcription and subsequently encapsulated into mRNA-LNPs. The resulting candidates exhibited results consistent with the original design. However, additional testing and further safety validation of the prototype vaccines are necessary, particularly to identify any potential contaminants or issues arising from the product itself. These tests must align with international safety standards before progressing to the preclinical stage.

Key next steps include evaluating their immunogenicity and protective efficacy in preclinical models, optimizing lipid LNP formulations for greater stability under varied conditions, and addressing scalability and cost considerations. Continued efforts in these areas will be essential for translating this platform into a viable TB vaccine.

Conclusion

This study successfully designed and synthesized five mRNA constructs encoding MTB antigens: *Ag85B*, *ESAT-6*, *Rv2660c*, and two fusion constructs; *Ag85B-G4S-ESAT-6-G4S-Rv2660c* and *Ag85B-AAY-ESAT-6-AAY-Rv2660c*, all of which had the intact

structures and expected sizes. Due to their greater secondary structure stability compared to single-antigen constructs, only the two fusion constructs were encapsulated into LNPs. Characterization of the mRNA-LNPs revealed that *Ag85B-AAY-ESAT-6-AAY-Rv2660c* mRNA-LNPs exhibited higher colloidal stability. Nevertheless, both mRNA-LNP formulations effectively delivered mRNA and facilitated robust protein expression in human cell lines. These findings highlight the potential of these mRNA constructs as promising candidates for tuberculosis vaccine development.

Acknowledgment

We gratefully acknowledge the Thailand Science Research and Innovation (TSRI) for their funding support of this research project through the National Vaccine Institute (NVI), Thailand, as Project No. 2566.1/22.

References

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2024. Geneva: World Health Organization; 2024.
2. Kiazayk S, Ball TB. Latent tuberculosis infection: an overview. *Can Commun Dis Rep* 2017; 43(3-4): 62-6.
3. Setiabudiawan TP, Reurink RK, Hill PC, Netea MG, van Crevel R, Koeken V. Protection against tuberculosis by *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) vaccination: a historical perspective. *Med* 2022; 3(1): 6-24.
4. กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. แผนปฏิบัติการระดับชาติ ด้านการต่อต้านวัณโรค ระยะที่ 2 (พ.ศ. 2566 - 2570). นนทบุรี: กองวัณโรค กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข; 2566.
5. Liu W, Xu Y, Yan J, Shen H, Yang E, Wang H. Ag85B synergizes with ESAT-6 to induce efficient and long-term immunity of C57BL/6 mice primed with recombinant *Bacille Calmette-Guerin*. *Exp Ther Med* 2017; 13(1): 208-14.
6. van Dissel JT, Arend SM, Prins C, Bang P, Tingskov PN, Lingnau K, et al. Ag85B-ESAT-6 adjuvanted with IC31 promotes strong and long-lived *Mycobacterium tuberculosis* specific T cell responses in naïve human volunteers. *Vaccine* 2010; 28(20): 3571-81.
7. Nemes E, Geldenhuys H, Rozot V, Rutkowski KT, Ratangee F, Bilek N, et al. Prevention of *M. tuberculosis* infection with H4:IC31 vaccine or BCG revaccination. *N Engl J Med* 2018; 379(2): 138-49.
8. Aagaard C, Hoang T, Dietrich J, Cardona PJ, Izzo A, Dolganov G, et al. A multistage tuberculosis vaccine that confers efficient protection before and after exposure. *Nat Med* 2011; 17(2): 189-94.
9. Bekker LG, Dintwe O, Fiore-Gartland A, Middelkoop K, Hutter J, Williams A, et al. A phase 1b randomized study of the safety and immunological responses to vaccination with H4:IC31, H56:IC31, and BCG revaccination in *Mycobacterium tuberculosis*-uninfected adolescents in Cape Town, South Africa. *EClinicalMedicine* 2020; 21: 100313. (11 pages).

10. Jenum S, Tonby K, Rueegg CS, Rühwald M, Kristiansen MP, Bang P, et al. A Phase I/II randomized trial of H56:IC31 vaccination and adjunctive cyclooxygenase-2-inhibitor treatment in tuberculosis patients. *Nat Commun* 2021; 12(1): 6774. (13 pages).
11. Xue T, Stavropoulos E, Yang M, Ragno S, Vordermeier M, Chambers M, et al. RNA encoding the MPT83 antigen induces protective immune responses against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect Immun* 2004; 72(11): 6324-9.
12. Al Tbeishat H. Novel In Silico mRNA vaccine design exploiting proteins of *M. tuberculosis* that modulates host immune responses by inducing epigenetic modifications. *Sci Rep* 2022; 12(1): 4645. (19 pages).
13. Vostrosablin N, Lim S, Gopal P, Brazdilova K, Parajuli S, Wei X, et al. mRNAid, an open-source platform for therapeutic mRNA design and optimization strategies. *NAR Genom Bioinform* 2024; 6(1): lqae028. (9 pages).
14. McKenzie RE, Minnell JJ, Ganley M, Painter GF, Draper SL. mRNA synthesis and encapsulation in ionizable lipid nanoparticles. *Curr Protoc* 2023; 3(9): e898. (47 pages).
15. Gambaro R, Rivero Berti I, Limeres MJ, Huck-Iriart C, Svensson M, Fraude S, et al. Optimizing mRNA-loaded lipid nanoparticles as a potential tool for protein-replacement therapy. *Pharmaceutics* 2024; 16(6): 771. (23 pages).
16. Mathews DH, Sabina J, Zuker M, Turner DH. Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J Mol Biol* 1999; 288(5): 911-40.
17. Pochapski DJ, Carvalho Dos Santos C, Leite GW, Pulcinelli SH, Santilli CV. Zeta potential and colloidal stability predictions for inorganic nanoparticle dispersions: effects of experimental conditions and electrokinetic models on the interpretation of results. *Langmuir* 2021; 37(45): 13379-89.
18. Gergen J, Petsch B. mRNA-based vaccines and mode of action. *Curr Top Microbiol Immunol* 2022; 440: 1-30.
19. Al-Allaf FA, Tolmachov OE, Zambetti LP, Tchetchelnitski V, Mehmet H. Remarkable stability of an instability-prone lentiviral vector plasmid in *Escherichia coli* Stbl3. *3 Biotech* 2013; 3(1): 61-70.
20. Chaudhary N, Weissman D, Whitehead KA. mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation. *Nat Rev Drug Discov* 2021; 20(11): 817-38.
21. Karikó K, Muramatsu H, Welsh FA, Ludwig J, Kato H, Akira S, et al. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Mol Ther* 2008; 16(11): 1833-40.
22. Feng X, Su Z, Cheng Y, Ma G, Zhang S. Messenger RNA chromatographic purification: advances and challenges. *J Chromatogr A* 2023; 1707: 464321. (14 pages).
23. Shi R, Liu X, Wang Y, Pan M, Wang S, Shi L, et al. Long-term stability and immunogenicity of lipid nanoparticle COVID-19 mRNA vaccine is affected by particle size. *Hum Vaccin Immunother* 2024; 20(1): 2342592. (11 pages).
24. Oberli MA, Reichmuth AM, Dorkin JR, Mitchell MJ, Fenton OS, Jaklenec A, et al. Lipid nanoparticle assisted mRNA delivery for potent

- cancer immunotherapy. *Nano Lett* 2017; 17(3): 1326-35.
25. Wu K, Xu F, Dai Y, Jin S, Zheng A, Zhang N, et al. Characterization of mRNA-LNP structural features and mechanisms for enhanced mRNA vaccine immunogenicity. *J Control Release* 2024; 376: 1288-99.
26. Ma Y, VanKeulen-Miller R, Fenton OS. mRNA lipid nanoparticle formulation, characterization and evaluation. *Nat Protoc.* [online]. 2025; [cited 2025 Mar 12]. Available from: URL: <https://doi.org/10.1038/s41596-024-01134-4>.
27. Lenk R, Kleindienst W, Szabó GT, Baierdörfer M, Boros G, Keller JM, et al. Understanding the impact of in vitro transcription byproducts and contaminants. *Front Mol Biosci* 2024; 11: 1426129. (16 pages).
28. Rosa SS, Prazeres DMF, Azevedo AM, Marques MPC. mRNA vaccines manufacturing: challenges and bottlenecks. *Vaccine* 2021; 39(16): 2190-200.
29. Zhang Y, Xu JC, Hu ZD, Fan XY. Advances in protein subunit vaccines against tuberculosis. *Front Immunol* 2023; 14: 1238586. (14 pages).
30. Hu Z, Lu SH, Lowrie DB, Fan XY. Research advances for virus-vectored tuberculosis vaccines and latest findings on tuberculosis vaccine development. *Front Immunol* 2022; 13: 895020. (16 pages).
31. Lukeman H, Al-Wassiti H, Fabb SA, Lim L, Wang T, Britton WJ, et al. An LNP-mRNA vaccine modulates innate cell trafficking and promotes polyfunctional Th1 CD4+ T cell responses to enhance BCG-induced protective immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *eBioMedicine* 2025; 113: 105599. (16 pages).

การออกแบบและการวิเคราะห์คุณลักษณะเบื้องต้น ของ *Ag85B-ESAT-6-Rv2660c* mRNA-Lipid Nanoparticles เพื่อการพัฒนาวัคซีนป้องกันวัณโรค

ปนัดดา เทพอัคร อภิชัย ประชาสุภาพ กชรัตน์ จงปิติทรัพย์ พันธธิดา ตริยวง ศิริวิทย์ เวทโอสถ

อนิชา เลื่องชัยเชวง รุจิราพร พิทักษ์สาลิ และ ภาณุพันธ์ ปัญญาใจ

สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ วัณโรคเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญในหลายประเทศทั่วโลก ปัจจุบันประเทศไทยถูกจัดให้เป็นกลุ่มประเทศที่มีภาระวัณโรคสูงของโลก (High Burden Country Lists) โดยมีอุบัติการณ์ผู้ป่วยวัณโรคสูงกว่าค่าเฉลี่ยของประชากรโลก วัคซีนบีซีจี (*Bacillus Calmette-Guérin*) เป็นวัคซีนเพียงชนิดเดียวที่ใช้ป้องกันวัณโรคชนิดรุนแรงในเด็ก แต่กลับพบว่ามีประสิทธิภาพในการป้องกันวัณโรคลดลงในผู้ใหญ่ ดังนั้นการวิจัยและพัฒนาวัคซีนวัณโรคชนิดใหม่ ๆ จึงมีความสำคัญเพื่อให้บรรลุเป้าหมายการยุติวัณโรคและการพัฒนายั่งยืนของประเทศไทย การศึกษานี้มุ่งเน้นการออกแบบและการวิเคราะห์คุณลักษณะของ mRNA สำหรับพัฒนาเป็นวัคซีนป้องกันวัณโรคโดยใช้แอนติเจนหลักสามชนิด ได้แก่ *Ag85B*, *ESAT-6* และ *Rv2660c* ซึ่งมีบทบาทในระยะต่าง ๆ ของการติดเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) ได้ดำเนินการออกแบบและสังเคราะห์ mRNA ทั้งหมด 5 ชนิด ในหลอดทดลอง ประกอบด้วย mRNA ของแอนติเจนเดี่ยว 3 รูปแบบ และรูปแบบ fusion ซึ่งประกอบด้วยแอนติเจนทั้งสามชนิด จำนวน 2 รูปแบบ โดยพบว่ารูปแบบ fusion ของ *Ag85B-G4S-ESAT-6-G4S-Rv2660c* mRNA และ *Ag85B-AAY-ESAT-6-AAY-Rv2660c* mRNA มีความเสถียรสูงกว่ารูปแบบแอนติเจนเดี่ยว และเมื่อนำ mRNA รูปแบบ fusion มาห่อหุ้มในอนุภาคไขมันนาโน (mRNA-LNPs) พบว่ามีประสิทธิภาพการห่อหุ้ม (%Encapsulation Efficiency) สูง โดยมีขนาดอนุภาคสม่ำเสมอเฉลี่ยประมาณ 140 นาโนเมตร และมีความคงตัวสูง นอกจากนี้เมื่อนำส่ง mRNA-LNPs เข้าสู่เซลล์ HEK293 พบว่าการแสดงออกของโปรตีนรูปแบบ fusion ซึ่งยืนยันโดยการย้อมด้วยแอนติบอดีจำเพาะต่อแอนติเจนของเชื้อวัณโรค ดังนั้น modified *Ag85B-ESAT-6-Rv2660c* mRNA ที่สร้างขึ้นจึงมีคุณลักษณะเหมาะสม และมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นวัคซีนป้องกันวัณโรคต่อไป

คำสำคัญ: วัณโรค, วัคซีน mRNA, *Ag85B-ESAT-6-Rv2660c*, อนุภาคไขมันนาโน

Preparation of Lyophilized Reference Standard Anti-SARS-CoV-2 Antibody

Assajun Amen¹, Sompong Sapsutthipas², Bhurit Songthanant¹,
Kanitta Phuwanartnaranubarn¹, and Supaporn Phumiamorn³

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

²*Medical Life Sciences Institute, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand*

³*Medical Sciences Technical Office, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand*

ABSTRACT High-quality vaccines that meet specific standards are the primary measures during the COVID-19 pandemic. Information on vaccine quality control and testing for anti-SARS-CoV-2 neutralizing antibodies against different variants is beneficial for developing vaccination policies and models to be used. The World Health Organization has established international antibody standards, which are still limited. This study aimed to develop the reference standard anti-SARS-CoV-2 antibody for Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT), the gold standard for detecting neutralizing antibody against each SARS-CoV-2 variant, as for quality control of SARS-CoV-2 vaccines and for testing neutralizing antibody levels after vaccination. Serum antibodies in the form of lyophilized sera were tested comparatively to the lyophilized anti-SARS-CoV-2 monoclonal antibody (mAb). The serum antibody and mAb formulations were prepared, and freeze-drying conditions were optimized. After the quality of the freeze-dried serum antibodies was evaluated, the homogeneity of the mAbs did not meet the acceptance criteria, while that of the lyophilized pooled serum antibody was found to be physically and biologically acceptable as a reference standard. The serum antibody samples were tested against the Delta, Omicron BA.2, and Omicron BA.5 variants in terms of the PRNT₅₀ titer (95% confidence interval) as 512.97 (473–556), 288.14 (265–313), and 161.49 (124–184), respectively. Post-production potency tests of actual utilization were conducted for stability assessment, and the results were within the acceptance criteria (geometric mean $\pm$ 3 SD). Therefore, the pooled serum antibody is suitable as the reference standard antibody against SARS-CoV-2 for vaccine quality control and for evaluating post-vaccination immune response during the COVID-19 pandemic.

Keywords: Reference standard SARS-CoV-2 antibody, PRNT, Lyophilization

Corresponding author E-mail: assajun.a@dmsc.mail.go.th

Received: 30 October 2024

Revised: 6 May 2025

Accepted: 8 May 2025

Introduction

The development and evaluation of vaccines and testing methods require traceable reference standards, generally provided by recognized international agencies such as the National Institute for Biological Standards and Controls (NIBSC), the United Kingdom. Since the standard anti-SARS-CoV-2 antibodies provided by NIBSC are still insufficient for immunization testing in vaccinated individuals and for calibration use worldwide, the World Health Organization (WHO) recommends that any country develop its reference standards. Thailand faces several problems in the supply of reference standards, such as logistical challenges, higher costs, and access delays when relying solely on international standards. Reference standards are useful and necessary for National Control Laboratories (NCLs). The key properties of a biological standard are homogeneity and stability. Anti-SARS-CoV-2 antibodies contain proteins as active ingredients, which are sensitive to thermal degradation. The lyophilization process results in high stability of biological products with a long shelf-life,⁽¹⁻⁵⁾ thus, drying the products at low temperatures under vacuum conditions effectively maintains the protein's physical and chemical properties.

There are two main methods for measuring neutralizing antibodies: the Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT) and the Pseudo-typed Virus-based Neutralization Assay (PVNA). The PRNT method is a gold standard exhibiting high sensitivity and specificity. Therefore, this study prioritized PRNT as the primary method for establishing the vaccine potency, which is crucial for assigning potency values for the reference standard anti-SARS-CoV-2 antibodies. However, the PRNT is time-

consuming and requires live viruses, posing an infection. The PVNA method utilizes pseudo-typed virus particles, modified to contain specific proteins or receptors that bind specific immune response components. This method is faster and safer but may not be as sensitive or specific as the live virus PRNT method. Although antibodies are currently available for each strain of the virus, the test results are different, leading to doubts regarding the accuracy of antibody level measurements in each method.^(6,7) Therefore, a reference standard for anti-SARS-CoV-2 antibodies can be used to compare the values obtained by different methods, which leads to the need to establish a reference standard for anti-SARS-CoV-2 antibodies.

The Institute of Biological Products (IBP), Department of Medical Sciences, Thailand, acts as the national control laboratory for vaccines and biological products and complies with the competence requirements for reference material producers according to ISO 17034:2016. Therefore, the IBP has the potential to serve as the national reference standard for anti-SARS-CoV-2 antibodies. This study hypothesized that the preparation of the lyophilized anti-SARS-CoV-2 antibodies reference standard by IBP would be suitable and useful for the vaccine quality control and testing for anti-SARS-CoV-2 antibodies against diverse virus variants.

Materials and Methods

Materials

SARS-CoV-2

The SARS-CoV-2 viruses used in this study were provided by the National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Thailand. These included the Delta (Reference no. COV2071), Omicron BA.2 (Reference no.

SEQ/22-348), and Omicron BA.5 (Reference no. SEQ/22-17241) variants.

Human serum

Twenty-one heat-inactivated convalescent serum samples from COVID-19 patients, collected within 60 days after testing negative for the virus, and vaccinated individuals having PRNT50 titers against the SARS-CoV-2 Delta strain, 513.34–1,237.00, were pooled. The sera were obtained from the study project on “Monitoring of SARS-CoV-2 Antibody Levels after Vaccination against COVID-19 (Research project code 11/2564)” that were negative for HBsAg, Anti-HIV, and HCV.^(8,9)

Monoclonal antibody

Monoclonal antibody (mAb) was obtained from the Center of Excellence in Systems Biology, Chulalongkorn University, Thailand, which was specific to the SARS-CoV-2 receptor-binding domain (RBD) 3D2 at a concentration of 4.97 mg/mL, and met the following criteria: concentration ≥ 0.5 mg/mL expression host mammalian; purity $\geq 90\%$ (SDS-PAGE) and 98% (SEC-HPLC); endotoxin ≤ 0.1 EU/mg; and the anti-SARS-CoV-2 antibody titer $\geq 1,000$ units (PRNT against Delta).^(8,9)

WHO international standard

WHO international standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human) NIBSC code: 20/136 (NIBSC, UK)^(8,9).

Methods

Preparation of pooled serum

The pooled serum antibody consisted of 50% (v/v) serum and 50% (v/v) Milli-Q

ultrapure water (Sigma-Aldrich, USA). The monoclonal antibody formulations were prepared as 0.0566% (w/v) mAbs, 0.0357% (w/v) L-histidine HCl monohydrate, 0.0357% (w/v) L-histidine, 0.0357% (w/v) trehalose dihydrate, and 0.01% (v/v) polysorbate 20.

Lyophilization

The collapse temperature was tested using freeze-drying microscopy (Linkam FDSC196, Linkam Scientific Instruments Ltd., UK), and the average subsidence temperature was recorded to calculate the primary freeze-drying temperature to set the lyophilization conditions. Serum antibody samples were tested in triplicate. The collapsing temperature was obtained at -15 , -16.6 , and -17.8°C , with a mean value of -16.5°C . Therefore, the primary drying temperature was set at -21°C ($3-5^{\circ}\text{C}$ less than the collapsing temperature). Each 0.5 mL serum antibody was added into 3-mL borosilicate type I glass clear vials (Schott, Indonesia) under sterile conditions, and a half-close rubber stopper (4405/50 Gray; West Pharmaceutical Services, Inc., USA) was placed over. The conditions obtained were used to program the lyophilizer (LyoLab LT; Lyophilization Systems Inc., USA). The serum vials were frozen at -40°C for 180 min, followed by primary drying at -21°C and 0°C under a 200-mTorr vacuum for 1,180 min, and a 200-mTorr vacuum for 1,000 min. This was followed by secondary drying at 25°C under 100-mTorr for 360 min. Vials were then backfilled with 99.999% nitrogen gas. The formulated mAb was tested in triplicate by freeze-drying microscopy. The collapsing temperatures were -28.8 , -28.9 , and -28.6°C , with a mean of -28.8°C ; therefore, the primary

drying temperature was set at -34°C . For lyophilization, mAb vials were frozen at -60°C for 180 min, followed by primary drying at -34°C under a 200-mTorr vacuum for 2,560 min. This was followed by secondary drying at 25°C under a 100-mTorr vacuum for 300 min. Vials were then backfilled with 99.999% nitrogen gas.

Quality control testing (visual inspection and moisture content testing)

The physical characteristics of lyophilized serum and anti-SARS-CoV-2 mAb were observed and recorded by visual inspection for 10 vials before and after dissolution. After dissolution, the lyophilized serum and mAb samples were reconstituted in 0.5 mL of distilled water for 180 seconds; the reconstitution time was determined for 10 vials. The moisture content of 3 vials was determined using volumetric Karl-Fischer titration.⁽¹⁰⁾ The recommended moisture content is not more than 3%.

Assessment of homogeneity and stability

The homogeneity was assessed to show the uniformity of the pooled serum in each container. A production plan using a balanced nested design, which ensures statistical consistency across replicate measurements by maintaining equal sample units per run, thereby improving variance estimation and simplifying ANOVA analysis, was implemented. A PRNT test against the Delta strain was developed to assess the homogeneity of lyophilized serum antibodies in each container. Twelve vials were tested for 3 days, with four vials tested each day and two replicates per vial. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA with

the replicates.^(11,12) Homogeneity was assessed by comparing the between-unit component of variance from a homogeneity study, expressed as a between-unit standard deviation (S_{bu}) with the coefficient of variation (CV) obtained from a collaborative study on the international reference preparation (IRP) of anti-SARS-CoV-2 antibody (NIBSC Code No. 20/136) using the PRNT method. The criterion for homogeneity was set at $S_{bu} < \text{CV}/3$. For stability assessment, post-production monitored stability testing was conducted at -20°C or below. The stability monitoring involved evaluating potency based on actual usage data, with predefined acceptance criteria set as within the geometric mean ± 3 standard deviations. The production plan involved monitoring the use of the products and notifying customers if the criteria values were not met (geometric mean $+3$ standard deviations) through the institutional communication channel.

The anti-SARS-CoV-2 neutralizing antibody determination

The lyophilized pooled serum was independently determined to have the levels of anti-SARS-CoV-2 neutralizing antibody using the PRNT, PVNA, and Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) methods against the Delta, Omicron BA.2, and Omicron BA.5 variants as the methods described. Twelve vials were tested over 3 days, with 4 vials tested each day against the international standard anti-SARS-CoV-2 antibody.

Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT)

In this study, the PRNT was developed and validated by the Institute of Biological Products

(IBP), Department of Medical Sciences, Thailand.⁽¹³⁾ Vero cells were cultured in 6-well clear tissue culture-treated multiple well plates (Corning, USA) at a density of 2×10^5 cells/well/3 mL and incubated at 37°C with 5% CO₂ for 1 day. The lyophilized serum was initially diluted to 1:10, 1:40, 1:160, and 1:640. Then, the SARS-CoV-2 virus was diluted in Minimum Essential Medium Eagle (MEM) (Sigma-Aldrich, USA) to yield 40–120 plaques/well in the virus control wells. Cell control wells, convalescent patient serum, and normal human serum were used as the assay controls. Neutralization was achieved by mixing an equal volume of diluted sera with the SARS-CoV-2 virus at 37°C in a water bath for 1 h. After removing the culture medium from the Vero cell culture plates, 200 µL of the virus-serum antibody mixture was added to the monolayer cells, and the plates were shaken every 15 min for 1 h. After removing the excess virus, 3 mL of semi-solid medium containing 1% carboxymethylcellulose (Sigma-Aldrich, USA), 1% penicillin-streptomycin (Sigma-Aldrich, USA), and 10% FBS (Gibco, USA) was overlaid. All plates were incubated at 37°C with 5% CO₂ for 7 days. Cells were then fixed with 10% formaldehyde (Sigma-Aldrich, USA) and stained with 0.5% crystal violet (Merck, USA) in PBS (Gibco, USA). The number of viral plaques was counted in triplicate wells, and the percentage of plaque reduction at 50% (PRNT₅₀) was calculated. The PRNT₅₀ titer of the test sample was defined as the reciprocal of the highest test serum dilution for which virus infectivity was reduced by 50% compared with the average plaque counts of the virus control, which was calculated using a four-point linear regression method. Plaque

counts for all serial dilutions of serum were scored to ensure a dose-response.

Pseudo-typed Virus-based Neutralization Assay (PVNA).

PVNA used in this study was performed according to the method published by the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Thailand.⁽¹⁴⁾ To determine the neutralizing activity of the lyophilized serum samples, a two-fold serial dilution of the sera was prepared starting at 1:40 in the culture medium of high-glucose DMEM (Gibco, USA) without FBS. The serum samples were mixed with the pseudo-typed viruses containing the CoV-2 spike of interest at a ratio of 1:1 (v/v) in a 96-well plate (Corning, USA). The pseudo-typed virus input was normalized to 1×10^5 RLU/well. The serum-pseudo-typed virus mixture was then incubated at 37°C for 1 h. Cell suspensions of HEK293T-ACE-2 pre-transfected with pCAGGS expressing human TMPRSS2 (2×10^4 cells/mL) were then mixed with the serum-pseudo-typed virus mixture and seeded into each well of the culture plates and incubated at 37°C for 48 h. Neutralizing antibodies were determined by the luciferase activity.⁽¹³⁾

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

The ELISA was validated by the Institute of Biological Products (IBP), Department of Medical Sciences, Thailand. An anti-SARS-CoV-2 QuantiVac ELISA (IgG) test kit (Cat No. EI 2606-9601-10G; EUROIMMUN, USA) was used. The SARS-CoV-2 IgG antibody concentration in serum was determined by its reaction with SARS-CoV-2 antigen coated in

wells, forming an Ag-Ab complex. The addition of peroxidase-labelled anti-human IgG triggered a color change upon reaction with TMB/H₂O₂ substrate, which was measured at 450 nm with a reference wavelength of 630 nm (620–650 nm). The antibody concentration was directly proportional to the absorbance, and results were calculated using point-to-point comparison with standard material by 4-parameter logistic regression. The results were reported in Binding Antibody Units (BAU). This test kit does not differentiate between viral strains because it detects the presence of antibodies against the SARS-CoV-2 antigen, which is common to all strains, rather than identifying specific viral variants.⁽¹⁵⁾

Statistical Analysis

The geometric mean was used to represent the central tendency of a skewed set of antibody-level data, and the 95% confidence interval of the geometric mean represented the range of estimates. The % Coefficient of Variation (%CV) is a measure of variation in a set relative to the mean of the antibody-level data. The *p*-value obtained from the Shapiro-Wilk normality test is a measure of the tendency of antibody-level data sets to follow a normal distribution. If the *p*-value was < 0.05, it was concluded that the data were not normally distributed. If the F-test yielded a *p*-value < 0.025, it was concluded that the variances of the two antibody-level data sets from different methods significantly differed. For normally distributed data sets, if the *t*-test yielded a *p*-value < 0.05, it was concluded that the means of the two antibody-level data sets were significantly

different. For non-normally distributed data sets, if the Mann-Whitney test yielded a *p*-value < 0.05, it was concluded that the medians of the two data sets were significantly different. As the two data sets were derived from different methods, the data were transformed before different testing of the means or medians using the proportion of the geometric mean of the antibody-level data sets of the two methods. To compare different species using the same test method, one-way ANOVA and Tukey's test were used for a normal distribution, and Kruskal-Wallis and Dunn's multiple comparison tests for a non-normal distribution, with a *p*-value < 0.05 was used to determine statistical significance. Homogeneity was assessed using two-way ANOVA with replication. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism Version 5 software (GraphPad Software, USA) and Microsoft Excel 2016.

Results

Characteristics of the lyophilized pooled serum and anti-SARS-CoV-2 monoclonal antibody

Details of the pooled serum and anti-SARS-CoV-2 mAb before and after lyophilization (Lyophilized products) were summarized in Table 1. The lyophilized pooled serum (Lot No. Lyo-110122) and mAbs (Lot No. Lyo-Ab170122) exhibited distinct post-lyophilization physicochemical profiles. Both formulations were filled at 0.5 mL per vial, with 393 and 568 vials prepared, respectively. The pooled serum presented as a coagulated dry powder and reconstituted into a yellow solution with particulate formation in 80% of tested vials,

whereas the mAbs formed a clear solution from a white freeze-dried powder. Residual moisture content was $2.43 \pm 0.15\%$ for pooled serum and $3.65 \pm 2.23\%$ for mAbs. Reconstitution time differed markedly, with pooled serum requiring 140.4 ± 0.41 seconds versus 10.90 ± 0.88 seconds for mAbs. Mean fill mass was comparable (0.52 g/vial vs. 0.53 g/vial), but homogeneity was sufficient only in the pooled serum, indicating superior formulation robustness relative to the mAbs. All quality control tests for the lyophilized pooled serum met the acceptable criteria, except for the appearance of the serum after dissolution, which showed a white fibrin line. This could be

verified by the homogeneity assessment. While the mean of residual moisture of the lyophilized mAb was higher than 3%, which might affect the homogeneity.

Homogeneity was assessed by comparing the CV of eight values of the collaborative study WHO International Standard of anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human) (NIBSC Code No. 20/136), measured by the PRNT method, using the SD of the homogeneity test. The pooled serum Lot No. Lyo-110122 demonstrated sufficient homogeneity, while the mAb Lot No. Lyo-Ab170122 formulation was insufficiently homogeneous.

Table 1 Characteristics of the pooled serum and anti-SARS-CoV-2 monoclonal antibody (mAb) before and after lyophilization (Lyophilized products).

Details (Before lyophilization)	Pooled serum	mAb
Antibody content Criteria	21 serum samples (convalescent patients and vaccinated persons) - HbsAg Anti-HIV and HCV were negative - Potency PRNT ₅₀ titers ≥ 500 (PRNT (Delta))	Protein Name: 3D2 - Concentration ≥ 0.5 mg/mL, Purity $\geq 90\%$ (SDS-PAGE) and 98% (SEC-HPLC) - Endotoxin ≤ 0.1 EU/mg Antibody titer ≥ 1000 units: PRNT (Delta)
Formulation	serum 50% and Milli-Q® ultrapure water 50%	L-histidine HCl monohydrate, 0.0566%; L-histidine, 0.0357%; Trehalose dihydrate, 0.0357%; Polysorbate 20, 0.01%.
Nominal fill volume	0.5 mL	0.5 mL
Product code (Lot No.)	Lyo-110122	Lyo-Ab170122
Number of prepared vials	393 vials	568 vials
Appearance before dissolution	Coagulated dry powder	White freeze-dried powder
Appearance after dissolution	A yellow solution with one white line per vial; found in 8 out of 10 vials	clear solution
Mean residual moisture (%)	2.43 ± 0.15 (n = 3)	3.65 ± 2.23 (n = 3)
Reconstitution time	140.4 ± 0.41 (n = 10)	10.90 ± 0.88 (n = 10)
Mean fill mass	0.52 g/vial (CV 0.73%, n = 10)	0.53 g/vial (CV 0.89%, n = 10)
Homogeneity	sufficient	insufficient

The anti-SARS-CoV-2 neutralizing antibody determination

Comparison of antibody levels against the SARS-CoV-2 Delta, Omicron BA.2, and Omicron BA.5 variants tested with the PRNT₅₀, PVNA, and ELISA methods of the lyophilized pooled serum Lot No. Lyo-110122 were shown in Table 2 and Figure 1. These showed neutralizing activities against the SARS-CoV-2 Delta, Omicron BA.2, and Omicron BA.5 variants.

Whereas the lyophilized mAbs Lot No. Lyo-Ab170122 only specifically responded to the SARS-CoV-2 Delta variant and had a low response to the Omicron BA.2 using the PRNT method, as shown in Table 3. The WHO international standard 20/136 showed a significant response to the Delta and a low response to the Omicron BA.2 variants using the PRNT method. The PVNA method showed no response to either Omicron BA.2 or BA.5.

Table 2 Comparison of neutralizing antibody levels against the SARS-CoV-2 Delta, Omicron BA.2, and Omicron BA.5 variants tested with the PRNT₅₀, PVNA, and ELISA methods of the lyophilized pooled serum Lot No. Lyo-110122.

Vials	Delta		BA.2		BA.5		ELISA BAU /mL
	PRNT	PVNA	PRNT	PVNA	PRNT	PVNA	
1 (d1)	517.00	167.66	287.00	163.60	139.00	244.68	2,551.00
2 (d1)	512.00	168.30	349.00	196.29	273.00	303.30	2,881.00
3 (d1)	552.00	175.13	254.00	200.08	140.00	344.23	2,701.00
4 (d1)	654.50	173.08	312.00	201.73	146.00	324.55	2,221.00
5 (d2)	480.50	167.60	231.00	211.97	149.00	221.93	3,000.00
6 (d2)	525.00	168.85	289.00	247.24	167.00	198.62	2,931.00
7 (d2)	507.50	167.63	271.00	266.38	189.00	241.35	2,784.00
8 (d2)	574.50	210.11	289.00	347.47	72.00	295.92	2,794.00
9 (d3)	422.50	161.56	283.00	205.09	123.00	184.63	2,991.00
10 (d3)	474.50	162.57	256.00	214.78	156.00	167.51	2,822.00
11 (d3)	418.50	158.63	373.00	210.66	174.00	250.22	2,663.00
12 (d3)	562.50	162.14	292.00	233.07	160.00	191.91	3,093.00
Geometric mean	512.97	169.84	288.14	150.98	221.03	241.20	2,776.24
(95%CI)	(473–556)	(162–178)	(265–313)	(196–249)	(124–184)	(208–280)	(2,623–2,938)
%CV	12.80	7.90	13.73	21.09	30.97	24.14	8.48
Compare	PRNT ₅₀ /PVNA	3.02	PRNT ₅₀ /PVNA	1.30	PRNT ₅₀ /PVNA	0.63	–
Shapiro-Wilk	0.0002	no	0.4640	yes	0.3430	yes	–
(normal distribution)							
t-test	nc	nc	0.0012	s	0.0004	s	–
Mann-Whitney	0.0000	s	nc	nc	nc	nc	–
WHO 20/136(d1)	51.00	125.05	<10	0	10	0	–
WHO 20/136(d2)	31.00	272.86	12	0	<10	0	–
WHO 20/136(d3)	53.00	104.21	20	0	<10	0	–

Note: s = significant, ns = not significant, nc = not calculated, d = day, WHO 20/136 diluted to 50 IU/mL, WHO 20/136 = First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human) NIBSC code: 20/136, PRNT = Plaque Reduction Neutralization Test, PVNA = Pseudo-typed Virus Neutralization Assay, ELISA = Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Delta = SARS-CoV-2 Delta variant, BA.2, BA.5 = Sublineages of the Omicron variant and BAU = Binding Antibody Units

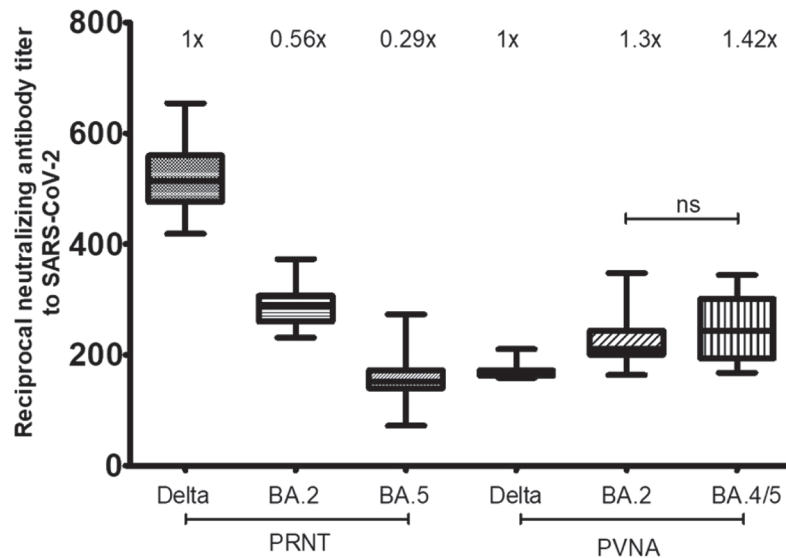


Figure 1 Comparison of neutralizing antibody levels of the lyophilized pooled serum Lot No. Lyo-110122 against the Delta, BA.2, and BA.5 SARS-CoV-2 variants using the PRNT and PVNA test methods. The Kruskal–Wallis and Dunn’s multiple comparison tests were used, and $p < 0.05$ indicated significance (ns = not significant)

Table 3 Comparison of neutralizing antibody levels against the SARS-CoV-2 Delta and Omicron BA.2 variants tested with the PRNT₅₀ method of the lyophilized mAbs Lot No. Lyo-Ab170122.

Vials	Delta	BA.2
1 (d1)	3,580.00	< 10
2 (d1)	2,404.50	< 10
3 (d1)	3,625.00	10.00
4 (d1)	3,649.00	15.00
5 (d2)	2,912.50	< 10
6 (d2)	2,881.00	12.00
7 (d2)	3,297.00	10.00
8 (d2)	2,563.00	12.00
9 (d3)	1,561.50	< 10
10 (d3)	2,188.50	< 10
11 (d3)	1,967.00	< 10
12 (d3)	1,937.50	< 10
Geometric mean (95%CI)	2,621.10 (2,236–3,072)	nc
%CV	27.57	nc
WHO 20/136 (d1)	55.00	< 10
WHO 20/136 (d2)	46	12
WHO 20/136 (d3)	45	20

Note: nc = not calculated, d = day, WHO 20/136 diluted to 50 IU/mL, WHO 20/136 = First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human) NIBSC code: 20/136, Delta = SARS-CoV-2 Delta variant and BA.2 = Sub-lineages of the Omicron variant

Discussion

The preparation of pooled serum and monoclonal antibodies (mAbs) showed clear differences in stability during freeze-drying. Pooled human serum needed only water in its formulation with no added stabilizers because it stayed naturally stable during lyophilization.⁽¹⁶⁾ By contrast, mAbs usually need complex stabilizer mixtures. This high stability of human serum comes from its natural composition, which allows it to withstand freeze-drying well. Human serum also serves as a protective agent (lyoprotectant) for other biological samples during freeze-drying, giving it two valuable roles in biological preservation.⁽¹⁷⁾

The appearance of lyophilized serum antibodies after reconstitution, which appeared as a white fibrin line, could be affected by incomplete clotting during serum collection. This might occur because of the conversion of fibrinogen into fibrin.⁽¹⁸⁾ Fibrin deposition can interfere with the formation and counting of viral plaques, leading to inaccurate results. Conversely, fibrin deposition can create a background signal that interferes with plaque counting and leads to overestimating the antibody titer⁽¹⁹⁾. The results of the homogeneity assessment showed that fibrin did not sufficiently affect the antibodies to cause inhomogeneity. To prevent fibrin formation, it is important to allow complete blood clotting before separating serum. After separation, the serum was stirred, filtered, and gently stirred again before being filled into the vial. On the contrary, the Lot. No. Lyo-Ab170122 mAb formulation showed insufficient homogeneity. This issue might be attributed to the mean residual

moisture of the mAbs over 3%. High residual moisture levels can lead to protein denaturation, consequently affecting the homogeneity of the formulation.⁽²⁰⁾

The neutralizing antibody of the WHO international standard 20/136 to the SARS-CoV-2 Delta variant obtained using the PVNA method was significantly higher than that of the PRNT₅₀ method, but the antibody levels against Omicron BA.2 and BA.5 were < 20 by both methods. Previous data were consistent with those of our study, determining the antibody level of the WHO international standard 20/136 prepared from convalescent patient sera during the Delta strain outbreak and previous outbreak strains.⁽²¹⁾ Following WHO guidelines, the relative potency of the secondary standard against the international standard in IU/mL was determined using parallel-line analysis. This approach was the preferred option for data analysis.⁽²²⁾ However, it should be noted that this approach should only be performed when the WHO standard is appropriately responsive to the SARS-CoV-2 variant/s being studied. Previous research on anti-SARS-CoV-2 antibody titers has been limited in terms of reporting values in international units per milliliter (IU/mL). The PRNT₅₀ method is widely accepted and frequently used for quantifying SARS-CoV-2 antibodies^(6,7) and was chosen as the appropriate method for our study, which was sufficient for the intended purpose.

The level of neutralizing antibodies in the lyophilized serum Lot No. Lyo-110122 was determined using different methods and compared using means or medians (according to the data

distribution). The antibody level of the PRNT₅₀ method showed significant differences of neutralizing antibodies to the Delta, Omicron BA.2, and BA.5, which were 3.02-, 1.3-, and 0.63-fold that of the PVNA, respectively (PRNT₅₀ divided by PVNA). While the ELISA effectively detected antibodies against SARS-CoV-2, it could not differentiate between responses to specific variants or lineages. This is primarily because conventional ELISAs utilize conserved or ancestral viral antigens. Antibodies generated following infection with different variants commonly display considerable cross-reactivity with these antigens, preventing discrimination based on overall binding signal. Distinguishing variant-level responses requires assays specifically designed to capture differential antibody binding to variant-specific epitopes or assess neutralizing activity.⁽¹⁵⁾

Determination of neutralizing antibodies against different live SARS-CoV-2 variants using the PRNT₅₀ method revealed significant differences in antibody titers against the Delta and Omicron variants. The neutralizing antibodies against the Omicron variants BA.2 and BA.5 also showed a substantial reduction, 0.56- and 0.29-fold, respectively, relative to the Delta variant. Our data also showed that the antibody titers of the Delta and Omicron BA.5 variants were 1.78- and 0.52-fold relative to Omicron BA.2, respectively, corresponding to the study which has reported the neutralizing antibody levels of the 1st generation vaccinated and recovered patients in 2020 during the outbreak of the Delta and earlier variants.⁽¹⁴⁾ There was also another report describing the

antibody levels against Omicron BA.5 0.22- and 0.67-fold relative to Omicron BA.2.⁽⁶⁾ Moreover, the level of neutralizing antibodies to different variants by the PVNA method showed that the median level to the Delta strain was significantly different from that of Omicron BA.2 and BA.5. In contrast, the median antibody level of Omicron BA.2 was comparable to that of BA.5 with non-significant differences, and compared with each other, the level of neutralizing antibodies was 1-, 1.3-, and 1.42-fold relative to the Delta variant, respectively, differing from the PRNT method. The advantage of the PVNA method is that it can be performed in biosafety level 2 (BSL2) and takes only 2 days to finish testing, whereas the PRNT requires biosafety level 3 (BSL3) and takes 3-7 days after the incubation period with the virus.^(6,7)

In the aspect of homogeneity, sufficient homogeneity was observed in the evaluation of the lyophilized pooled serum prepared Lot No. Lyo-110122. The geometric mean was within ± 3 standard deviations, indicating that it had properties as a reference standard antibody. As a consequence, the data generated from this study provided a valuable foundation for developing reference standards for other SARS-CoV-2 variants. For the establishment of this reference standard, it is not used as a secondary reference standard since its value was not defined in IU, but in PRNT₅₀ titers, the value of which was sufficient and widely accepted as a reference standard for quality control of COVID-19 vaccines and the measurement of the immune responses.

However, improving the sensitivity of the PVNA method to match that of the PRNT is

critical to enable more rapid testing, be safer without using the live virus, and be practical in laboratories lacking BSL-3 facilities, particularly in rural areas. Strengthening inter-agency collaboration among research institutes, hospitals, and vaccine manufacturers to share data and updated standards is essential for maintaining the relevance and effectiveness of these materials. Given Thailand's experience with multiple COVID-19 waves and the rapid spread of variants like Delta and Omicron, these measures are vital for ensuring timely and accurate responses to future public health challenges.

Post-production stability of the reference standard was assessed at -20°C or below through potency evaluation using actual usage data against ± 3 standard deviation criteria. Control charting of these data enabled trend analysis to predict when stability would fall outside these limits. This predictive capacity facilitates timely decisions regarding the preparation of subsequent lots to ensure continuous availability, and conversely, informs discontinuation if the strain or variant is no longer relevant.

Conclusion

Evaluation results of the standard antibody Lot No. Lyo-110122 exhibited suitable physical and biological characteristics to use as a reference standard antibody against SARS-CoV-2 in lyophilized form for vaccine quality control and neutralizing antibody testing in vaccinated populations. Standard antibody levels against the SARS-CoV-2 Delta variant were determined by PRNT

at 512.97 (473–556) (Geometric mean, 95% CI), Omicron variants BA.2 at 288.14 (265–313), and BA.5 at 161.49 (124–184). For further research, one should also consider testing for SARS-CoV-2 variants that are endemic at particular times.

Acknowledgments

We would like to express our sincere gratitude to Dr. Samaporn Teeravechyan and Dr. Kanjana Srisutthisamphan, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Thailand, as well as to Dr. Pilailuk Akkapaiboon Okada, National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Thailand, for helping in the PVNA and ELISA testing, respectively. Additionally, we would like to thank Dr. Trairak Pisitkun, Center of Excellence in Systems Biology, Chulalongkorn University, Thailand, for kindly providing the mAbs used in this study. This work was supported by Thailand's National Vaccine Institute (NVI), Thailand, as the grant number "NVI 2565.1/2".

References

1. Rey L, May JC. Freeze-drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products. 2nd ed. New York: Marcel Dekker; 2004.
2. Naddafi K, Moosavi GH, Mesdaghinia AR. Evaluation of lyophilization effects on operational parameters and characteristics of activated sludge. *Iranian J Env Health Sci Eng* 2004; 1(1): 20–5.

3. Matejtschuk P, Perrie Y, Gurney R. Freeze-drying microscopy-unravelling the complexities of freeze-drying pharmaceuticals with advanced microscopy techniques. *Drug Dev Deliv*. [online]. 2022; [cited 2024 Oct 25]; [5 screens]. Available from: URL: <https://drug-dev.com/freeze-drying-microscopy-unravelling-the-complexities-of-freeze-drying-pharmaceuticals-with-advanced-microscopy-techniques-2>.
4. Barresi AA, Ghio S, Fissore D, Pisano R. Freeze-drying of pharmaceutical excipients close to collapse temperature: influence of the process conditions on process time and product quality. *Dry Technol* 2009; 27(6): 805-16.
5. Haeusera C, Goldbach P, Huwyler J, Friess W, Allmendinger A. Impact of dextran on thermal properties, product quality attributes, and monoclonal antibody stability in freeze-dried formulations. *Eur J Pharm Biopharm* 2020; 147: 45-56.
6. Cheng SS, Mok CK, Li JK, Ng SS, Lam BH, Jeevan T, et al. Plaque-neutralizing antibody to BA.2.12.1, BA.4 and BA.5 in individuals with three doses of BioNTech or CoronaVac vaccines, natural infection and breakthrough infection. *J Clin Virol* 2022; 156: 105273. (7 pages).
7. Bewley KR, Coombes NS, Gagnon L, McInroy L, Baker N, Shaik I, et al. Quantification of SARS-CoV-2 neutralizing antibody by wild-type plaque reduction neutralization, microneutralization and pseudotyped virus neutralization assays. *Nat Protoc* 2021; 16: 3114-40.
8. WHO International Standard. First WHO international standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human) NIBSC code: 20/136. Instructions for use. [online]. 2020; [cited 2024 Oct 25]; [2 screens]. Available from: URL: <https://nibsc.org/documents/ifu/20-136.pdf>.
9. WHO/BS/2020.2403. Establishment of the WHO international standard and reference panel for anti-SARS-CoV-2 antibody. [online]. 2020; [cited 2024 Oct 25]; [60 screens]. Available from: URL: <https://www.who.int/publications/m/item/WHO-BS-2020.2403>.
10. The United States Pharmacopeia. General chapters <921> water determination. In: USP-NF. Rockville, MD: United States Pharmacopeia; 2022. page 815-819.
11. ISO 13528:2022. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison. 3rd ed. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2022.
12. ISO 33405:2024. Reference materials - approaches for characterization and assessment of homogeneity and stability. Switzerland: International Organization for Standardization; 2024.
13. Kullabut K, Yusho A, Sapsutthipas S, Chumpol S, Ritthitham K, Phumiamorn S. Method validation of the plaque assay for SARS-CoV-2 Titration. *Thai Food Drug J* 2021; 28(3): 9-16.
14. Srisutthisamphan K, Saenboonrueng J, Wanitchang A, Viriyakitkosol R, Jongkaewwattana A. Cross-neutralization of SARS-CoV-2-specific antibodies in convalescent and immunized human sera against the bat and pangolin coronaviruses. *Viruses* 2022; 14: 1793. (13 pages).
15. Okba NMA, Müller MA, Li W, Wang C, Geurts van Kessel CH, Corman VM, et al.

- Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2-specific antibody responses in coronavirus disease patients. *Emerg Infect Dis* 2020; 26(7): 1478-88.
16. Jamtsho R. Stability of lyophilized human serum for use as quality control material in bhutan. *Indian J Clin Biochem* 2013; 28(4): 418-21.
 17. Kida H, Yamasaki Y, Feril LB Jr, Endo H, Itaka K, Tachibana K. Efficient mRNA delivery with lyophilized human serum albumin-based nanobubbles. *Nanomaterials (Basel)* 2023; 13(7): 1283. (18 pages).
 18. Kamath S, Lip GY. Fibrinogen: biochemistry, epidemiology and determinants. *QJM: An International Journal of Medicine*. 2003; 96(10): 711-29.
 19. Santa Maria F, Huang YS, Vanlandingham DL, Bringmann P. Inactivation of SARS-CoV-2 in all blood components using Amotosalen/ultraviolet a light and Amustaline/glutathione pathogen reduction technologies. *Pathogens* 2022; 11(5): 521. (13 pages).
 20. Zäh M, Brandenbusch C, Groël S, Winter G, Sadowski G Water activity as an indicator for antibody storage stability in lyophilized formulations. *Mol Pharm* 2025; 22(2): 918-26.
 21. WHO/BS/2022.2427. Establishment of the 2nd WHO international standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin and reference panel for antibodies to SARS-CoV-2 variants of concern. [online]. 2022; [cited 2024 Oct 25]; [67 screens]. Available from: URL: <https://www.who.int/publications/m/item/who-bs-2022.2427>.
 22. World Health Organization. Annex 2: WHO manual for the preparation of reference materials for use as secondary standards in antibody testing. In: WHO expert committee on biological standardization: seventy-fifth report. WHO Technical Report Series No. 1043. Geneva: World Health Organization; 2022. p. 41-129.

การจัดเตรียมแอนติบอดีมาตรฐานอ้างอิงต่อเชื้อ SARS-CoV-2 ชนิดทำแท้งแบบแช่เยือกแข็ง

อัศจรรย์ อาเมน¹ สมปอง ทรัพย์สุทธิภาสน์² ภูริต ทรงอนนิตย์¹ กนิษฐา ภูวนาถนรานกุล¹
และ สุภาพร ภูมิอมร³

¹สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000

²สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000

³สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ วัคซีนที่มีคุณภาพได้มาตรฐานเป็นเครื่องมือหลักในการแก้ปัญหาการระบาดใหญ่ของโรคโควิด 19 ข้อมูลการควบคุมคุณภาพวัคซีนและการทดสอบแอนติบอดีสลายไวรัส (neutralizing antibody) ต่อไวรัส SARS-CoV-2 สายพันธุ์ต่างๆ เป็นประโยชน์ในการกำหนดรูปแบบการให้วัคซีน เพื่อการควบคุมคุณภาพของวัคซีนและการตรวจระดับแอนติบอดีภายหลังได้รับวัคซีน แม้ว่าการอนามัยโลกจะมีการผลิตสารมาตรฐานระดับสากลแต่มีปริมาณจำกัดไม่เพียงพอต่อความต้องการ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อจัดเตรียมและกำหนดค่าแอนติบอดีมาตรฐานต่อเชื้อ SARS-CoV-2 สำหรับใช้ในการทดสอบโดยวิธี Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ SARS-CoV-2 แต่ละสายพันธุ์ คณะผู้วิจัยได้จัดเตรียมแอนติบอดีจากซีรัมผู้ป่วยและผู้ได้รับวัคซีนในรูปแบบผงแห้งแช่เยือกแข็ง เปรียบเทียบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี (mAbs) โดยได้จัดเตรียมสูตรและศึกษาสภาวะการทำแท้งแบบแช่เยือกแข็งที่เหมาะสม ในการประเมินคุณภาพของแอนติบอดีที่ผ่านการทำแท้งแบบแช่เยือกแข็ง พบว่าความเป็นเนื้อเดียวกันของแอนติบอดีชนิด mAbs ไม่เป็นไปตามเกณฑ์ยอมรับ ในขณะที่แอนติบอดีจากซีรัมมีคุณสมบัติทางกายภาพและชีววิทยาอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ สามารถนำมาใช้เป็นแอนติบอดีมาตรฐานอ้างอิงต่อเชื้อ SARS-CoV-2 ในรูปแบบผงแห้ง โดยพบว่ามีค่า Neutralizing antibody ต่อสายพันธุ์เดลตา โอมิครอน BA.2 และโอมิครอน BA.5 ที่ทดสอบโดยวิธี PRNT₅₀ titer (ช่วงความเชื่อมั่น 95%) เท่ากับ 512.97 (473–556), 288.14 (265–313) และ 161.49 (124–184) ตามลำดับ สำหรับการประเมินความคงตัว โดยการประเมินความแรงของผลิตภัณฑ์ที่ใช้งานจริงภายหลังการผลิต พบว่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ (ค่าเฉลี่ยเรขาคณิต ± 3 SD) ดังนั้นแอนติบอดีจากซีรัมจึงเหมาะสมสำหรับใช้เป็นแอนติบอดีมาตรฐานอ้างอิงต่อไวรัส SARS-CoV-2 เพื่อควบคุมคุณภาพวัคซีน และประเมินระดับแอนติบอดีสลายไวรัสหลังการฉีดวัคซีนในช่วงการระบาดของโรคโควิด 19

คำสำคัญ: แอนติบอดีมาตรฐานอ้างอิงต่อ SARS-CoV-2, PRNT, การทำแท้งแบบแช่เยือกแข็ง

การศึกษาปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์อิสระ ในกระบวนการผลิตหมักกรอบ

นิรันดร์ แร่กาสินธุ์ จรรยา บุญวิจิตร และ เขมิกา เหมโลหะ

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11 สุราษฎร์ธานี กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อำเภอเมือง สุราษฎร์ธานี 84100

บทคัดย่อ ฟอร์มาลดีไฮด์หรือฟอร์มาลิน เป็นสารก่อมะเร็งต่อมนุษย์ จัดเป็นสารห้ามใช้ในอาหารตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 391 พ.ศ. 2561 เรื่อง กำหนดอาหารที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือจำหน่าย ฟอร์มาลดีไฮด์อิสระ (Free-FA) ที่พบในหมักซึ่งเป็นสัตว์ทะเลอาจพบได้จากการจงใจเติมเพื่อป้องกันการเน่าเสีย และสามารถพบได้จากการเน่าเสียตามธรรมชาติหรือเกิดจากกระบวนการผลิตอาหารได้ จึงได้ทำการศึกษาปริมาณ Free-FA ในหมักกรอบ ซึ่งเป็นอาหารกลุ่มเสี่ยงที่พบ Free-FA สูง เพื่อพิสูจน์ว่ากระบวนการผลิตหมักกรอบทำให้ปริมาณ Free-FA เพิ่มขึ้นหรือลดลง โดยการผลิตหมักกรอบจากหมักสดที่เติมฟอร์มาลินที่มีช่วงความเข้มข้นสองแบบ ตรวจวิเคราะห์ปริมาณ Free-FA ในหมักสด หมักแห้ง และหมักกรอบด้วยเทคนิค HPLC พบว่าปริมาณ Free-FA ในหมักแห้งและหมักกรอบลดลงมากกว่าร้อยละ 80 และ 90 ตามลำดับ ของความเข้มข้นฟอร์มาลินทั้งสองช่วง แสดงว่าขั้นตอนการทำหมักแห้งและหมักกรอบทำให้ฟอร์มาลินระเหยและละลายออกมาจากหมักได้ จากการศึกษาสรุปได้ว่า Free-FA ในหมักกรอบอาจเกิดจากการจงใจเติมฟอร์มาลินในปริมาณสูงในหมักสด หรือเติมในน้ำแช่หมักกรอบในระหว่างจำหน่าย ดังนั้นเพื่อให้ผู้บริโภคสามารถลดการได้รับฟอร์มาลดีไฮด์จากการรับประทานหมักกรอบจึงมีคำแนะนำให้ผู้ขายแช่หมักกรอบในน้ำแข็งแทนการใช้ฟอร์มาลิน และให้ผู้บริโภคล้างหมักกรอบด้วยน้ำสะอาดก่อนปรุงอาหาร

คำสำคัญ: ฟอร์มาลดีไฮด์อิสระ, หมักแห้ง, หมักกรอบ

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

Received: 7 December 2024

Revised: 18 April 2025

Accepted: 1 May 2025

บทนำ

ฟอร์มาลดีไฮด์ (formaldehyde) เป็นสารอินทรีย์ในกลุ่มอัลดีไฮด์ที่มีสถานะเป็นก๊าซ มีสูตรโมเลกุล คือ CH_2O และน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 30.03 ลักษณะทั่วไปเป็นสารที่ไม่มีสี มีกลิ่นฉุน มีคุณสมบัติเป็นตัวรีดิวซ์ที่รุนแรง ถ้าอยู่ในสถานะของเหลวมีชื่อเรียกว่า ฟอร์มาลิน (formalin) ซึ่งจะมีความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์ประมาณร้อยละ 37-55 และเติมเมทานอลความเข้มข้นประมาณร้อยละ 5-15 เพื่อป้องกันการเกิดโพลิเมอร์ ฟอร์มาลดีไฮด์ถูกนำมาใช้ประโยชน์เพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น สิ่งทอ การเกษตร ยา เครื่องสำอาง เป็นต้น⁽¹⁾ ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 391 พ.ศ. 2561 เรื่อง กำหนดอาหารที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือจำหน่าย ระบุว่า ฟอร์มาลดีไฮด์ เป็นสารห้ามใช้ในอาหาร⁽²⁾ โดยองค์การนานาชาติเพื่อการวิจัยมะเร็ง (International Agency for Research on Cancer; IARC) จัดให้ฟอร์มาลดีไฮด์เป็นสารก่อมะเร็งต่อมนุษย์กลุ่มที่ 1 หากได้รับทางการหายใจหรือทางผิวหนังในปริมาณน้อย อาจทำให้เกิดอาการระคายเคืองต่อระบบทางเดินหายใจและดวงตา ถ้าได้รับสัมผัสระยะยาวอาจมีผลต่อการเกิดมะเร็งโพรงจมูกได้⁽³⁾ และองค์กรพิทักษ์สิ่งแวดล้อมของประเทศสหรัฐอเมริกา (Environmental Protection Agency; EPA) จัดให้เป็นสารที่มีโอกาสก่อมะเร็งต่อมนุษย์ในกลุ่ม 1B (Probable Carcinogen) และกำหนดค่ายอมรับให้บริโภคได้โดยไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษหรือผลเสียต่อร่างกาย (Reference Dose; RfD) ไม่เกิน 0.2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน⁽⁴⁾

ฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารสามารถเกิดขึ้นได้เองในธรรมชาติและในอาหารที่ผ่านกระบวนการจากการศึกษาของ Nowshad F และคณะ มีการตรวจพบในอาหารได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน ได้แก่ ผลไม้ ผัก นมยูเอชที นมผง พบ 58.3, 40.6, 187.7 และ 194.1 mg/kg ตามลำดับ เป็นต้น⁽⁵⁾ ส่วนในสัตว์ทะเลพบฟอร์มาลดีไฮด์ได้จากการเปลี่ยนสารไตรเมทิลามีนออกไซด์ (Trimethylamine oxide) โดยเอนไซม์ไตรเมทิลามีน ออกซิเดส (Trimethylamine oxidase) ซึ่งปริมาณที่พบอาจแตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น วิธีการ และระยะ

เวลาการเก็บรักษา เป็นต้น⁽⁶⁾ ในธรรมชาติฟอร์มาลดีไฮด์เป็นสารตัวกลาง (Intermediate) ที่สำคัญที่ใช้ในการสังเคราะห์ชีวโมเลกุลของสิ่งมีชีวิต ฟอร์มาลดีไฮด์ที่มีในอาหารเกิดขึ้นได้ด้วยกลไกทางชีวเคมีและทางกายภาพสามารถพบได้ในรูปสารอิสระ (Free formaldehyde; Free-FA) และในรูปที่รวมอยู่กับสารอื่น (Bound formaldehyde) เช่น โปรตีน กรดนิวคลีอิก กรดอะมิโน ครีเอติน เป็นต้น จากรายงานต่างๆ พบว่า Free-FA มีความไวต่อการจับกับสารชีวโมเลกุลในสิ่งมีชีวิตทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสุขภาพ⁽⁷⁾ และสามารถนำผลการตรวจวิเคราะห์ Free-FA ไปใช้ในการเฝ้าระวังการปนเปื้อนฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารได้^(7,8) โดยการตรวจวิเคราะห์ด้วยชุดทดสอบซึ่งเป็นวิธีการคัดกรองเบื้องต้นควบคู่กับการตรวจวิเคราะห์ยืนยันโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ซึ่งสามารถระบุปริมาณที่ตรวจพบได้

ตามข้อมูลการเฝ้าระวังการปนเปื้อนฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารด้วยชุดทดสอบ โดยหน่วยงานในสังกัดกระทรวงสาธารณสุขทั้ง 13 เขตสุขภาพ ในปี พ.ศ. 2563 พบฟอร์มาลดีไฮด์ในหมักกรอบและหมักแช่ต่าง รวมจำนวน 427 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 1,362 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 31.35 แต่การตรวจพบฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารไม่สามารถสรุปได้ว่าเกิดจากการเติมลงไปในการเนื่องจากอาหารบางประเภทหรือบางชนิดสามารถพบฟอร์มาลดีไฮด์ได้ตามธรรมชาติ⁽⁹⁾ และจากผลการสำรวจ Free-FA โดยวิธีทางห้องปฏิบัติการในอาหารกลุ่มเสี่ยงที่อาจมีการปนเปื้อนฟอร์มาลดีไฮด์ ได้แก่ หมักสด หมักกรอบ สไลนาง โดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เมื่อปีงบประมาณ พ.ศ. 2563 จำนวน 396 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บตัวอย่างจากสถานที่จำหน่าย 25 จังหวัด ใน 5 ภาคของประเทศไทย อาหารที่พบ Free-FA ได้แก่ หมักกรอบ 44 ตัวอย่าง ของตัวอย่างหมักกรอบ 120 ตัวอย่าง (ร้อยละ 36.7) ปริมาณที่พบอยู่ในช่วง 10.8 – 1,022 mg/kg ค่ามัธยฐาน 262 mg/kg สไลนางขาว 29 ตัวอย่าง ของตัวอย่างสไลนางดำ/ขาว ที่ผ่านการฟอกสี 128 ตัวอย่าง (ร้อยละ 22.7) ปริมาณที่พบอยู่ในช่วง 10.7–5,110 mg/kg ค่ามัธยฐาน 318 mg/kg และหมักสด 1 ตัวอย่าง ของตัวอย่างหมักสด 148 ตัวอย่าง (ร้อยละ 0.7) ปริมาณที่พบ 7.27 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (mg/kg)^(10,11)

จากที่กล่าวข้างต้น Free-FA ที่พบในหมึกกรอบอาจพบได้จากการจงใจเติมฟอร์มาลีนในหมึกสดเพื่อป้องกันการเน่าเสียหรือการเพิ่มน้ำหนักของเนื้ออาหาร⁽¹²⁾ และสามารถพบได้จากการเน่าเสียตามกระบวนการธรรมชาติ หรือเกิดจากกระบวนการผลิตหมึกกรอบที่มีการนำหมึกสดมาตากแห้ง แล้วนำหมึกแห้งมาแช่น้ำต่างเพื่อให้หมึกพองตัว กรอบ และเต็ง ซึ่งอาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลง Free-FA ในหมึกกรอบได้ ดังนั้นในปี พ.ศ. 2564 จึงทำการศึกษาว่ากระบวนการผลิตหมึกกรอบส่งผลให้ปริมาณ Free-FA เพิ่มขึ้นหรือลดลงโดยการผลิตหมึกกรอบจากหมึกสดที่เติมฟอร์มาลีนปริมาณที่แตกต่างกัน ในช่วงความเข้มข้นที่มีข้อมูลตรวจพบในตัวอย่างหมึกกรอบ⁽¹⁰⁾ แล้ววิเคราะห์ปริมาณ Free-FA โดยใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิค HPLC จากนั้นเปรียบเทียบปริมาณ Free-FA ระหว่างหมึกสดกับหมึกแห้ง และหมึกสดกับหมึกกรอบ

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่าง

ตัวอย่างหมึกกล้วยสด ขนาดความยาวลำตัวประมาณ 15–20 เซนติเมตร ซื้อจากตลาดสด อำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี

สารมาตรฐาน

สารมาตรฐาน formaldehyde Lot. No. LRAC1954 (Sigma Aldrich, USA) ความเข้มข้น 1,000 mg/L

สารเคมี

Formalin 37%, AR grade (UNIVAR, Australia), 2,4-Dinitrophenylhydrazine, AR grade (Kemaus, Australia), Glacial acetic acid, AR grade (Merck, Germany), Acetonitrile, HPLC grade (J.T. Baker, USA), Perchloric acid, AR grade (Merck, Germany), Baking soda, Food grade (McGarrett, Thailand) และ น้ำกลั่น Type I

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้

เครื่องชั่งไฟฟ้า พิกัด 0.1 มิลลิกรัม (Sartorius LP1200S, Germany), อ่างน้ำความถี่สูง (Hwashin Technology Powersonic 405, Korea), อ่างน้ำร้อน (Mettler WB 29, Germany), เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบความเร็วสูง (Hettich Zentrifugen Rotofix 32, Germany), กระดาษกรองชนิด Nylon 0.22 μm ขนาด 13 และ 47 mm (CNW Technologies, China), กระดาษกรอง Whatman No.1 (Whatman, China), หลอดพลาสติก ขนาด 50 และ 15 มิลลิเมตร (ThermoNunc, USA) และเครื่อง High Performance Liquid Chromatography: HPLC (Agilent 1290, USA), Column: Thermo BDS C18 (250 mm $\times$ 4.6 mm $\times$ 5 μm) (ThermoFisher Scientific, USA)

การทดลองเตรียมหมึกแห้งและหมึกกรอบ

ทำการศึกษา 3 สภาวะแตกต่างกัน และแต่ละสภาวะทำการทดลองซ้ำ 5 ครั้ง โดยแต่ละครั้งประกอบด้วยตัวอย่างหมึกสดน้ำหนัก 1 kg จากนั้นตากหมึกให้แห้ง นำหมึกแห้งแช่ในสารละลายต่างที่เตรียมจาก Baking soda, Food grade (McGarrett, Thailand) 20 g ละลายในน้ำ 1 L เป็นระยะเวลา 1 คืน แต่ละรอบการทดลองจะห่างกันประมาณ 1 เดือน ขึ้นอยู่กับสภาพอากาศในการจัดหาตัวอย่างหมึกสดและการตากหมึก รายละเอียดดังนี้

สภาวะที่ 1 กลุ่มควบคุม: นำหมึกสดแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 ปริมาณ 300 g และส่วนที่ 2 ปริมาณ 700 g นำส่วนที่ 1 ไปวิเคราะห์ Free-FA ตามวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์อิสระ ส่วนที่ 2 นำไปทำหมึกแห้งโดยการตากแดดกลางแจ้ง เป็นเวลา 6 วัน นำหมึกแห้งที่ได้ แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 นำไปวิเคราะห์ Free-FA ส่วนที่ 2 นำไปทำหมึกกรอบ โดยนำหมึกแห้งแช่ในสารละลายต่าง 1 คืน จากนั้นนำหมึกกรอบไปวิเคราะห์ Free-FA

สภาวะที่ 2 การเตรียมหมึกกรอบที่มี 0.37–0.74 % formaldehyde: นำหมึกสด 1 kg เติมสารละลาย 37% formalin ปริมาณ 5–10 mL ใส่ในน้ำกลั่น 500 mL

(0.37–0.74 % formaldehyde) คนให้เข้ากัน เทใส่ในถังหมักสดที่แช่ในน้ำแข็ง แช่ทิ้งไว้ 1 คืน แล้วนำไปทำหมึกกรอบ เช่นเดียวกับสถานะที่ 1 ทำทั้งสิ้น 5 ครั้ง

สถานะที่ 3 การเตรียมหมึกกรอบที่มี 1.48–2.22 % formaldehyde: นำหมักสด 1 kg เติมน้ำละลาย 37% formalin ปริมาณ 20–30 mL ใส่ในน้ำกลั่น 500 mL (1.48–2.22 % formaldehyde) คนให้เข้ากัน เทใส่ในถังหมักสดที่แช่ในน้ำแข็ง แช่ทิ้งไว้ 1 คืน แล้วนำไปทำหมึกกรอบ เช่นเดียวกับสถานะที่ 1 ทำทั้งสิ้น 5 ครั้ง

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์อิสระ (Free-FA)⁽⁸⁾

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน และกราฟมาตรฐาน
สารมาตรฐาน formaldehyde (working solution) ความเข้มข้น 100 mg/L เตรียมโดยปิเปตสารมาตรฐาน formaldehyde ความเข้มข้น 1,000 mg/L ปริมาตร 0.5 mL ใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 5 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เตรียมกราฟมาตรฐาน โดยปิเปตสารมาตรฐาน formaldehyde (working solution) 12.5, 25, 50, 75, 100, 125, 150 μ L ใส่ในหลอดพลาสติกขนาด 15 mL เติมน้ำละลาย 30% Acetonitrile ใน 0.1% Acetic acid 5 mL เติมน้ำ 2,4-Dinitrophenylhydrazine 1.0 mL (เตรียมโดยละลาย 0.12 กรัม 2,4-Dinitrophenylhydrazine ด้วย Acetonitrile 50 mL แล้วเทใส่ขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 mL ที่มีสารละลาย Perchloric acid อัตราส่วน 1:19 อยู่ 10 mL และปรับปริมาตรเป็น 100 mL ด้วยน้ำกลั่น) และนำไปวิเคราะห์ปริมาณ Free-FA ด้วยเครื่อง HPLC สถานะ Temperature: 30°C, Injection volume: 5 μ L, Flow rate: 1.0 mL/min, UV detector wavelength: 360 nm, Mobile phase: Isocratic elution; Acetonitrile:Water (60:40)

วิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์อิสระ (Free-FA)

นำตัวอย่างหมึกทั้งตัวที่นำเครื่องในออกแล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ปริมาณ 5 g ใส่ในหลอดพลาสติก 50 mL เติมน้ำละลาย 0.1% Glacial acetic acid ปริมาตร 30 mL เพื่อสกัด Free-FA โดยจุ่มในอ่างน้ำความถี่สูงที่ 40 Kilohertz เป็นเวลา 30 นาที เติมน้ำ Acetonitrile 15 mL เพื่อให้โปรตีนตกตะกอน แล้วนำไปแยกชั้นด้วย

เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที นำสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 เติมน้ำ 1.0 mL 2,4-Dinitrophenylhydrazine และนำไปวิเคราะห์ปริมาณ Free-FA ด้วยเครื่อง HPLC ตามสถานะที่กำหนด คำนวณปริมาณ Free-FA เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ตามวิธีการตรวจวิเคราะห์ของสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งดัดแปลงจาก Yeh TS และคณะ⁽⁸⁾ ซึ่งได้ทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method validation) ที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11 สุราษฎร์ธานี มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถวิเคราะห์ได้ (Limit of Detection; LOD) เท่ากับ 2.5 mg/kg, ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ (Limit of Quantitation; LOQ) เท่ากับ 5.0 mg/kg ทวนสอบความแม่นยำและความเที่ยง (Accuracy and Precision) โดยการเติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่างมี % Recovery เท่ากับ 80–120% และ % RSD ไม่เกิน 20% มีการเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ร่วมกับสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร อยู่ในเกณฑ์ที่น่าพอใจ และมีการควบคุมคุณภาพภายใน ได้แก่ ทดสอบ Blank โดยใช้ 0.1% Acetic acid แทนตัวอย่าง การทำซ้ำ (Duplicate) และการเติมสารละลายมาตรฐานในตัวอย่างเพื่อหา % Recovery

การรายงานผล ดังนี้

ค่าที่วิเคราะห์ได้ต่ำกว่า LOD จะรายงานว่าไม่พบ

ค่าที่วิเคราะห์ได้ต่ำกว่า LOQ แต่สูงกว่าหรือเท่ากับ LOD จะรายงานว่าน้อยกว่า LOQ

ค่าที่วิเคราะห์ได้เท่ากับหรือสูงกว่า LOQ จะรายงานค่าที่ตรวจพบ

การวิเคราะห์ข้อมูล

คำนวณปริมาณ Free-FA ของหมึกจากกระบวนการทำหมึกกรอบ ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสิ้นสุดกระบวนการ (หมักสด หมักแห้ง และหมึกกรอบ) แล้วเปรียบเทียบปริมาณ Free-FA ที่ลดลง คำนวณร้อยละของปริมาณ Free-FA ที่ลดลงในแต่ละตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบปริมาณ Free-FA ของหมักสดกับหมักแห้ง และหมักสดกับหมึกกรอบ โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel

ผล

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ Free-FA จากกระบวนการหมักกรอบ โดยทำการตรวจวิเคราะห์ ปริมาณ Free-FA ของหมึกสด หมึกแห้ง และหมึกกรอบ ของการทดลองที่มีการเติมฟอร์มาลินในหมึกสดในระดับ ความเข้มข้น 0.37–0.74% และ 1.48–2.22% โดย น้ำหนัก โดยมีสถานะที่ 1 กลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเติม ฟอร์มาลิน การแช่หมึกสดในฟอร์มาลินในถังโฟมที่มี

น้ำแข็งด้วยการจำลองวิธีเสมือนหมึกสดที่มีจำหน่ายใน ตลาด ปริมาณ Free-FA ในหมึกจึงขึ้นอยู่กับ การดูดซับฟอร์มาลินที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติในระยะเวลา การแช่ที่เท่ากัน จึงแสดงปริมาณ Free-FA ของแต่ละ ตัวอย่างด้วยค่าเฉลี่ย

ผลการทดลองสถานะที่ 1 กลุ่มควบคุมที่ไม่เติม ฟอร์มาลิน ตรวจไม่พบ Free-FA ทั้งในหมึกสด หมึกแห้ง และหมึกกรอบ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณ Free-FA ของหมึกกลุ่มควบคุมที่ไม่เติมฟอร์มาลินทั้งในหมึกสด หมึกแห้ง และหมึกกรอบ

ตัวอย่างที่	ปริมาณ Free-FA (mg/kg)		
	หมึกสด	หมึกแห้ง	หมึกกรอบ
1	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
2	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
3	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
4	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
5	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ

หมายเหตุ: LOD เท่ากับ 2.5 mg/kg

ผลการทดลองสถานะที่ 2 กระบวนการผลิต หมึกกรอบที่เติมฟอร์มาลินในหมึกสด 0.37–0.74% โดยน้ำหนัก พบปริมาณ Free-FA ในหมึกสด 174–508 หมึกแห้ง 9.1–87.0 และหมึกกรอบ 6.6–13.7 mg/kg ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2 และสถานะที่ 3

กระบวนการผลิตหมึกกรอบที่เติมฟอร์มาลินในหมึกสด 1.48–2.22% โดยน้ำหนัก พบปริมาณ Free-FA ในหมึก สด 397–1,975 หมึกแห้ง 38.8–196 และหมึกกรอบ 17.5–66.2 mg/kg ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 2 ปริมาณ Free-FA ของหมึกสด หมึกแห้ง และหมึกกรอบ เมื่อเติมฟอร์มาลินในหมึกสด 0.37 – 0.74% โดยน้ำหนัก

ตัวอย่างที่	ปริมาณ Free-FA (mg/kg)		
	หมึกสด	หมึกแห้ง	หมึกกรอบ
1	174	33.7	6.9
2	222	21.7	6.6
3	283	9.1	7.5
4	508	87.0	11.6
5	447	59.4	13.7
ค่าเฉลี่ย	326.8±144.5	42.2±31.2	9.3±3.2

ตารางที่ 3 ปริมาณ Free-FA ของหมึกสด หมึกแห้ง และหมึกกรอบ เมื่อเติมฟอร์มาลีนในหมึกสด 1.48–2.22% โดยน้ำหนัก

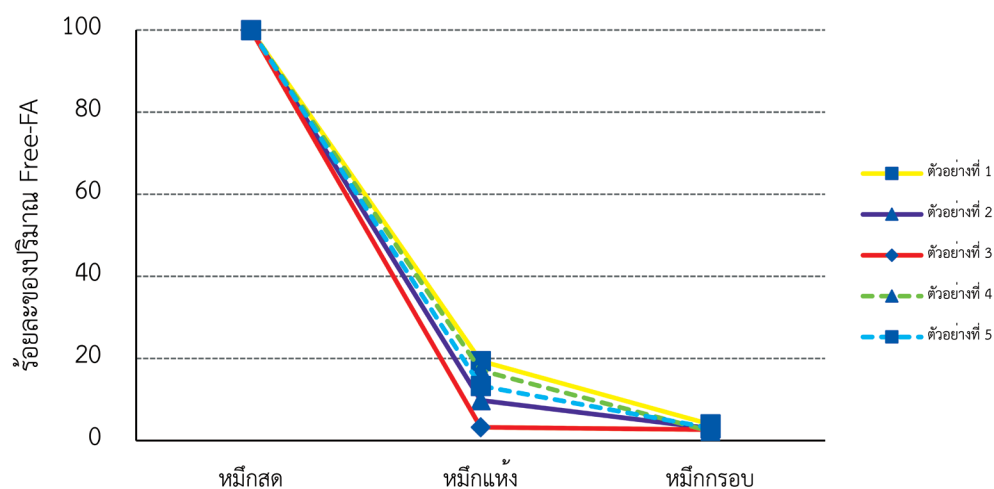
ตัวอย่างที่	ปริมาณ Free-FA (mg/kg)		
	หมึกสด	หมึกแห้ง	หมึกกรอบ
1	397	38.8	19.2
2	685	75.3	25.0
3	558	41.9	17.5
4	839	158	63.5
5	1,975	196	66.2
ค่าเฉลี่ย	890.8±627.5	102.0±71.2	38.3±24.4

เมื่อเปรียบเทียบ ร้อยละเฉลี่ยการลดลงของ ปริมาณ Free-FA ในหมึกสดกับหมึกแห้ง และหมึกสดกับ หมึกกรอบของกระบวนการที่เติมฟอร์มาลีนความเข้มข้น 0.37–0.74 % เท่ากับ 87.45±6.38 และ 97.01±0.63 ตามลำดับ และที่เติมฟอร์มาลีนความเข้มข้น 1.48–2.22% โดยน้ำหนัก เท่ากับ 88.59±4.34 และ 95.49±1.83 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4

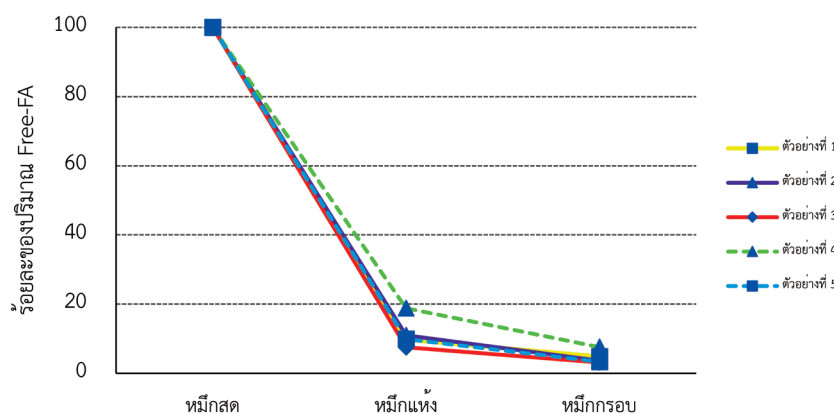
ตารางที่ 4 เปรียบเทียบร้อยละการลดลงของปริมาณ Free-FA ระหว่างหมึกสดเปรียบเทียบกับหมึกแห้ง และ หมึกสดเปรียบเทียบกับหมึกกรอบ เมื่อมีการเติมฟอร์มาลีนในหมึกสด

ความเข้มข้นของฟอร์มาลีนที่เติมในหมึกสด	ร้อยละเฉลี่ยการลดลงของปริมาณ Free-FA (n = 5)	
	หมึกสดเปรียบเทียบกับหมึกแห้ง	หมึกสดเปรียบเทียบกับหมึกกรอบ
0.37–0.74 %	87.45±6.38	97.01±0.63
1.48–2.22 %	88.59±4.34	95.49±1.83

นำข้อมูลร้อยละของปริมาณ Free-FA ที่ตรวจพบ มาสร้างเป็นภาพ พบว่าปริมาณ Free-FA ของหมึกแห้ง และหมึกกรอบลดลงอย่างชัดเจนทั้ง 5 ครั้ง ดังแสดง ในภาพที่ 1 และ 2 ตามลำดับ



ภาพที่ 1 ร้อยละของปริมาณ Free-FA ที่ลดลง ระหว่างหมึกสดกับหมึกแห้ง และหมึกสดกับหมึกกรอบ เมื่อเติม ฟอร์มาลีนความเข้มข้น 0.37–0.74% โดยน้ำหนัก ในหมึกสด (n = 5)



ภาพที่ 2 ร้อยละของปริมาณ Free-FA ที่ลดลง ระหว่างหมักสดกับหมักแห้ง และหมักสดกับหมักกรอบ เมื่อเติมฟอร์มาลินความเข้มข้น 1.48–2.22% โดยน้ำหนัก ในหมักสด ($n = 5$)

วิจารณ์

กระบวนการทำหมักกรอบหรือหมักแช่ต่าง คือการนำหมักสดมาตากแดดเป็นหมักแห้ง แล้วนำหมักแห้งมาแช่ต่างเป็นหมักกรอบ การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาการผลิตหมักกรอบจากหมักสดที่จำลองสภาวะเสมือนที่จำหน่ายในท้องตลาด โดยแช่หมักสดในถังโม่ที่มีน้ำแข็งที่เติมฟอร์มาลิน และทำเป็นหมักแห้งโดยนำหมักสดตากแดด ในการเติมฟอร์มาลินลงในหมักสดในการศึกษานี้ได้เลือกระดับความเข้มข้นเป็น 2 ช่วง ซึ่งเป็นค่ากลางและค่าสูงที่ตรวจพบในหมักกรอบ จากข้อมูลการสำรวจอาหารกลุ่มเสี่ยงที่มีการปนเปื้อนฟอร์มาลดีไฮด์ ได้แก่ หมักสด หมักกรอบ และสับปะรด ในโครงการบูรณาการอาหารปลอดภัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2563 ของสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่พบ Free-FA ในปริมาณ 10.8–1,022 mg/kg ค่ามัธยฐาน 262 mg/kg จึงเลือกศึกษาโดยการเติมฟอร์มาลินในหมักสดที่ระดับความเข้มข้น 0.37–0.74% และความเข้มข้น 1.48–2.22% โดยน้ำหนัก โดยมีกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเติมฟอร์มาลิน แต่ทำการทดลองทำซ้ำ 5 ครั้ง โดยมีระยะเวลาห่างกันประมาณ 1 เดือน ขึ้นอยู่กับโอกาสในการจัดหาตัวอย่างหมักสดและสภาพอากาศที่ใช้ในการตากหมักแห้ง จากผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ Free-FA จากกระบวนการทำหมักกรอบที่เติมฟอร์มาลินปริมาณที่ต่างกัน ในหมักสดก่อนทำหมักกรอบ ผลพบว่าร้อยละของปริมาณ Free-FA

ที่ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเริ่มต้นของหมักสดที่แช่ฟอร์มาลินความเข้มข้น 0.37–0.74% และ 1.48–2.22% ร้อยละเฉลี่ยการลดลงของปริมาณ Free-FA ในหมักสดเมื่อเปรียบเทียบกับหมักแห้ง และหมักสดเปรียบเทียบกับหมักกรอบ จากผลการศึกษาสอดคล้องกับคุณสมบัติของฟอร์มาลดีไฮด์ที่เป็นสารระเหยได้ง่ายและละลายน้ำได้ดี⁽¹⁾ เมื่อนำหมักสดมาตากแดดเป็นหมักแห้งแล้วนำหมักแห้งมาแช่ต่างเป็นหมักกรอบ จึงทำให้ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ลดลงได้

จากข้อมูลการสำรวจอาหารกลุ่มเสี่ยงที่มีการปนเปื้อนฟอร์มาลดีไฮด์ หมักกรอบ หมักสด โครงการบูรณาการอาหารปลอดภัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2563 ของสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร พบ Free-FA ในหมักกรอบปริมาณ 10.8–1,022 mg/kg ค่ามัธยฐาน 262 mg/kg และหมักสดที่พบ 7.27 mg/kg^(10,11) เป็นค่าที่สูงกว่าที่พบในธรรมชาติ เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลจากการสำรวจปริมาณ Free-FA ในหมักและหมักหั่นฝอย (Shredded squid) ของ Yeh TS และคณะ⁽⁸⁾ พบปริมาณ Free-FA 10.4 และ 4.1–48.5 mg/kg ตามลำดับ และการศึกษาของ Zhang X และคณะ⁽¹³⁾ ที่ทำการศึกษาก่อน Free-FA ในหมักตามฤดูกาล ระยะเวลา 12 เดือน พบปริมาณ Free-FA อยู่ในช่วง 1.51–36.8 mg/kg และข้อมูลจาก Risk Assessment Section Centre for Food Safety⁽¹⁴⁾ สรุปข้อมูลปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ที่เกิดจากธรรมชาติ

ของสัตว์ทะเลบางชนิดเช่น กุ้ง (shrimp) หมึก (squid) และ สัตว์น้ำที่มีเปลือกแข็ง (crustacean) พบฟอร์มาลดีไฮด์ 1.0–2.4, 1.8 และ 1.0–98 mg/kg ตามลำดับ เป็นต้น ในการศึกษาปริมาณ Free-FA ในกระบวนการผลิตหมึกกรอบ โดยเติมฟอร์มาลีนในปริมาณที่แตกต่างกันในหมึกสด แม้ว่าความเข้มข้นของ Free-FA ที่พบของตัวอย่างที่ศึกษา 5 ขั้ว จะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับ การดูดซับฟอร์มาลีนของหมึก แต่ผลพบว่ากระบวนการผลิตหมึกกรอบทำให้ปริมาณ Free-FA ลดลงมากกว่าร้อยละ 80 ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้เป็นข้อมูลที่สนับสนุนได้ว่า หากพบการปนเปื้อนฟอร์มาลดีไฮด์อิสระในหมึกกรอบ เกิดจากการเติมฟอร์มาลีนในหมึกสด ปริมาณสูงก่อนกระบวนการทำหมึกกรอบ หรืออาจเกิดจากการเติมภายหลังกระบวนการทำหมึกกรอบ ซึ่งควรทำการทดลองเพื่อพิสูจน์สมมติฐานนี้ต่อไป ทั้งนี้การศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการตรวจวิเคราะห์ Free-FA โดยไม่ได้ล้างหมึกก่อนตรวจวิเคราะห์ หากมีการล้างหมึกก่อนตรวจวิเคราะห์มีแนวโน้มทำให้ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ลดลงได้อีก จึงมีคำแนะนำเพิ่มเติมในการเฝ้าระวังการปนเปื้อนฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารด้วยชุดทดสอบ หากมีการตรวจพบฟอร์มาลดีไฮด์ สามารถทดสอบซ้ำโดยการล้างตัวอย่างตามวิธีการของชุดทดสอบฟอร์มาลีนของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ หากพบฟอร์มาลีนในอาหาร สีของสารละลายที่ใช้ทดสอบจะเป็นสีชมพู และความเข้มข้นของสีจะแปรผันตรงกับปริมาณฟอร์มาลีน สามารถสรุปเบื้องต้นว่าเกิดจากการเติมฟอร์มาลีนในอาหารดังกล่าว เพื่อหลีกเลี่ยงอันตรายจากการใช้ฟอร์มาลีน จึงแนะนำให้ผู้ผลิตหรือผู้ขายใช้น้ำแข็งในการรักษาสภาพ หรือใส่ในตู้เย็นเพื่อรักษาสภาพของหมึกกรอบในระหว่างจำหน่ายแทนการใช้ฟอร์มาลีน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ อติศรา ตันตสุทธิกุล⁽¹⁵⁾ ที่พบว่าสามารถเก็บรักษาหมึกกล้วยได้ 6 วัน ด้วยวิธีการแช่ในน้ำแข็ง และการศึกษาของ Bianchi F และคณะ⁽¹⁶⁾ ที่พบว่า การเก็บปลาทะเลในน้ำแข็งสามารถลดการเกิดฟอร์มาลดีไฮด์ได้ ส่วนผู้บริโภคแนะนำให้ล้างหมึกสดและหมึกกรอบด้วยน้ำสะอาดก่อนนำไปปรุงอาหารจะทำให้ลดการปนเปื้อนของฟอร์มาลดีไฮด์ได้

สรุป

การศึกษาปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์อิสระ ในกระบวนการผลิตหมึกกรอบ โดยเติมฟอร์มาลีนในปริมาณที่แตกต่างกันในหมึกสด ผลพบว่ากระบวนการผลิตหมึกกรอบทำให้ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์อิสระลดลงมากกว่าร้อยละ 80 ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้เป็นข้อมูลสนับสนุนได้ว่า หากพบการปนเปื้อนฟอร์มาลดีไฮด์อิสระในหมึกกรอบจะเกิดจากการเติมฟอร์มาลีนในหมึกสด ปริมาณสูงก่อนกระบวนการผลิตหมึกกรอบ หรือเติมภายหลังกระบวนการผลิตหมึกกรอบ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11 สุราษฎร์ธานี กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้การสนับสนุนการศึกษาครั้งนี้ และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการอาหาร ที่ให้ความร่วมมือในการดำเนินการศึกษาครั้งนี้จนบรรลุผลสำเร็จด้วยดี และขอบคุณ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ผู้ถ่ายทอดวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์อิสระ และนางสาวพนาวัลย์ กลิ่งกลางตอน สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้คำปรึกษาด้านวิชาการตลอดการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

1. Liteplo RG, Beauchamp R, Meek ME, Chénier R. Formaldehyde: concise international chemical assessment document 40. Geneva: World Health Organization; 2002.
2. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 391 (พ.ศ. 2561) ออกตามความในพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 เรื่อง กำหนดอาหารที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือจำหน่าย. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 135 ตอนพิเศษ 237 ง (วันที่ 25 กันยายน 2561). หน้า 18.
3. International Agency for Research on Cancer. Formaldehyde, 2-butoxyethanol and 1-tert-butoxypropan-2-ol. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 2006; 88: 39–325.

4. United States Environmental Protection Agency. Formaldehyde. [online]; [cited 2024 Feb 19]; [16 screens]. Available from: URL: https://iris.epa.gov/ChemicalLanding/&substance_nmbr=419.
5. Nowshad F, Islam MN, Khan MS. Concentration and formation behavior of naturally occurring formaldehyde in foods. *Agric Food Secur* 2018; 7: 17. (8 pages).
6. Ariyani F, Anissah U, Januar HI, Barokah GR, Putri AK. The effect of formaldehyde addition on the distribution of trimethylamine oxide (TMAO) and trimethylamine (TMA) in marine and freshwater fish organs. *AIP Conf Proc* 2022; 2553, 0200061-5.
7. วนิดา ยุธยาติ, วันวิสา สนิทเชื้อ. ฟอรัมาลดีไฮด์ในอาหาร. *ว พืชวิทยาไทย* 2560; 32(1): 53-66.
8. Yeh TS, Lin TC, Chen CC, Wen HM. Analysis of free and bound formaldehyde in squid products by gas-chromatography-mass spectrometry. *J Food Drug Anal* 2013; 21: 190-7.
9. สำนักส่งเสริมและสนับสนุนอาหารปลอดภัย สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข. รายงานสถานการณ์ความปลอดภัยของอาหาร ปีงบประมาณ 2563. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 24 พ.ย. 2567]; [121 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://foodsafety.moph.go.th/main/?p=list&sec=37&detail=1010>.
10. นิตยา สุวรรณโพธิ์, วนิดา ยุธยาติ, วรพงศ์ พรหมณา, วันวิสา สนิทเชื้อ. การสำรวจฟอรัมาลดีไฮด์อิสระในหมึกสด หมึกแช่ต่าง และสไปนาง. ใน: เอกสารประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ ครั้งที่ 29. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2564.
11. สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. รายงานสรุปผลการดำเนินงานโครงการบูรณาการอาหารปลอดภัย (Food Safety) ประจำปีงบประมาณ 2563. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 13 มี.ค. 2568]; [207 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: http://bqsf.dmsc.moph.go.th/bqsfWeb/index.php/sdm_downloads/food_safety_report_2563.
12. สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. ฟอรัมาลดีไฮด์ในอาหาร. [ออนไลน์]. 2561; [สืบค้น 24 พ.ย. 2567]; [48 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <http://bqsf.dmsc.moph.go.th/bqsfWeb/index.php/formaldehyde-in-food>.
13. Zhang X, Kong C, yu Tang Y, ling Fang C, yun Huang X, yi Lou X, et al. Seasonal variation of background formaldehyde content in large squid from scientific research research vessel. *IOP Conf Ser: Earth Environ Sci* 2020; 461: 012059. (4 pages).
14. The Government of the Hong Kong Special Administrative Region. Formaldehyde in food. [online]. 2017; [cited 2024 Feb 17]; [6 screens]. Available from: URL: https://www.cfs.gov.hk/english/programme/programme_rafs/programme_rafs_fa_02_09.html.
15. อติศรา ตันตสุทธิกุล. การศึกษาดัชนีคุณภาพของหมึกกล้วย และหมึกกระดองระหว่างการเก็บรักษาโดยการแช่ในน้ำแข็ง และการเยือกแข็ง [วิทยานิพนธ์]. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร. สงขลา: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์; 2553.
16. Bianchi F, Careri M, Musci M, Mangia A., Fish and food safety: determination of formaldehyde in 12 fish species by SPME extraction and GC-MS analysis. *Food Chem* 2007; 100(3): 1049-53.

Study of Free Formaldehyde Content in Pickled Squid Production Process

Nirundorn Raekasin, Janya Bunwichit, and Kheamikar Hemloha

Regional Medical Sciences Center 11 Surat Thani, Department of Medical Sciences, Muang District, Surat Thani 84100, Thailand

ABSTRACT Formaldehyde, also known as formalin, is classified as a human carcinogen and is prohibited in food products. This prohibition is outlined in Notification of the Ministry of Public Health (No. 391) B.E. 2561 (2018), which specifies prohibited foods from production, importation, or sale. In marine animals, such as squid, free formaldehyde (Free-FA) may be present due to natural spoilage or intentional addition, often to prevent spoilage during transportation and the production process. A study was conducted to determine Free-FA content in pickled squids, which is a high-risk food with high Free-FA. This involved examining whether the pickled squids' production process, Free-FA, increased or decreased by adding varying amounts of formalin to the fresh squid before pickling. Free-FA contents in fresh squids, dried squids, and pickled squids were analyzed using the HPLC technique in two sets of studies. The results showed that the Free-FA content in dried and pickled squids was reduced by over 80% and 90%, respectively, compared to fresh squids across all treatment conditions. This reduction was attributed to the squid pickling process, which included drying and alkali immersion, promoting formalin evaporation and dissolution. In conclusion, the presence of Free-FA in pickled squids was likely due to the intentional addition of formalin to fresh squids or soaking water during distribution. To minimize formaldehyde exposure, traders are advised to use ice instead of formalin for soaking squids, and consumers are advised to rinse squids with water before cooking.

Keywords: Free formaldehyde, Dried squid, Pickled squid

การศึกษาแนวทางลดการปนเปื้อนในการเพาะเชื้อจากเลือด โรงพยาบาลพระอาจารย์ฝั้น อาจาโร

ปราชญ์สกุล ช่วยสุดสกุลชัย

กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลพระอาจารย์ฝั้น อาจาโร อำเภอพรรณานิคม สกลนคร 47130

บทคัดย่อ การลดการปนเปื้อนในการเพาะเชื้อจากเลือดนั้นมีความสำคัญอย่างมากเพราะหากการตรวจพบเชื้อปนเปื้อนจากขั้นตอนการเก็บตัวอย่างที่ไม่ถูกต้อง อาจนำไปสู่การวินิจฉัยผิดพลาดส่งผลให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาที่ไม่เหมาะสมและเพิ่มค่าใช้จ่ายในการรักษาโดยไม่จำเป็น การศึกษานี้ทำขึ้น ณ โรงพยาบาลพระอาจารย์ฝั้น อาจาโร มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบการลดการปนเปื้อนในการเพาะเชื้อจากเลือด ก่อนและหลังการทบทวนแนวทางการปฏิบัติ โดยได้ทำการเก็บข้อมูลจากการส่งตรวจขวดเพาะเชื้อจากเลือดที่มีการตรวจพบเชื้อปนเปื้อนในช่วงเวลาก่อนการทบทวน และหลังการทบทวน นำข้อมูลที่รวบรวมมาวิเคราะห์ด้วยสถิติเชิงพรรณนา ค่าเฉลี่ย ร้อยละ ผลการศึกษาก่อนการทบทวนพบเชื้อที่ปนเปื้อน *Coagulase-negative Staphylococci* spp. เฉลี่ยร้อยละ 0.98 และเชื้อ *Viridans streptococcus* เฉลี่ยร้อยละ 0.12 หลังการทบทวนพบเชื้อที่ปนเปื้อน *Coagulase-negative Staphylococci* spp. เฉลี่ยร้อยละ 0.26 อัตราการลดลงของการปนเปื้อนโดยเฉลี่ยอยู่ที่ร้อยละ 76.36 ซึ่งสูงกว่าค่าเป้าหมายที่ตั้งไว้ที่ร้อยละ 60 โดยผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าแนวทางการปฏิบัติที่ทบทวนมีประสิทธิภาพในการลดการปนเปื้อนในการเพาะเชื้อจากเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญ

คำสำคัญ: การปนเปื้อนในการเพาะเชื้อจากเลือด, การปนเปื้อนในเลือดที่ส่งตรวจเพาะเชื้อ, เชื้อปนเปื้อนในเลือด

Corresponding author E-mail: Pradsakon2515@gmail.com

Received: 7 February 2025

Revised: 26 May 2025

Accepted: 27 May 2025

บทนำ

ปัญหาที่พบบ่อยในการเพาะเชื้อแบคทีเรียจากเลือดที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อในกระแสเลือด คือ ผลการตรวจเพาะเชื้อพบเชื้อชนิดอื่นในตัวอย่างเลือดที่ไม่ใช่เชื้อที่เป็นสาเหตุก่อโรค หรือมีการปนเปื้อนเชื้อในตัวอย่างเลือดซึ่งมีความสำคัญต่อผู้ป่วย นำมาสู่การรายงานผลบวกปลอม ทำให้การวินิจฉัยการติดเชื้อในกระแสเลือดผิดพลาด อันส่งผลกระทบหลายประการทั้งต่อผู้ป่วยและโรงพยาบาล มีผลทำให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาที่ไม่เหมาะสม ต้องนอนรักษาตัวนานขึ้น⁽¹⁾ การเจาะเลือดส่งตรวจเพาะเชื้อเป็นเหตุการณ์ที่ใช้ประกอบการวินิจฉัยและรักษาการติดเชื้อในกระแสเลือดซึ่งต้องทำด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนเชื้อจุลชีพในเลือดที่ส่งตรวจ ซึ่งไม่ใช่สาเหตุที่แท้จริงของการติดเชื้อในกระแสเลือดและเป็นปัญหาพบได้บ่อยในโรงพยาบาลทำให้เกิดความผิดพลาดในการวินิจฉัยและรักษา สมาคมจุลชีววิทยาแห่งสหรัฐอเมริกาได้กำหนดให้อัตราการปนเปื้อนเชื้อจุลชีพในเลือดที่ส่งตรวจเพาะเชื้อไม่ควรเกินร้อยละ 3 ของจำนวนขวดเลือดที่ส่งตรวจเพาะเชื้อทั้งหมด⁽²⁾ อัตราการปนเปื้อนของเชื้อจุลชีพในเลือดที่ส่งตรวจเพาะเชื้อเป็นปัญหาพบได้บ่อย จากข้อมูลอัตราการปนเปื้อนเชื้อจุลชีพที่ส่งตรวจเพาะเชื้อจากการศึกษาทั้งในและต่างประเทศ พบว่าอยู่ระหว่างร้อยละ 3.5–9.7⁽²⁾ การศึกษาในโรงพยาบาลของประเทศต่าง ๆ พบอัตราการปนเปื้อนเชื้อจุลชีพในเลือดที่ส่งตรวจเพาะเชื้อประมาณร้อยละ 2.5 หรืออยู่ระหว่างร้อยละ 1.0–6.0⁽³⁾ สาเหตุของการปนเปื้อนจากการเจาะเลือดเพื่อส่งตรวจเพาะเชื้อพบว่ามี การปนเปื้อนเกิดขึ้นจากเชื้อที่มีบนผิวหนังของผู้ป่วยเอง โดยมีเชื้อ *Coagulase-negative staphylococci* spp. เป็นสาเหตุของการปนเปื้อนเชื้อจุลชีพในเลือดที่ส่งตรวจมากที่สุด⁽⁴⁾ ส่วนอัตราการปนเปื้อนจากการเพาะเชื้อจากเลือดในโรงพยาบาลสุราษฎร์ธานี เชื้อปนเปื้อนที่พบมากที่สุด คือ *Coagulase-negative staphylococci* spp. (ร้อยละ 16.00)⁽⁵⁾ ส่วนเชื้อปนเปื้อนที่พบบ่อยจากข้อมูลในสหรัฐอเมริกา ได้แก่ *Coagulase-negative staphylococci* spp. (ร้อยละ 74.8) *Corynebacterium* spp. (ร้อยละ 13.1) *Viridans streptococci* (ร้อยละ 7.7) *Bacillus* spp. (ร้อยละ 2.2) และ

Propionibacterium spp. (ร้อยละ 2.2) สำหรับข้อมูลจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ พบ *Coagulase-negative staphylococci* spp. (ร้อยละ 80.6) *Corynebacterium* spp. (ร้อยละ 7.4) *Micrococcus* spp. (ร้อยละ 6.5) และ *Bacillus* spp. (ร้อยละ 5.6)⁽⁶⁾ และจากข้อมูลการส่งเลือดตรวจเพาะเชื้อของโรงพยาบาลพระอาจารย์ฝั้น อาจาโร เคยพบว่าม้อัตรการปนเปื้อนเชื้อจุลชีพร้อยละ 1.58⁽⁷⁾

สาเหตุการปนเปื้อนเกิดขึ้นจากวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการเจาะเลือด เช่น เข็มและกระบอกฉีดยา สำลี จุกยางที่ขวดเพาะเชื้อ การปนเปื้อนขณะถ่ายเลือดจากกระบอกฉีดยาสู่ขวดเพาะเชื้อหรือภาชนะเก็บตัวอย่าง การปนเปื้อนขณะทำการเพาะเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ⁽⁸⁾ วิธีลดการปนเปื้อนเชื้อจุลชีพที่ส่งตรวจเพาะเชื้อ ควรฝึกฝนให้บุคลากรมีความรู้และการปฏิบัติที่ถูกต้องในแนวปฏิบัติการเจาะเลือดส่งตรวจเพาะเชื้อ จากการทบทวนวรรณกรรมอย่างเป็นระบบ พบว่าต้องใช้กลยุทธ์หลายวิธีประกอบกันจึงจะมีประสิทธิภาพและประสบผลสำเร็จ และต้องอาศัยการมีส่วนร่วมของบุคลากรในการนำไปสู่การปฏิบัติจึงจะเกิดการปรับเปลี่ยนพฤติกรรม⁽⁸⁾ การพบการปนเปื้อนบ่งชี้ถึงปัญหาทางเทคนิคปฏิบัติในขั้นตอนการทำความสะอาดผิวหนังของผู้ป่วยและการเช็ดจุกยางขวดเพาะเชื้อเพื่อลดอัตราการปนเปื้อนควรใช้น้ำยา 2% Chlorhexidine gluconate ใน 70% alcohol^(9–11) ซึ่งมีประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อดีเทียบเท่า Povidoneiodine แต่แห้งเร็วกว่าและมีระยะเวลาในการรอคอยให้มีประสิทธิภาพฆ่าเชื้อสูงสุดสั้นกว่า ใช้เวลารอให้แห้งและออกฤทธิ์สูงสุดเพียง 30 วินาที ขณะที่ Povidone-iodine จะต้องรอทิ้งไว้ให้แห้งและออกฤทธิ์ได้สูงสุดนานถึง 2 นาที ซึ่งในทางปฏิบัติบุคลากรที่เจาะเลือดผู้ป่วยมักจะไม่ถึง 2 นาที นอกจากนี้ Chlorhexidine gluconate มีฤทธิ์คงเหลือหลังท้าน้ำยาด้วย จึงเป็นน้ำยาที่ควรใช้เพื่อลดการปนเปื้อนในการเจาะเลือดเพื่อเพาะเชื้อ ไม่แนะนำให้ใช้สารที่มี iodine เป็นส่วนประกอบเช็ดจุกยางเพราะทำให้จุกยางเปลี่ยนสภาพได้เกิดการปนเปื้อนจากเชื้อภายนอกได้สูง⁽¹²⁾ ดังนั้นผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานในการวิจัยว่าอัตราการพบเชื้อปนเปื้อนในขวดเพาะเชื้อจากเลือดที่ส่งตรวจหลังจากการทบทวนแนวปฏิบัติการ

ลดการปนเปื้อนต่ำกว่าก่อนการทบทวนไม่น้อยกว่าร้อยละ 60 ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาหาแนวทางที่ดีที่สุดเพื่อนำมาแก้ไขปัญหการปนเปื้อนจุลชีพในเลือดที่ส่งตรวจเพาะเชื้อในโรงพยาบาลพระอาจารย์ฝั้น อาจาโร

ในการวิจัยนี้มีกรอบแนวคิดการพัฒนาอย่างต่อเนื่องของเดมมิง (Deming Cycle) ซึ่งมีวงจร PDSA (Plan-Do-Study-Action)⁽¹³⁾ เป็นแนวทางในการแก้ปัญหาการปนเปื้อนในการเพาะเชื้อจากเลือด โดยใช้หลักฐานเชิงประจักษ์ 4 ขั้นตอน คือ การค้นหาปัญหาและหาแนวทางแก้ไข เช่น แนวทางการปฏิบัติไม่เหมาะสมโดยใช้น้ำยาทำความสะอาดผิวหนังที่ไม่มีประสิทธิภาพ เป็นต้น การปฏิบัติตามแนวทางที่วางไว้อย่างเคร่งครัดได้แก่ สร้างความตระหนักให้บุคลากร การประเมินผลผลลัพธ์โดยการนำผลการปนเปื้อนที่เกิดขึ้นมาหาสาเหตุว่าเกิดจากอะไร ทบทวนโดยจัดทำเป็นโครงการศึกษาผลลัพธ์แนวปฏิบัติเพื่อลดการปนเปื้อนจากการเพาะเชื้อจากเลือดและการดำเนินการต่อไปให้เหมาะสมกับหน่วยงานโดยจัดทำแนวปฏิบัติการเจาะเลือดแบบใหม่ ซึ่งวงจร PDSA จะหมุนเป็นวงกลมไปเรื่อย ๆ และนำงานวิจัยมาใช้บรรจุไว้เป็นแผนงานประจำเดือนเก็บรวบรวมเป็นรายงานรายเดือนและในรอบไตรมาส นำผลมาวิเคราะห์โดยมุ่งให้บุคลากรที่เกี่ยวข้องเจาะเลือดส่งตรวจเพาะเชื้อจากเลือดได้อย่างถูกต้องตามแนวทางปฏิบัติเพื่อแก้ไขปัญหาอย่างต่อเนื่องจนกว่าจะบรรลุเป้าหมาย นำไปสู่การพัฒนาอย่างต่อเนื่องและลดอัตราการปนเปื้อนในการส่งตรวจเพาะเชื้อจากเลือดตามเป้าหมายที่ตั้งไว้ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของการทบทวนวิธีปฏิบัติการลดการปนเปื้อน เปรียบเทียบผลหลังการทบทวนสามารถลดอัตราการปนเปื้อนในการเพาะเชื้อจากเลือดก่อนการทบทวนได้หรือไม่

วัสดุและวิธีการ

การศึกษานี้เป็นการวิจัยทดลองเชิงเปรียบเทียบ ณ จุดเวลาใดเวลาหนึ่ง เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัยประกอบด้วยคู่มือแนวปฏิบัติการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อการเพาะเชื้อจากเลือด โรงพยาบาลพระอาจารย์ฝั้น อาจาโร ปี พ.ศ. 2564 และคู่มือแนวปฏิบัติการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อการเพาะเชื้อจากเลือด โรงพยาบาลพระอาจารย์

ฝั้น อาจาโร ปี พ.ศ. 2565 ที่จัดทำขึ้นใหม่⁽¹⁴⁾ โดยใช้ 2% Chlorhexidine gluconate ใน 70% alcohol (Baoying County Fukang Medical Appliance Co. Ltd., China) ทำความสะอาดผิวหนังและจุกยางขวดเพาะเชื้อแทนการใช้ Povidone-iodine

การวิเคราะห์ข้อมูล

รวบรวมผลการตรวจการปนเปื้อนเชื้อจากขวดที่ส่งตรวจการเพาะเชื้อจากเลือดทั้งหมดของผู้ป่วยในโรงพยาบาลพระอาจารย์ฝั้น อาจาโร ที่ส่งไปยังห้องปฏิบัติการบริษัท อินโนเทค ลาบอราทอรี เซอร์วิส จำกัด ระยะเวลา 24 เดือน แบ่งเป็นช่วงก่อนทำการทบทวน 12 เดือน ตั้งแต่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2563 ถึง 30 กันยายน พ.ศ. 2564 (ปีงบประมาณ พ.ศ. 2564) จำนวน 1,724 ขวด และหลังทำการทบทวน 12 เดือน ตั้งแต่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2564 ถึง 30 กันยายน พ.ศ. 2565 (ปีงบประมาณ พ.ศ. 2565) จำนวน 1,952 ขวด รวมทั้งสิ้น 3,676 ขวด โดยที่ในแต่ละเดือนนำผลการเพาะเชื้อมาร่วมทบทวนวิธีการเจาะเลือดในทุกขั้นตอนกับหอผู้ป่วยผ่านคณะกรรมการป้องกัน และควบคุมการติดเชื้อของโรงพยาบาลพระอาจารย์ฝั้น อาจาโร

วิธีปฏิบัติการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อเพาะเชื้อโรงพยาบาลพระอาจารย์ฝั้น อาจาโร ปี พ.ศ. 2565 หลังการทบทวนในการเก็บเลือดผู้ป่วยเพื่อส่งตรวจเพาะเชื้อ

การเจาะเลือด

ตรวจดูคำสั่งการรักษาของแพทย์ เตรียมผู้ป่วยและเตรียมอุปกรณ์การเจาะเลือดให้พร้อมก่อนทำการเจาะเลือดผู้ป่วย ในการเตรียมบริเวณที่จะเจาะเลือดให้เลือกตำแหน่งเส้นเลือดดำที่เหมาะสม จากนั้นทำความสะอาดบริเวณเส้นเลือดที่จะเจาะด้วยน้ำกับสบู่ (ในกรณีที่เป็นบริเวณดังกล่าวสกรปรก) ก่อนเจาะเลือด ผู้เจาะเลือดทำความสะอาดมือด้วยการล้างมือด้วย antiseptic หรือใช้ alcohol hand rub สวมถุงมือแบบสะอาด ใช้สายยางรัดเหนือบริเวณที่จะเจาะประมาณ 2-4 นิ้ว เช็ดบริเวณผิวหนังที่จะเจาะเลือดโดยให้เช็ดวนจากด้านในออก

ด้านนอกเป็นวงกว้างอย่างน้อย 5 เซนติเมตร ถูแรงพอควร ด้วย 2% Chlorhexidine gluconate ใน 70% alcohol ทั้งให้แห้ง 30 วินาที การเจาะเลือดผู้ใหญ่หรือเด็กโตที่เจาะเลือดได้ง่ายใช้เลือดประมาณ 5-10 มิลลิลิตร ในขวดจัดเก็บสำหรับผู้ใหญ่ และสำหรับเด็กเล็กหรือผู้ใหญ่ที่เจาะเลือดยากใช้เลือดประมาณ 1-3 มิลลิลิตร ในขวดจัดเก็บสำหรับเด็ก

การใส่เลือดลงในขวดเพาะเชื้อ

เช็ดจุดขวดเพาะเชื้อด้วย 2% Chlorhexidine gluconate ใน 70% alcohol (ไม่แนะนำให้ใช้สารที่มี iodine เป็นส่วนประกอบ เนื่องจากอาจมีการเปลี่ยนสภาพของจุลยารได้หลังจากเข้าเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ ทำให้มีโอกาสนปนเปื้อนของเชื้อได้ ทั้งให้แห้ง 30 วินาที จากนั้นเปลี่ยนหัวเข็มปลอดเชื้ออันใหม่แทงผ่านจุกยางค่อยๆ ปลอมเลือดลงในขวดเพาะเชื้อแล้วหมุนขวดเบาๆ เป็นวงกลม เพื่อให้เลือดผสมเข้ากับน้ำยาเพาะเลี้ยงเชื้อ

การส่งขวดเพาะเชื้อ

ส่งห้องปฏิบัติการเพาะเชื้อทันทีหลังจากเจาะเลือดเสร็จ หรือไม่ควรเกิน 24 ชั่วโมงหลังเจาะเลือด โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องระหว่างรอส่ง ห้ามแช่ในตู้เย็น

การแปลผล

สำหรับการแปลผลการเพาะเชื้อจากเลือด ตัวชี้บ่งที่ใช้ในการแปลผลเพื่อพิจารณาแยกการเพาะเชื้อที่พบเชื้อก่อโรคในกระแสเลือดออกจากการพบเชื้อปนเปื้อนในเลือด ตัวชี้วัดเหล่านี้ใช้แสดงขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ที่สามารถแยกเชื้อปนเปื้อนออกจากเชื้อก่อโรค⁽¹⁴⁾ ดังนี้

ความถี่ของการพบมีเชื้อขึ้นในขวดจากจำนวนขวดที่ทำการเพาะเชื้อ (Positive bottles among collections) เช่น เจาะเลือดสามขวดพบเชื้อขึ้นทั้งสามขวด หรือเจาะเลือดสองขวดพบเชื้อได้ทั้งสองขวด โอกาสที่ผู้ป่วยมีการติดเชื้อในกระแสเลือดจริงจะสูงมาก ในทางกลับกันความน่าเชื่อถือจะน้อยมากกรณีพบมีเชื้อขึ้นเพียงขวดเดียวจากการเจาะเลือดสามขวด เป็นต้น

ผลการย้อมแกรมจากขวดเลือดพบเชื้อ Gram positive cocci in cluster แสดงว่าเป็นเชื้อ *Staphylococci* spp. ซึ่งอาจเป็นเชื้อก่อโรค คือ *Staphylococcus aureus* หรืออาจเป็นเชื้อประจำถิ่นที่ผิวหนัง Coagulase-negative *Staphylococcus* spp. ซึ่งไม่ก่อโรค ถ้าย้อมได้ Gram positive rod ตัวโตชี้บ่งว่าเป็น *Bacillus* spp. ซึ่งเป็นเชื้อในสิ่งแวดล้อม แสดงว่ามีการปนเปื้อนที่ตำแหน่งเจาะเลือดและทำความสะอาดผิวหนังไม่ดี การชี้บ่งการติดเชื้อด้วยการย้อมแกรมเพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอ เนื่องจากเชื้อบางส่วนที่กล่าวมานี้อาจเป็นเชื้อก่อโรคก็ได้

จำนวน species ที่แยกได้แต่ละขวด เชื้อที่เพาะได้หลายชนิด (Multiple organism isolates) มักสัมพันธ์กับการปนเปื้อน เนื่องจากการทำความสะอาดผิวหนังไม่ดี การติดเชื้อในเลือดมักพบเชื้อเพียงชนิดเดียว

ระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญเติบโตจนตรวจพบเชื้อ ถ้าเจาะเลือดได้เพียงพอเวลาที่แบคทีเรียแบ่งตัวจนตรวจพบเชื้อได้มักไม่เกิน 48 ชั่วโมง กรณีที่มีเชื้อปริมาณมาก จะตรวจพบเชื้อได้เร็ว ในทางกลับกันเชื้อที่เจริญเติบโตช้า ชี้บ่งว่ามีจำนวนปริมาณเชื่อน้อยมากในขวด ซึ่งมักมีความจำเพาะ คือ ไม่มีเชื้อในเลือดแต่มีการปนเปื้อนในขวดเลือด

เมื่อเปรียบเทียบวิธีปฏิบัติการเก็บตัวอย่างเพื่อเพาะเชื้อ โรงพยาบาลพระอาจารย์ฝั้น อาจาโร ระหว่างก่อนการทบทวนปี พ.ศ. 2564 และหลังการทบทวนปี พ.ศ. 2565 มีการใช้น้ำยาทำความสะอาดที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 1

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่รวบรวมมาวิเคราะห์ด้วยสถิติเชิงพรรณนา ค่าเฉลี่ย ร้อยละ เปรียบเทียบผลระหว่างก่อนทบทวนและหลังทบทวน คำนวณอัตราการลดลงของเชื้อปนเปื้อนหลังการทบทวน โดยตั้งเป้าหมายการลดลงของค่าการปนเปื้อนในการศึกษาทดลองไม่น้อยกว่าร้อยละ 60 คำนวณอัตราการพบเชื้อปนเปื้อนร้อยละเฉลี่ยต่อปี โดยใช้สูตร

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบการใช้น้ำยาฆ่าเชื้อก่อนการทบทวนและหลังการทบทวนแนวปฏิบัติการเก็บตัวอย่างเลือด เพื่อเพาะเชื้อ โรงพยาบาลพระอาจารย์ฝั้น อาจาโร

แนวปฏิบัติ	น้ำยาที่ใช้ก่อนการทบทวน ปี พ.ศ. 2564	น้ำยาที่ใช้หลังการทบทวน ปี พ.ศ. 2565
การทำความสะอาดผิวหนัง	Povidone-iodine	2% Chlorhexidine gluconate ใน 70% alcohol
การทำความสะอาด จุกยางขวดเพาะเชื้อ	Povidone-iodine	2% Chlorhexidine gluconate ใน 70% alcohol

$$\frac{\text{จำนวนเชื้อที่ปนเปื้อน (Positive)} \times 100}{\text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมด (Total)}}$$

คำนวณอัตราการลดลงของเชื้อปนเปื้อนหลังการทบทวนในการเพาะเชื้อจากเลือด โดยใช้สูตร

$$\frac{(\text{อัตราการพบเชื้อปนเปื้อนร้อยละเฉลี่ยในปี พ.ศ. 2564} - \text{อัตราการพบเชื้อปนเปื้อนร้อยละเฉลี่ยในปี พ.ศ. 2565}) \times 100}{\text{อัตราการพบเชื้อปนเปื้อนร้อยละเฉลี่ยในปี พ.ศ. 2564}}$$

ผล

จากการรวบรวมข้อมูลผลการปนเปื้อนเชื้อในการเพาะเชื้อจากเลือดของผู้ป่วยในโรงพยาบาลพระอาจารย์ฝั้น อาจาโร พบว่าก่อนการทบทวนแนวปฏิบัติการเจาะเลือดเพื่อเพาะเชื้อ โรงพยาบาลพระอาจารย์ฝั้น อาจาโร ในปี พ.ศ. 2564 จำนวนขวดเพาะเชื้อจากเลือดที่มีการส่งตรวจทั้งหมด 1,724 ขวด และมีจำนวนขวดเพาะเชื้อที่พบเชื้อปนเปื้อน จำนวน 19 ขวด มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 1.58 ขวด

(คิดเป็นร้อยละ 1.10 ของจำนวนขวดทั้งหมด) หลังการทบทวนและกำหนดแนวทางปฏิบัติการลดการปนเปื้อนในการเพาะเชื้อจากเลือดในปี พ.ศ. 2565 จำนวนขวดเพาะเชื้อจากเลือดที่มีการส่งตรวจทั้งหมด 1,952 ขวด และมีจำนวนขวดเพาะเชื้อที่พบเชื้อปนเปื้อน จำนวน 5 ขวด มีค่าเฉลี่ย 0.42 ขวด (คิดเป็นร้อยละ 0.26 ของจำนวนขวดทั้งหมด) อัตราการลดลงของการปนเปื้อนโดยเฉลี่ยอยู่ที่ ร้อยละ 76.36 ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการตรวจการปนเปื้อนเชื้อในขวดที่ส่งตรวจเพาะเชื้อจากเลือดของผู้ป่วยในโรงพยาบาลพระอาจารย์ฝั้น อาจาโร เปรียบเทียบก่อนการทบทวนแนวปฏิบัติการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อเพาะเชื้อ โรงพยาบาลพระอาจารย์ฝั้น อาจาโร ในปี พ.ศ. 2564 และหลังการทบทวนในปี พ.ศ. 2565

ก่อนการทบทวน ปี พ.ศ. 2564			หลังการทบทวน ปี พ.ศ. 2565		
เดือน ปี	จำนวนขวดที่ ส่งตรวจ	จำนวนขวดที่ ปนเปื้อน	เดือน ปี	จำนวนขวดที่ ส่งตรวจ	จำนวนขวดที่ ปนเปื้อน
ต.ค. 2563	175	2	ต.ค. 2564	175	2
พ.ย. 2563	150	0	พ.ย. 2564	152	0
ธ.ค. 2563	170	0	ธ.ค. 2564	169	0
ม.ค. 2564	84	0	ม.ค. 2565	119	0
ก.พ. 2564	98	0	ก.พ. 2565	96	0
มี.ค. 2564	163	3	มี.ค. 2565	146	1

ตารางที่ 2 ผลการตรวจการปนเปื้อนเชื้อในขวดที่ส่งตรวจเพาะเชื้อจากเลือดของผู้ป่วยในโรงพยาบาลพระอาจารย์ฝั้น อาจาโร เปรียบเทียบก่อนการทบทวนแนวปฏิบัติการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อเพาะเชื้อ โรงพยาบาลพระอาจารย์ฝั้น อาจาโร ในปี พ.ศ. 2564 และหลังการทบทวน ในปี พ.ศ. 2565 (ต่อ)

ก่อนการทบทวน ปี พ.ศ. 2564			หลังการทบทวน ปี พ.ศ. 2565		
เดือน ปี	จำนวนขวดที่ ส่งตรวจ	จำนวนขวดที่ ปนเปื้อน	เดือน ปี	จำนวนขวดที่ ส่งตรวจ	จำนวนขวดที่ ปนเปื้อน
เม.ย. 2564	130	1	เม.ย. 2565	108	0
พ.ค. 2564	150	4	พ.ค. 2565	93	2
มิ.ย. 2564	186	1	มิ.ย. 2565	209	0
ก.ค. 2564	164	3	ก.ค. 2565	218	0
ส.ค. 2564	86	1	ส.ค. 2565	223	0
ก.ย. 2564	168	4	ก.ย. 2565	245	0
รวม	1,724	19	รวม	1,952	5
ค่าเฉลี่ย	143.66	1.58	ค่าเฉลี่ย	162.66	0.42
คิดเป็นร้อยละ		1.10	คิดเป็นร้อยละ		0.26
อัตราการลดลงของเชื้อปนเปื้อนคิดเป็นร้อยละ					76.36

ชนิดของเชื้อปนเปื้อนที่ส่งตรวจเพาะเชื้อในโรงพยาบาลพระอาจารย์ฝั้น อาจาโร พบว่าก่อนการทบทวน ปี พ.ศ. 2564 โดยใช้ Povidone-iodine ทำความสะอาดผิวหนังและฝาจากขวดเพาะเชื้อ จำนวนขวดเพาะเชื้อจากเลือดที่มีการส่งตรวจทั้งหมด 1,724 ขวด และมีจำนวนขวดเพาะเชื้อที่มีการพบเชื้อปนเปื้อนของเชื้อ Coagu-

lase-negative *Staphylococci* spp. จำนวน 17 ขวด เฉลี่ยร้อยละ 0.98 โดยที่หอผู้ป่วยชาย หอผู้ป่วยหญิง และหอผู้ป่วยเด็ก พบการปนเปื้อนจำนวน 6, 5 และ 6 ขวดตามลำดับ และพบเชื้อ *Viridans streptococcus* เฉลี่ยร้อยละ 0.12 โดยที่หอผู้ป่วยชายและหอผู้ป่วยหญิง พบการปนเปื้อนตีกละ 1 ขวด ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ชนิดเชื้อปนเปื้อนที่พบในขวดที่เก็บจากหอผู้ป่วยต่างๆ ที่ส่งตรวจ ก่อนการทบทวนแนวปฏิบัติการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อเพาะเชื้อ โรงพยาบาลพระอาจารย์ฝั้น อาจาโร ในปี พ.ศ. 2564

ก่อนการทบทวน ปี พ.ศ. 2564				
เดือน ปี	จำนวน ขวดที่ส่งตรวจ	ชนิดของเชื้อที่ปนเปื้อน	จำนวน	หอผู้ป่วยที่ส่งตรวจ
ต.ค. 2563	175	Coagulase-negative <i>Staphylococci</i> spp.	1	ตึกเด็ก
			1	ตึกชาย
พ.ย. 2563	150	-	0	ไม่พบการปนเปื้อน
ธ.ค. 2563	170	-	0	ไม่พบการปนเปื้อน
ม.ค. 2564	84	-	0	ไม่พบการปนเปื้อน
ก.พ. 2564	98	-	0	ไม่พบการปนเปื้อน
		Coagulase-negative <i>Staphylococci</i> spp.	2	ตึกชาย
มี.ค. 2564	163	<i>Viridans streptococcus</i>	1	ตึกชาย
เม.ย. 2564	130	Coagulase-negative <i>Staphylococci</i> spp.	1	ตึกหญิง

ตารางที่ 3 ชนิดเชื้อปนเปื้อนที่พบในขวดที่เก็บจากหอผู้ป่วยต่างๆ ที่ส่งตรวจ ก่อนการทบทวนแนวปฏิบัติการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อเพาะเชื้อ โรงพยาบาลพระอาจารย์ฝั้น อาจาโร ในปี พ.ศ. 2564 (ต่อ)

ก่อนการทบทวน ปี พ.ศ. 2564				
เดือน ปี	จำนวน ขวดที่ส่งตรวจ	ชนิดของเชื้อที่ปนเปื้อน	จำนวน	หอผู้ป่วยที่ส่งตรวจ
พ.ค. 2564	150	Coagulase-negative	2	ตึกชาย
		<i>Staphylococci</i> spp.	2	ตึกเด็ก
มิ.ย. 2564	186	Coagulase-negative <i>Staphylococci</i> spp.	1	ตึกชาย
ก.ค. 2564	164	Coagulase-negative <i>Staphylococci</i> spp.	3	ตึกหญิง
ส.ค. 2564	86	<i>Viridans streptococcus</i>	1	ตึกหญิง
ก.ย. 2564	168	Coagulase-negative	3	ตึกเด็ก
		<i>Staphylococci</i> spp.	1	ตึกหญิง
รวมทั้งปี	1,724	Coagulase-negative	6	ตึกชาย
		<i>Staphylococci</i> spp.	5	ตึกหญิง
		ค่าเฉลี่ย ร้อยละ 0.98	6	ตึกเด็ก
		<i>Viridans streptococcus</i>	1	ตึกชาย
		ค่าเฉลี่ย ร้อยละ 0.12	1	ตึกหญิง

ชนิดของเชื้อปนเปื้อนที่ส่งตรวจเพาะเชื้อใน โรงพยาบาลพระอาจารย์ฝั้น อาจาโร พบว่าหลังการ ทบทวนในปี พ.ศ. 2565 โดยใช้ 2% Chlorhexidine gluconate ใน 70% alcohol จำนวนขวดเพาะเชื้อจาก เลือดที่มีการส่งตรวจทั้งหมด 1,952 ขวด และมีจำนวน ขวดเพาะเชื้อที่มีการพบเชื้อปนเปื้อนของเชื้อ Coagu-

lase-negative *Staphylococci* spp. จำนวน 5 ขวด เฉลี่ยร้อยละ 0.26 โดยที่หอผู้ป่วยชาย หอผู้ป่วยหญิง และ หอผู้ป่วยเด็ก พบการปนเปื้อน จำนวน 1, 1 และ 3 ขวด ตามลำดับ ในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2564 เดือนมีนาคมและ พฤษภาคม พ.ศ. 2565 ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ชนิดเชื้อปนเปื้อนที่พบในหอผู้ป่วยที่ส่งตรวจภายหลังการทบทวนแนวปฏิบัติการเก็บตัวอย่างเลือด เพื่อเพาะเชื้อ โรงพยาบาลพระอาจารย์ฝั้น อาจาโร ในปี พ.ศ. 2565

เดือน ปี	จำนวน ขวดที่ส่งตรวจ	ชนิดของเชื้อที่ปนเปื้อน	จำนวน	หอผู้ป่วยที่ส่งตรวจ
ต.ค. 2564	175	Coagulase-negative	1	ตึกหญิง
		<i>Staphylococci</i> spp.	1	ตึกเด็ก
พ.ย. 2564	152	-	0	ไม่พบการปนเปื้อน
ธ.ค. 2564	169	-	0	ไม่พบการปนเปื้อน
ม.ค. 2565	119	-	0	ไม่พบการปนเปื้อน
ก.พ. 2565	96	-	0	ไม่พบการปนเปื้อน

ตารางที่ 4 ชนิดเชื้อปนเปื้อนที่พบในหอผู้ป่วยที่ส่งตรวจภายหลังการทบทวนแนวปฏิบัติการเก็บตัวอย่างเลือด เพื่อเพาะเชื้อ โรงพยาบาลพระอาจารย์ฝั้น อาจาโร ในปี พ.ศ. 2565 (ต่อ)

เดือน ปี	จำนวน ขวดที่ส่งตรวจ	ชนิดของเชื้อที่ปนเปื้อน	จำนวน	หอผู้ป่วยที่ส่งตรวจ
มี.ค. 2565	146	Coagulase-negative <i>Staphylococci</i> spp.	1	ตึกเด็ก
เม.ย. 2565	108	-	0	ไม่พบการปนเปื้อน
พ.ค. 2565	93	Coagulase-negative <i>Staphylococci</i> spp.	1 1	ตึกเด็ก ตึกชาย
มิ.ย. 2565	209	-	0	ไม่พบการปนเปื้อน
ก.ค. 2565	218	-	0	ไม่พบการปนเปื้อน
ส.ค. 2565	223	-	0	ไม่พบการปนเปื้อน
ก.ย. 2565	245	-	0	ไม่พบการปนเปื้อน
รวมทั้งปี	1,952	Coagulase-negative <i>Staphylococci</i> spp. ค่าเฉลี่ยร้อยละ 0.26	1 1 3	ตึกชาย ตึกหญิง ตึกเด็ก

วิจารณ์

จากผลการศึกษา พบว่าแม้ในบางเดือน ปี พ.ศ. 2565 จะมีอัตราการปนเปื้อนที่เพิ่มขึ้นจากหลายปัจจัย เช่น การเจาะเลือดยากในตัวของผู้ป่วยเองและในผู้ป่วยเด็กทารกในหอผู้ป่วยตึกเด็ก ตลอดจนความชำนาญและประสบการณ์ของบุคลากรในการเจาะเลือด ความยุ่งยากในการแปลผลเพื่อแยกการปนเปื้อนและการติดเชื้อก่อโรคแท้จริงในตัวอย่างเลือดออกจากกัน ทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนในผลการศึกษาได้เช่นกัน ผลการศึกษาพบว่า ภายหลังการทบทวนแนวทางปฏิบัติเพื่อลดการปนเปื้อนเชื้อในขวดเลือดที่ส่งตรวจเพาะเชื้อ พบผลการปนเปื้อนต่ำกว่าก่อนทบทวน ดังนั้นแนวทางปฏิบัติใหม่ ภายหลังการทบทวนนี้ที่ใช้ 2% Chlorhexidine gluconate ใน 70% alcohol ทำความสะอาดผิวหนังและจุกยางขวดเพาะเชื้อแทนการใช้ Povidone-iodine สามารถลดอัตราการปนเปื้อนเชื้อได้ลดลงเฉลี่ยร้อยละ 76.36 ซึ่งมากกว่าค่าเป้าหมายที่ตั้งสมมติฐานไว้ที่ร้อยละ 60 เนื่องจากประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อดีเทียบเท่า Povidone-iodine แต่ระยะเวลาที่ในการรอให้แห้งน้อยกว่าเพียง 30 วินาที และมีประสิทธิภาพฆ่าเชื้อสูงสุด (Maximum antiseptic effect) ของ 2% Chlorhexidine gluconate ใน 70% alcohol มากกว่า แต่ถ้าใช้ Povidone-iodine จะต้อง

รอทิ้งไว้ให้แห้งถึง 2 นาที ซึ่งในทางปฏิบัติบุคลากรที่เจาะเลือดผู้ป่วยมักจะไม่ว่างถึง 2 นาที นอกจากเหตุผลในแง่ของการแห้งเร็วและระยะเวลาที่มีประสิทธิภาพฆ่าเชื้อสูงสุดเร็วแล้ว การคงเหลือของประสิทธิภาพของยาหลังทาดีกว่า⁽¹⁴⁾ ประโยชน์ส่วนนี้เห็นได้ชัดในกรณีผู้ป่วยที่เจาะเลือดยากใช้เวลาเจาะนาน ทำให้ประสิทธิภาพของยายังมีอยู่นานกว่าไม่หมดฤทธิ์ก่อนที่จะได้เลือดผู้ป่วย ทำให้ลดโอกาสปนเปื้อนได้ดีกว่าการใช้ Alcohol หรือ Povidone-iodine และอีกประการหนึ่ง Povidone-iodine ทำให้จุกยางปิดขวดเลือดเปลี่ยนสภาพสีกร่อนได้ เกิดการปนเปื้อนจากเชื้อภายนอกได้สูง สำหรับขั้นตอนการเจาะดูดเลือดจากผู้ป่วย อาจลดปัญหาการปนเปื้อนขณะเพาะเชื้อโดยการปรับเปลี่ยนมาใช้ Antiseptic agent ที่เหมาะสม จากการศึกษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ก่อนหน้านี้สอดคล้องกับผลการศึกษาในการวิจัยในโรงพยาบาลพระอาจารย์ฝั้น อาจาโร พบว่าการใช้ 2% Alcoholic chlorhexidine เพื่อเช็ดทำความสะอาดผิวหนังก่อนเจาะเลือดจากผู้ป่วย นั้นมีอัตราการปนเปื้อนเชื้อขณะเพาะเชื้อในเลือดน้อยกว่าการใช้ 10% Aqueous povidone-iodine อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ⁽¹²⁾ ส่วนการเจาะเลือดที่เหมาะสมและถูกขั้นตอนจะต้องปฏิบัติตามแนวทางที่วางไว้อย่างเคร่งครัด เพื่อลดอัตราการ

ปนเปื้อนของเชื้อ ซึ่งในปัจจุบันเนื่องจากเทคโนโลยีการเพาะเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงแม้มีเชื้อเพียงเล็กน้อยก็สามารถเพาะเชื้อขึ้นได้ ดังนั้นการทบทวนวิธีการเจาะเลือดในทุกขั้นตอน ตั้งแต่การเตรียมอุปกรณ์ การเจาะเลือด ตำแหน่งหลอดเลือดที่เหมาะสมในการเจาะเลือด การล้างมือก่อนการเจาะ ซึ่งการปนเปื้อนขณะเจาะเก็บเลือดเพื่อเพาะเชื้อสามารถลดได้หากเช็ดบริเวณผิวหนังที่จะเจาะด้วย 2% Chlorhexidine gluconate ใน 70% alcohol นาน 30 วินาที⁽¹⁵⁾ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาที่พบในงานวิจัยนี้ โดยหลังการทบทวนแนวปฏิบัติใช้ 2% Chlorhexidine gluconate ใน 70% alcohol ทำความสะอาดผิวหนังและจุกยางขวดเพาะเชื้อแทนการใช้ Povidone-iodine เมื่อก่อนการทบทวน ซึ่งผลการศึกษาสามารถลดอัตราการปนเปื้อนเชื้อได้ลดลงเฉลี่ยร้อยละ 76.36

จากผลการศึกษา พบว่าในหอผู้ป่วยทุกตึกมีการพบชนิดของเชื้อที่ปนเปื้อนมากที่สุด Coagulase-negative *Staphylococci* spp. ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาอื่น ๆ^(16,17) ซึ่งอาจเกิดจากการที่ผิวหนังผู้ป่วยมีเชื้อ skin normal flora กลุ่ม Coagulase-negative *staphylococci* spp. เช่น *Staphylococci epidermidis* และ *Staphylococci capitis* ที่เป็น Biofilm-forming strains ซึ่งสามารถสร้าง Biofilm จึงเกาะบนผิวหนังได้ดี⁽¹⁸⁾ และทนต่อการฆ่าเชื้อด้วยน้ำยา Alcoholic chlorhexidine⁽¹⁹⁾ ทำให้ยังคงเหลือเชื้อ Skin flora ปนเปื้อนภายหลังจากการทำความสะอาด

ดังนั้นจึงขอเสนอแนะควรมีการจัดอบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง การเจาะเลือดส่งตรวจเพาะเชื้อแก่บุคลากรโดยเฉพาะบุคลากรใหม่ เพื่อสร้างความตระหนักถึงการปฏิบัติตามหลักการป้องกันการปนเปื้อนเชื้อจุลชีพในเลือดที่ส่งตรวจเพาะเชื้ออย่างเคร่งครัด โรงพยาบาลควรมีการสนับสนุนทั้งด้านนโยบาย งบประมาณ และอุปกรณ์ในการเจาะเลือดส่งตรวจเพาะเชื้อ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาต้องพัฒนาคุณภาพให้ได้มาตรฐานอย่างต่อเนื่อง การส่งเสริมให้บุคลากรที่เกี่ยวข้องของโรงพยาบาลปฏิบัติตามแนวทางที่กำหนดจากการทบทวนแนวปฏิบัติอย่างเป็นระบบพบว่า ใช้วิธีการเดียวได้ผล

ไม่มากนัก ควรใช้หลายวิธีประกอบกันจึงจะทำให้บุคลากรเกิดการปรับเปลี่ยนพฤติกรรมได้⁽²⁰⁾

สรุป

ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าแนวทางปฏิบัติการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อการเพาะเชื้อจากเลือดที่จัดทำขึ้นใหม่หลังการทบทวนโดยใช้ 2% Chlorhexidine gluconate ใน 70% alcohol ทำความสะอาดผิวหนังและจุกยางขวดเพาะเชื้อนั้น มีประสิทธิภาพในการลดการปนเปื้อนในการเพาะเชื้อจากเลือดได้มากกว่าก่อนการทบทวนที่ใช้ Povidone-iodine โดยที่สามารถลดอัตราการปนเปื้อนเชื้อได้ลดลงเฉลี่ยร้อยละ 76.36 ซึ่งมากกว่าค่าเป้าหมายที่ตั้งสมมติฐานไว้ที่ร้อยละ 60 และเชื้อปนเปื้อนที่พบมากคือ เชื้อ Coagulase-negative *Staphylococci* spp. ดังนั้นแนวทางปฏิบัติใหม่นี้จึงมีบทบาทสำคัญในการช่วยลดการปนเปื้อนจากการเพาะเชื้อจากเลือดช่วยให้เพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อในกระแสเลือด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ พญ. กัญญาภัค ศิลารักษ์ ผู้อำนวยการโรงพยาบาลพระอาจารย์ฝั้น อาจาโร และ น.ส. จลิตา พ้ออามาตย์ หัวหน้ากลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลพระอาจารย์ฝั้น อาจาโร ที่ให้คำปรึกษา งานวิจัยและข้อเสนอแนะ รวมทั้งให้การสนับสนุนทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี และขอขอบคุณ คณะกรรมการป้องกันและควบคุมการติดเชื้อในโรงพยาบาลพระอาจารย์ฝั้น อาจาโร สำหรับการให้ข้อเสนอแนะและแนวคิดในการศึกษาครั้งนี้ด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. นริศรา ธรรมทัช, วิลาวัณย์ พิเชียรเสถียร, พิมพาภรณ์ กลั่นกลิ่น. อัตราการปนเปื้อนเชื้อจุลชีพในเลือดส่งตรวจเพาะเชื้อที่เก็บโดยถุงมือปราศจากเชื้อกับถุงมือสะอาด. พยาบาลสาร 2559; 43(4): 55-66.
2. นภสร ดวงสมสา, วิลาวัณย์ พิเชียรเสถียร, พิกุล บุญช่วง. ผลของการพัฒนาคุณภาพโดยทีม พยาบาลต่ออัตราการ

- ปนเปื้อนเชื้อจุลชีพในเลือดที่ส่งตรวจเพาะเชื้อ. พยาบาลสาร 2555; 40(4): 12-21.
3. เขาวมาลย์ เหลืองอร่าม, วิลาวณีย์ พิเชียรเสถียร, ลัดดาวัลย์ ภูมิวิหุเวช. การลดอัตราการปนเปื้อนเชื้อจุลชีพในตัวอย่างเลือดที่ส่งตรวจเพาะเชื้อ. วชิการสาธารณสุข 2552; 18(2): 230-41.
4. Akpaka PE, Christian N, Bodonaik NC, Smikle MF. Epidemiology of Coagulase-negative staphylococci isolate from clinical blood specimen at the university hospital of the west indies. West Indian Med J 2006; 55(3): 170-3.
5. สุวรรณิ จิตรเอื้อกุล, จินตนา พาวงค์, สยมภู สงวนสิทธิพันธ์, รุ่งกาญจน์ สังวรภัท, ธีรวัฒน์ วรรณตุง. อัตราการปนเปื้อนจากการเพาะเชื้อจากเลือดในโรงพยาบาลสุราษฎร์ธานี. ว สุขภาพและสิ่งแวดล้อมศึกษา 2566; 8(4): 747-54.
6. สุรางค์ เดชศิริเลิศ, สุวรรณา ตระกูลสมบูรณ์, กาญจนา คชินธร. แนวปฏิบัติการเจาะเลือดเพื่อเพาะเชื้อและการเพาะเชื้อก่อโรคจากเลือด. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2544.
7. กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลพระอาจารย์ฝั้น อาจาโร. รายงานระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการ. สกลนคร: โรงพยาบาลพระอาจารย์ฝั้น อาจาโร; 2564.
8. วิจิตร อาวะกุล. เชื้อจุลชีพในตัวอย่างเลือดที่ตรวจเพาะเชื้อ. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2540.
9. สุวรรณา ตระกูลสมบูรณ์, วิภา ตรีรัตน์วีรพงษ์, ฉันทนา อรัญญะ. การเพาะเชื้อจากเลือด. ใน: มาลัย วรจิตร, วันทนา ปวีณกิตติพร, สุวรรณา ตระกูลสมบูรณ์, สุรางค์ เดชศิริเลิศ, บรรณาธิการ. คู่มือการปฏิบัติงานแบบที่เรียและราสำหรับโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 3. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2561. หน้า 54-60.
10. Suwanpimolkul G, Pongkumpai M, Suankratay C. A randomized trial of 2% Chlorhexidine tincture compared with 10% aqueous povidone-iodine for venipuncture site disinfection: effects on blood culture contamination rate. J Infect 2008; 56(5): 354-9.
11. Mimoz O. Preoperative skin cleansing with chlorhexidine-alcohol reduces surgical site infection after clean-contaminated surgery compared with povidone-iodine. Evid Based Nurs 2010; 13(2): 36-7.
12. Maiwald M, Chan ES. The forgotten role of alcohol: a systematic review and meta-analysis of the clinical efficacy and perceived role of chlorhexidine in skin antisepsis. PLoS One. 2012; 7(9): e44277. (12 pages).
13. ญัฐณิพัชร์ อ่อนตาม. เทคนิคการบริหารงานแบบ PDCA (Deming Cycle). ว สมาคมพัฒนาวิชาชีพการบริหารการศึกษาแห่งประเทศไทย; 2562; 1(3): 39-46.
14. มาลัย วรจิตร, วันทนา ปวีณกิตติพร, สุวรรณา ตระกูลสมบูรณ์, สุรางค์ เดชศิริเลิศ, บรรณาธิการ. คู่มือการปฏิบัติงานแบบที่เรียและรา สำหรับโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 3. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2561.
15. คณาวิภา ไบพฤกษ์ทอง. การศึกษาทางคลินิกแบบสุ่มเปรียบเทียบลำดับขั้นตอนการเก็บตัวอย่างเลือดที่แตกต่างกันเพื่อลดการปนเปื้อนในตัวอย่างเลือดที่ส่งตรวจเพาะเชื้อ [วิทยานิพนธ์]. ภาควิชาอายุรศาสตร์, คณะแพทยศาสตร์. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์; 2564.
16. Tenderenda A, Lysakowska M, Dargiewicz R, Gawron-Skarbek A. Blood culture contamination: a single general hospital experience of 2-year retrospective study. Int J Environ Res Public Health 2022; 19(5): 3009. (14 pages).
17. Waltzman ML, Harper M. Financial and clinical impact of false-positive blood culture results. Clin Infect Dis 2001; 33(3): 296-9.
18. Wojtyczka RD, Orlewska K, Kepa M, Idzik D, Dziedzic A, Mularz T, et al. Biofilm formation and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* strains from a hospital environment. Int J Environ Res Public Health 2014; 11(5): 4619-33.

19. Taha M, Kalab M, Yi QL, Landry C, Greco-Stewart V, Brassinga AK, et al. Biofilm-forming skin microflora bacteria are resistant to the bactericidal action of disinfectants used during blood donation. *Transfusion* 2014; 54(11): 2974-82.
 20. Bero LA, Grilli R, Grimshaw JM, Harvey E, Oxman AD, Ann M. Getting research findings into practice: closing the gap between research and practice: an overview of systematic reviews of interventions to promote the implementation of research findings. *BMJ* 1998; 317(15): 465-8.
-

Study on Reducing Contamination in Hemoculture at Phra Ajan Fan Arjaro Hospital, Thailand

Pradsakon Chouisudsakunchai

Medical Technology Division, Phra Ajan Fan Arjaro Hospital, Pannanikhom District, Sakonnakhon 47130, Thailand

ABSTRACT Reducing contamination in blood cultures is crucial because improper sample collection, which leads to contamination in blood samples, can result in incorrect diagnoses. These may cause inappropriate treatment and unnecessarily increased healthcare costs. The study conducted at Phra Ajan Fan Arjaro Hospital, Sakonnakhon, Thailand, aimed to compare the reduction of blood culture contamination before and after the implementation of revised procedures. The data were collected on the number of blood culture bottles found to be contaminated in two periods, before and after the procedure revision. The data were analyzed using descriptive statistics, mean, and percentage. The pre-review results showed an average of 0.98% Coagulase-negative *Staphylococci* spp. and 0.12% *Viridans streptococcus*. The post-review results showed an average of 0.26% Coagulase-negative *Staphylococci* spp., therefore, the average contamination was reduced to 76.36%, higher than the target goal of 60%. This demonstrated the effectiveness of the revision of the procedures in reducing contamination.

Keywords: Hemoculture contamination, Contaminated blood for hemoculture, Contaminated blood

Development and Validation of a Real-Time PCR Assay for *HLA-A*31:01* Genotyping in Pharmacogenetic Screening

Nuanjun Wichukchinda¹, Wimala Inunchot², Tiparat Potipitak²,
Sukanya Wattanapokayakit², and Surakameth Mahasirimongkol³

¹Medical Sciences Technical Office, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

²Medical Life Sciences Institute, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

³Technical and Planning Division, Department of Thai Traditional and Alternative Medicine, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Carbamazepine (CBZ) is a widely prescribed anticonvulsant for the treatment of epilepsy, trigeminal neuralgia, and bipolar disorder. Although therapeutically effective, CBZ can trigger severe adverse drug reactions (SADRs), including life-threatening severe cutaneous adverse reactions (SCARs). Robust pharmacogenomic evidence has linked CBZ-induced SADRs to specific human leukocyte antigen (HLA) alleles, particularly *HLA-B*15:02* (along with other alleles in the *HLA-B75* serotype group) and *HLA-A*31:01*. While clinical testing for *HLA-B*15:02/B75* is widely accessible in Thailand, *HLA-A*31:01* genotyping remains unavailable in many settings, leaving a critical gap in comprehensive pharmacogenetic risk assessment. This gap is of particular concern because *HLA-A*31:01* is associated with a broader spectrum of CBZ hypersensitivity and is more prevalent in populations where *HLA-B*15:02* is uncommon. To close this limitation, we developed and validated a real-time PCR assay for *HLA-A*31:01* to complement existing genotyping services. Clinical validation was performed on 198 genomic DNA samples with known *HLA-A* genotypes, including 14 *HLA-A*31:01*-positive and 184 negative samples. The assay demonstrated high sensitivity with a reliable detection range of 0.78–200.00 ng DNA/reaction and revealed 100% concordance with the reference method. Its simplicity, speed, and compatibility with standard laboratory workflows highlight its clinical utility. This assay represents a significant step toward safer, personalized CBZ therapy by enabling comprehensive, preemptive screening for SADR-associated *HLA* alleles.

Keywords: *HLA-A*31:01*, Real-time PCR, Carbamazepine, Severe adverse drug reactions (SADRs), Pharmacogenetics

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

Received: 15 May 2025

Revised: 9 June 2025

Accepted: 10 June 2025

Introduction

Carbamazepine (CBZ) is a commonly prescribed anticonvulsant used to manage epilepsy, trigeminal neuralgia, and bipolar disorder.⁽¹⁾ Its mechanism of action involves inhibiting voltage-gated sodium channels in the brain, thereby mitigating seizures and neuropathic pain.⁽²⁾ Despite its clinical efficacy, CBZ is a known cause of severe drug hypersensitivity reactions, particularly severe cutaneous adverse reactions (SCARs) such as Stevens-Johnson Syndrome (SJS), Toxic Epidermal Necrolysis (TEN), and Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms (DRESS), which can lead to significant morbidity and mortality.⁽²⁻⁴⁾

Pharmacogenomic studies have identified strong associations between CBZ-induced severe drug hypersensitivity reactions and specific *Human Leukocyte Antigen (HLA)* alleles, notably *HLA-B*15:02* and *HLA-A*31:01*.^(1, 5-7) *HLA-B*15:02* is a key member of the B75 serotype, which also includes *HLA-B*15:08*, *HLA-B*15:11*, *HLA-B*15:21*, and *HLA-B*15:31*. *HLA-B*15:02* is strongly associated with CBZ-SCARs, predominantly among East and Southeast Asian populations. Its prevalence reaches 10–15% in Han Chinese, 8–12% in Thai populations, and approximately 12% in Malaysians, but remains rare among Europeans, Japanese, and Africans.^(3,8) Other B75 alleles, including *HLA-B*15:08*, *HLA-B*15:11*, and *HLA-B*15:21*, though found at lower frequencies, have also been implicated in CBZ-induced SCARs.^(7, 9-11)

Conversely, *HLA-A*31:01* is associated with a broader spectrum of CBZ hypersensitivity reactions, including maculopapular eruptions and DRESS. Its prevalence is approximately

8% in Japanese, 4–7% in Koreans, 2–5% in Europeans, and 1–2% in South Asians.^(1,5)

Based on these associations, the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) and U.S. Food and Drug Administration (FDA) recommend genetic testing for both *HLA-B*15:02* and *HLA-A*31:01* before CBZ therapy initiation.^(6,12)

HLA typing can be conducted using various technologies. Sanger sequencing and bead-based hybridization have been used for decades.⁽¹³⁾ They are resource-intensive and require specialized personnel. Next-Generation Sequencing (NGS) offers high resolution but is limited in routine clinical use due to its high cost and complexity.⁽¹⁴⁾ In contrast, real-time PCR and conventional PCR provide faster turnaround, cost-efficiency, and are suitable for most molecular laboratories.⁽¹⁵⁻¹⁷⁾ Although Single-Nucleotide Polymorphism (SNP)-based real-time PCR assays using tag-SNPs, such as rs1061235 or rs17179220, have been investigated for *HLA-A*31:01* detection due to their cost-effectiveness.^(18,19) These assays often show diminished specificity, especially in admixed populations, which restricts their practical application and underscores the superiority of allele-specific real-time PCR as a more dependable alternative.

Currently, PCR-based pharmacogenetic testing for *HLA-B*15:02* and the broader *HLA-B75* group is available through the Department of Medical Sciences under Thailand's National Health Security Office scheme.⁽²⁰⁾ However, these tests do not include *HLA-A*31:01* genotyping, leaving a diagnostic gap in the preemptive screening of CBZ-induced severe drug hypersensitivity reactions.

In contrast, medical schools and high-end private hospitals typically use HLA typing, laboratory-developed tests, or commercial kits for *HLA-A*31:01*, which are not aligned with the methodology implemented in the Department of Medical Sciences (DMSc) network. Remarkably, to facilitate nationwide implementation, DMSc completed the technical transfer of *HLA-B*75* real-time PCR testing to the private sector in 2024. Developing an additional real-time PCR assay for *HLA-A*31:01* can bridge this gap and support broader clinical adoption. This study addressed that need by developing and validating a real-time PCR assay specifically for *HLA-A*31:01*, aiming to expand the detection of CBZ-induced adverse reactions. Wider availability of this assay could improve drug safety across diverse Thai populations and strengthen national pharmacovigilance and precision medicine in Thailand.

Materials and Methods

DNA samples

This study utilized leftover genomic DNA (gDNA) from EDTA-anticoagulated blood samples originally collected during the Third Thailand National Health Examination Survey (NHES III). A total of 650 gDNA samples had previously undergone HLA-A allele typing using a bead-based hybridization assay (WAKFlow HLA Typing Kit and WAKFlow Typing Software, WAKUNAGA, Japan) as part of a prior study.⁽²¹⁾ For the present study, a subset of 198 DNA samples was selected for clinical validation, comprising 31 *HLA-A*31:01*-positive and 167 *HLA-A*31:01*-negative samples.

The gDNA used in this study was previously extracted using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Germany), following the manufacturer's protocol. Each extraction involved processing 200 µL of EDTA-anticoagulated blood to obtain 50 µL of genomic DNA. For the current study, the quality and concentration of the leftover gDNA were reassessed using NanoDropTM 2000 spectrophotometry (Thermo Scientific, USA), ensuring an OD₂₆₀/OD₂₈₀ ratio between 1.60 and 2.00 and a minimum DNA concentration of 20 ng/µL.

Ethical approval

Ethics approval for this research was granted by the Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand (Protocol No. 33/2566, December 6, 2023).

Plasmid controls

A 500-bp synthetic DNA fragment corresponding to the *HLA-A*31:01:02:01* allele (spanning exon 2 to exon 3, including intron 2) was cloned into the pMK-RQ (KanR) vector. Additionally, a 980-bp segment of the *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1* (*TIMP1*) gene, located on the human X chromosome, was inserted into the pMK-RQ (AmpR) vector to serve as an internal control. Both plasmids were custom-designed and synthesized by Invitrogen (Invitrogen, USA).

The *TIMP1* plasmid was diluted to a final concentration of 50 copies/µL and used as a plasmid negative control (pNC). Equal concentrations of 100 copies/µL for both the *HLA-A*31:01* and *TIMP1* plasmids were combined to create a plasmid positive control (pPC). Quality control for each batch of genomic

DNA (gDNA) testing included the pNC, pPC, and nuclease-free water as a no-template control (NTC).

Primers and probes design

A comprehensive multiple sequence alignment of all known *HLA-A* alleles spanning exons 1 to 4 was conducted using *HLA-A*31:01:02.01* as the reference sequence. The alignment was performed with the web-based Major Histocompatibility Complex database (dbMHC) Sequence Alignment Viewer (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Web/Newsltr/Summer03/dbMHC.html>), which identified unique polymorphic regions for primer and probe design. Primers and probes were designed using Primer Express Software v3.0.1 (Applied

Biosystems, USA) to optimize melting temperature (T_m), GC content, and reduce the potential for secondary structures and dimer formation.

The *HLA-A*31:01*-specific probe was labeled with Cy5.5 at the 5' end and quenched with a minor groove binder (MGB). The *TIMP1* internal control probe was labeled with Cy5 and also quenched with MGB for spectral resolution in duplex PCR. The detailed characteristics of the primers and probes used in this study are presented in Table 1.

The designed primers and probes used in this assay have been submitted for petty patent registration with the Department of Intellectual Property, Thailand (Application No. 250300202).

Table 1 Sequences and properties of primers and probes for *HLA-A*31:01* and *TIMP1* detection

Primer/Probe name	Sequence (5' to 3')	Size (bp)	T_m (°C)	CG (%)	PCR product (bp)
A3101-F	GGC TCC CAC TCC ATG AGG TAT TTA AC	26	65.6	54	237
A3101-R	CCC CAG GTC CAC TCG GTC AA	20	64.0	65	
A3101-probe	Cy5.5- CTC CTG GTC CCA ATA CTC AGG CCT - MGB	24	78.0	58	
TIMP1-F	CAT GGA GAG TGT CTG CGG ATA CTT	24	60.5	50	74
TIMP1-R	TGC CTC ACC AGC AAT GAG AAA	21	60.3	48	
TIMP1-probe	CY5- ACA GGT CCC ACA ACC GCA GCG A -MGB	22		65	
			80.0		

Real-time PCR optimization for the detection of *HLA-A*31:01*

Real-time PCR optimization involved titration of primers and probes (0.1 to 2.0 μ M). Reactions (12 μ L) consisted of 2 μ L DNA and 10 μ L KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix (Roche, USA) with appropriate primer and probe concentrations. Temperature optimization was performed via gradient PCR (57.0°C to 72.0°C) using the CFX Opus Real-Time PCR

System (BioRad, USA), which automatically generated eight temperature points: 57.0°C, 58.0°C, 60.0°C, 62.9°C, 66.5°C, 69.5°C, 71.2°C, and 72.0°C. Amplification curves and C_t values were analyzed using CFX Maestro Software (BioRad, USA). An *HLA-A*31:01*-positive and an *HLA-A*31:01*-negative gDNA samples (20 ng/ μ L) were used to identify the optimal conditions for specific and efficient amplification.

Method validation

Analytical performance was assessed in duplicate with a two-fold serial dilution of DNA across 12 dilution points, from 100 ng/μL down to 0.049 ng/μL. Amplifications were run under optimized PCR conditions, and reactions yielding Ct values below 30 for both Cy5 (*TIMP1*) and Cy5.5 (*HLA-A*31:01*) were interpreted as positive.

Validation of clinical sample testing was performed using 198 gDNA samples, comparing real-time PCR results with those obtained from the bead-based hybridization. Discordant samples were re-evaluated by Oxford Nanopore Technology (ONT) long-read sequencing at the Siriraj Long-Read Lab.⁽²²⁾

Results

Real-time PCR optimization for the detection of *HLA-A*31:01*

The final real-time PCR assay was established based on conditions optimized during the development phase that yielded the

best results. Each 12 μL reaction included 2 μL of DNA template and 10 μL of master mix. The mix comprised 2.0 μM each of *HLA-A*31:01*-specific forward and reverse primers, 1.0 μM of the Cy5.5-labeled probe, and 100 nM and 40 nM of *TIMP1* primers and Cy5-labeled probe, respectively.

For thermal optimization using gradient PCR, strong and specific Cy5.5 fluorescence signals were consistently observed in an *HLA-A*31:01*-positive sample between 57.0°C and 69.5°C, although the signal was poor at 69.5°C, with a Ct value of 30.50. In contrast, weaker and non-specific signals (Ct < 30) were detected in an *HLA-A*31:01*-negative sample at temperatures between 57.0°C and 62.9°C. The *HLA-A*31:01*-negative sample also gave a very low signal at 66.5°C. From these findings, 67°C was selected as the optimal annealing/extension temperature, balancing specificity and workflow compatibility with our current B75 genotyping. The amplification plots for positive and negative samples at various temperatures are shown in Figure 1.

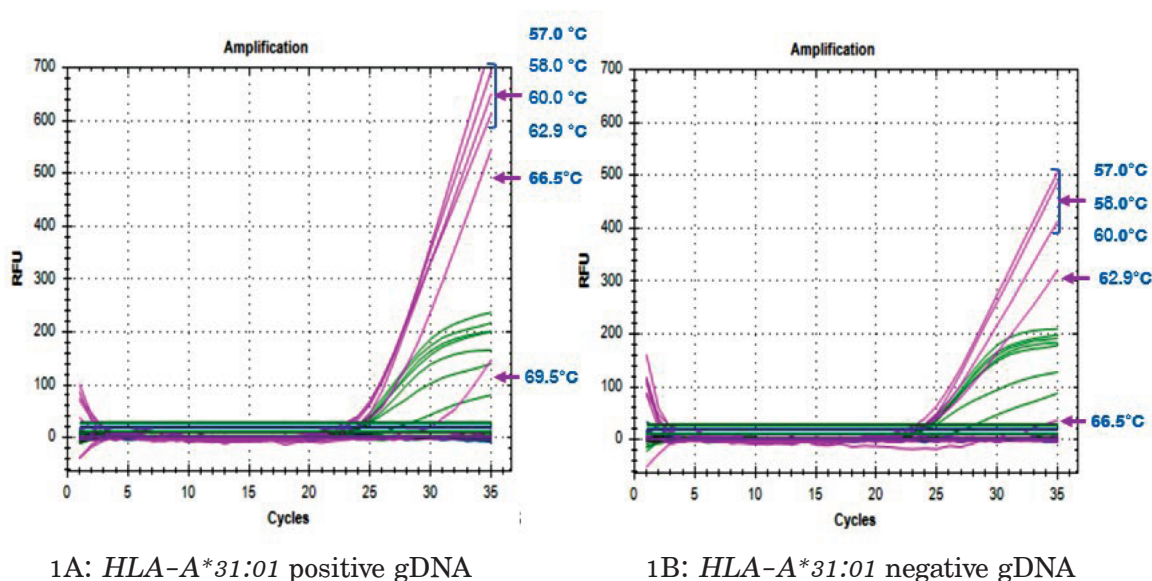


Figure 1 Amplification plot of an *HLA-A*31:01* positive gDNA (1A) and an *HLA-A*31:01* negative gDNA (1B) at eight temperature points; 57.0°C, 58.0°C, 60.0°C, 62.9°C, 66.5°C, 69.5°C, 71.2°C and 72.0°C. The pink curves represent Cy5.5 fluorescence from the *HLA-A*31:01* probe; the green curves represent Cy5 fluorescence from the *TIMP1* probe.

Based on the results from gradient temperature optimization, the finalized thermal profile included an initial denaturation at 95°C for 3 minutes, followed by 35 cycles at 95°C for 20 seconds and 67°C for 1 minute. This configuration ensured reliable and reproducible amplification of the *HLA-A*31:01* allele in both clinical and research samples.

Validation of the detection range

The analytical performance was assessed by performing two-fold serial dilutions of

genomic DNA ranging from 100 ng/μL to 0.049 ng/μL in duplicate. Robust and consistent amplification signals ($C_t < 30$) were observed in 9 out of 12 dilution points, corresponding to DNA amount between 200.00 and 0.78 ng per reaction, for both the *HLA-A*31:01* target and the *TIMP1* internal control. Even the dilution point at 0.39 ng/reaction showed an amplification curve and detectable signal; its C_t value was 32.5, which exceeded the threshold of 30 and was thus interpreted as negative. Amplification curves for all 12 DNA dilutions are shown in Figure 2.

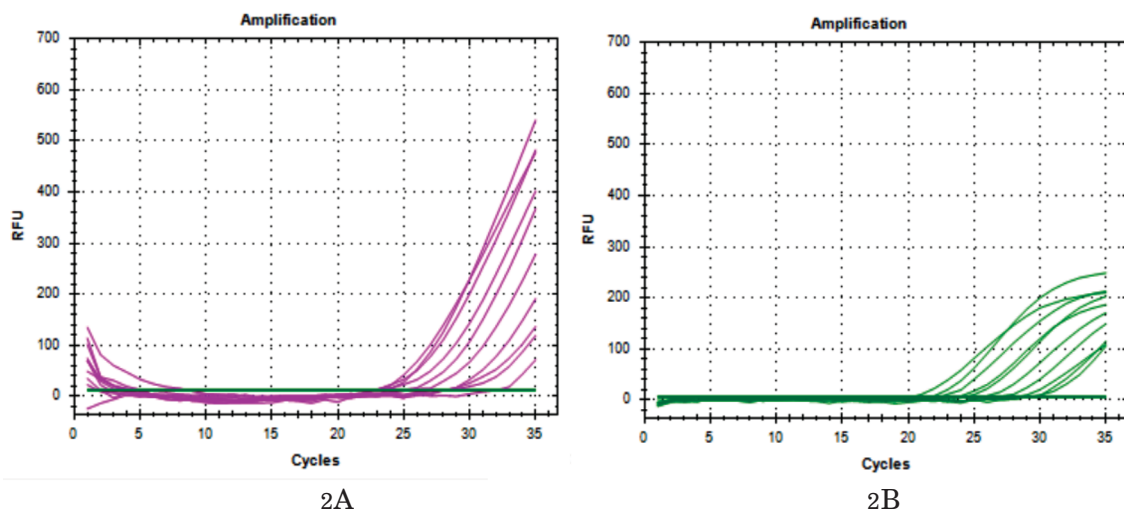


Figure 2 Amplification plot of an *HLA-A*31:01*-positive gDNA sample across a series of concentrations. A two-fold serial dilution of 100 ng/μL from an *HLA-A*31:01*-positive gDNA sample was performed, resulting in 12 concentrations ranging from 100 ng/μL to 0.049 ng/μL. Positive signals were observed in 9 out of the 12 tested concentrations (equivalent to 200.00 to 0.78 ng per reaction). Panel 2A displays the Cy5.5 signal (pink) generated by the A3101 probe, while Panel 2B illustrates the Cy5 signal (green) from the *TIMP1* probe. Panels 2A and 2B represent data from the same real-time PCR experiment.

Validation of clinical sample testing

Among the 198 clinical DNA samples tested, the real-time PCR assay accurately identified 14 samples as *HLA-A*31:01*-positive. These 14 positive samples showed C_t values below 30 for both Cy5.5 (*HLA-A*31:01*) and Cy5 (*TIMP1*) signals, with mean $\pm$ SD of 24.77 ± 2.17

and 20.36 ± 0.77 , respectively. The 167 negative samples yielded only Cy5 (*TIMP1*) signal with a mean $\pm$ SD of 20.53 ± 0.92 .

In comparison, the bead-based hybridization method previously identified 31 positive samples.⁽²¹⁾ To resolve this discrepancy, the 17 discordant samples (reported positive by

hybridization but negative by PCR), along with 3 concordant samples (positive by both assays), were retested using Oxford Nanopore Technology (ONT) long-read sequencing at the Siriraj Long-Read Lab. ONT confirmed that the 3 concordant samples were true carriers of *HLA-A*31:01*. However, all 17 discordant samples were negative for *HLA-A*31:01*, fully aligning with the PCR assay's results and indicating that the hybridization method had overinterpreted positives due to misclassification. This analysis established 100%

concordance between the developed PCR assay and ONT-confirmed genotypes, validating its accuracy and clinical reliability. Figure 3 illustrates the amplification performance of 37 gDNA samples, as a representative subset from the 198 samples analyzed during such validation. Among these, two *HLA-A*31:01*-positive samples were detected. The plot demonstrates a clear differentiation of the CY5.5 signal between positive reactions (gDNA and the plasmid positive control (pPC) and negative ones (negative samples (pNC) and no-template control (NTC)).

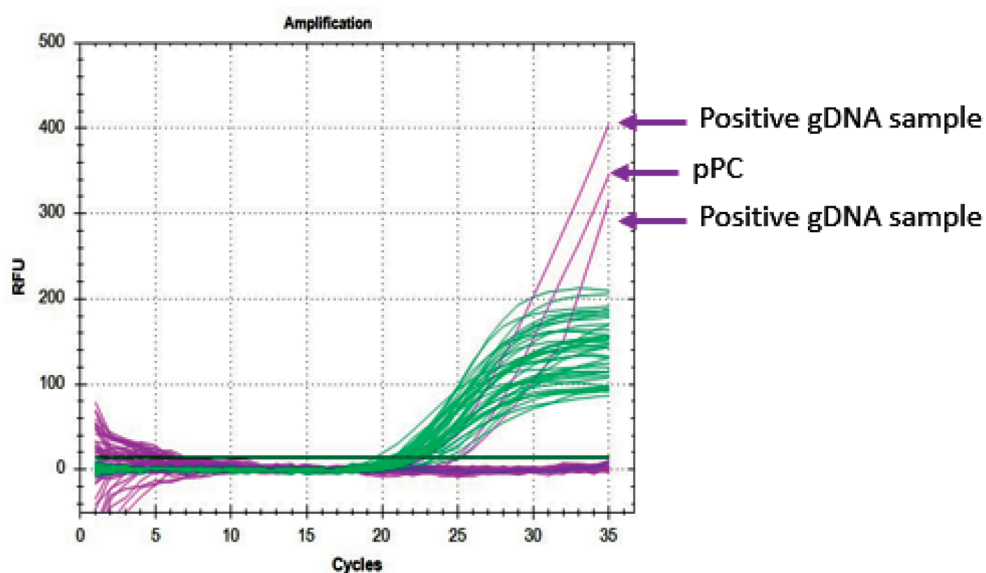


Figure 3 Amplification plot of 40 reactions, including two *HLA-A*31:01*-positive gDNA samples, 35 negative gDNA samples, and 3 controls: plasmid positive control (pPC), plasmid negative control (pNC), and no-template control (NTC). The Cy5.5 signal (pink) represents amplification from the A3101 probe, while the Cy5 signal (green) indicates amplification from the TIMP1 probe.

Discussion

This study presented a validated real-time PCR assay for *HLA-A*31:01* detection, demonstrating high analytical and clinical performance with complete concordance to Oxford Nanopore Technology (ONT)-based

Long-Read Sequencing. Compared to the bead-based hybridization, which overestimated *HLA-A*31:01* positivity due to potential allele misclassification, this allele-specific real-time PCR assay offers superior specificity. Seventeen discordant samples initially identified as

*HLA-A*31:01:07* by hybridization were accurately genotyped as *HLA-A*33:03:01* using ONT, highlighting the precision of the designed primer-probe set.

Several real-time PCR assays for *HLA-A*31:01* genotyping have been developed and validated in specific populations. For instance, Zhang et al. designed a TaqMan-based multiplex assay validated in Han Chinese and Tibetan populations, achieving 100% sensitivity and 98.9% specificity.⁽¹⁵⁾ However, their probe design targeting an 82-bp amplicon demonstrated cross-reactivity with *HLA-A*33:01*. Nguyen et al. developed a triplex assay for detecting *HLA-A*31:01* and *HLA-B*15:02*, incorporating an internal β -actin control.⁽²³⁾ This assay achieved high sensitivity, detecting DNA as low as 0.037 ng/ μ L.

In contrast, the real-time PCR assay developed in this study was uniquely designed to target three defining polymorphisms in a cis configuration across exons 2 of *HLA-A*31:01*. This molecular configuration enhanced allele specificity and eliminated cross-reactivity with *HLA-A*33:01*, a known limitation in other designs. While our detection limit (0.78–200.00 ng/reaction) was less sensitive than Nguyen's, it adequately encompassed the DNA concentrations typically used in clinical pharmacogenetic settings where sample quality and quantity might vary.

Furthermore, this assay was specifically designed to be compatible with the existing real-time PCR platform used for *HLA-B*75* testing. By sharing a consistent thermal profile and reagent compatibility, it facilitated rapid adoption in laboratory settings. Incorporation of spectrally distinct fluorophores, Cy5.5 for *HLA-*

*A*31:01* and Cy5 for TIMP1, further enhanced its utility by enabling potential multiplexing with FAM and HEX probes currently employed in *HLA-B*75* assays. With further validation, this approach could evolve into a single-tube multiplex format, streamline pharmacogenetic testing, reducing reagent costs, and increasing throughput.

While high-resolution technologies such as NGS and ONT deliver comprehensive pharmacogenomic insights, their high cost and technical complexity limit their practicality for routine clinical use. In contrast, real-time PCR offers a cost-effective and scalable solution, making it particularly suitable for resource-limited healthcare systems. However, this study had some limitations, including the relatively small number of *HLA-A*31:01*-positive samples, reflecting the allele's low frequency in Thailand, and the use of pre-characterized samples, which might inflate the perceived performance of the assay. Expanding validation efforts to include larger and more diverse multi-ethnic cohorts will enhance the assay's generalizability, confirming its diagnostic reliability and broad applicability across different populations.

Conclusion

This study successfully developed and validated a real-time PCR assay for *HLA-A*31:01* detection, demonstrating high specificity and complete concordance with long-read sequencing ONT results. The assay surpassed the performance of the bead-based hybridization by accurately distinguishing *HLA-A*31:01* from closely related alleles. Its robust amplification across a broad range of DNA concentrations

highlighted its practicality and efficiency for pharmacogenetic screening. Integrating this assay into clinical services, alongside *HLA-B*15:02/B75* testing, could significantly enhance preemptive risk assessment for carbamazepine-induced hypersensitivity. The widespread adoption of this cost-effective and rapid genotyping method could boost Thailand's pharmacovigilance infrastructure and advance personalized medicine, ultimately improving patient safety and public health outcomes.

Acknowledgement

We would like to express sincere gratitude to Dr. Thidathip Wongsurawat and the Siriraj Long-Read Lab (Si-LoL), Faculty of Medicine, Siriraj Hospital, Mahidol University, Thailand, for their exceptional technical support and guidance in the long-read sequencing analysis. This study was financially supported by the Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand.

References

- McCormack M, Alfirevic A, Bourgeois S, Farrell JJ, Kasperaviciute D, Carrington M, et al. *HLA-A*31:01* and carbamazepine-induced hypersensitivity reactions in Europeans. *N Engl J Med* 2011; 364(12): 1134–43.
- Wang CW, Preclaro IA, Lin WH, Chung WH. An updated review of genetic associations with severe adverse drug reactions: translation and implementation of pharmacogenomic testing in clinical practice. *Front Pharmacol* 2022; 13: 886377. (12 pages).
- Biswas M, Ershadian M, Shobana J, Nguyen AH, Sukasem C. Associations of HLA genetic variants with carbamazepine-induced cutaneous adverse drug reactions: an updated meta-analysis. *Clin Transl Sci* 2022; 15(8): 1887–905.
- Chung WH, Hung SI, Hong HS, Hsieh MS, Yang LC, Ho HC, et al. Medical genetics: a marker for Stevens–Johnson syndrome. *Nature* 2004; 428(6982): 486.
- Phillips EJ, Sukasem C, Whirl-Carrillo M, Müller DJ, Dunnenberger HM, Chantratita W, et al. CPIC guideline for HLA genotype and use of carbamazepine and oxcarbazepine: 2017 update. *Clin Pharmacol Ther* 2018; 103(4): 574–81.
- Ozeki T, Mushiroda T, Yowang A, Takahashi A, Kubo M, Shirakata Y, et al. Genome-wide association study identifies *HLA-A*31:01* as a genetic risk factor for carbamazepine-induced cutaneous adverse drug reactions in Japanese population. *Hum Mol Genet* 2011; 20(5): 1034–41.
- Fukunaga K, Tsukagoshi E, Kurata M, Mizukawa Y, Niihara H, Morita E, et al. Differential effects of *HLA-B*15:11* and *HLA-A*31:01* on carbamazepine-induced cutaneous adverse reactions. *J Invest Dermatol* 2024; 144(4): 908–11.
- Dashti M, Malik MZ, Al-Matrouk A, Bhatti S, Nizam R, Jacob S, et al. HLA-B allele frequencies and implications for pharmacogenetics in the Kuwaiti population. *Front Pharmacol* 2024; 15: 1423636. (12 pages).
- Jaruthamsophon K, Tipmanee V, Sangiemchoey A, Sukasem C, Limprasert P. *HLA-B*15:21* and carbamazepine-induced Stevens–Johnson syndrome: pooled-data and in silico analysis. *Sci Rep* 2017; 7: 45553. (7 pages).
- Yuliwulandari R, Kristin E, Prayuni K, Sachrowardi Q, Suyatna FD, Menaldi SL, et al. Association of HLA-B alleles with carbamazepine-induced Stevens–Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis in the Javanese and Sundanese populations of Indonesia: the important role of the *HLA-B75* serotype. *Pharmacogenomics* 2017; 18(18): 1643–48.

11. Caudle KE, Dunnenberger HM, Freimuth RR, Peterson JF, Burlison JD, Whirl-Carrillo M, et al. Standardizing terms for clinical pharmacogenetics test results: consensus terms from the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC). *Genet Med* 2017; 19(2): 215–23.
12. Amstutz U, Shear NH, Rieder MJ, Hwang S, Fung V, Nakamura H, et al. Recommendations for *HLA-B*15:02* and *HLA-A*31:01* genetic testing to reduce the risk of carbamazepine-induced hypersensitivity reactions. *Epilepsia* 2014; 55(4): 496–506.
13. Erlich H. HLA DNA typing: past, present, and future. *Tissue Antigens* 2012; 80(1): 1–11.
14. Lind C, Ferriola D, Mackiewicz K, Heron S, Rogers M, Slavich L, et al. Next-generation sequencing: the solution for high-resolution, unambiguous human leukocyte antigen typing. *Hum Immunol* 2010; 71(10): 1033–42.
15. Xu Q, Li CY, Wang Y, Li HP, Wu BB, Jiang YH, et al. Role of PUF60 gene in Verheij syndrome: a case report of the first Chinese Han patient with a de novo pathogenic variant and review of the literature. *BMC Med Genomics* 2018; 11(1): 92. (5 pages).
16. Kubota Y, Tokunaga K. HLA typing using PCR methods. *Methods Mol Biol* 2018; 1802: 37–50.
17. Wang H, Tomczak K, Shaffer CM, Jeng LJ, White MJ, Truty R, et al. Performance comparison of real-time PCR and next-generation sequencing for pharmacogenomics testing. *J Mol Diagn* 2018; 20(4): 552–62.
18. Buchner A, Hu X, Aitchison KJ. Validation of single nucleotide variant assays for human leukocyte antigen haplotypes *HLA-B*15:02* and *HLA-A*31:01* across diverse ancestral backgrounds. *Front Pharmacol* 2021; 12: 713178. (12 pages).
19. Fernandes VC, Pretti MAM, Tsuneto LT, Petzl-Erler ML, Suarez-Kurtz G. Single nucleotide variants as proxies for *HLA-A*31:01* in native American populations. *Front Pharmacol* 2022; 13: 849136. (6 pages).
20. Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand. *HLA - B75* genotyping by real-time PCR. [online]. 2024; [cited 2025 May 11]. Available from: URL: <https://service.dmhc.moph.go.th/dmhcservice/>.
21. Mahasirimongkol S, Somboonyosdech C, Kumperasart S, Wattanapokayakit S, Satproedprai N, Inunchot W, et al. HLA-B allelic distribution in samples from Thailand National Health Examination Survey. *J Health Sci Thai* 2014; 23(2): 191–200.
22. Anukul N, Jenjaroenpun P, Sirikul C, Wankaew N, Nimsamer P, Roothumrong E, et al. Ultrarapid and high-resolution HLA class I typing using transposase-based nanopore sequencing applied in pharmacogenetic testing. *Front Genet* 2023; 14: 1213457. (10 pages).
23. Nguyen DV, Vidal C, Chi HC, Do NTQ, Fulton R, Li J, et al. A novel multiplex polymerase chain reaction assay for detection of both *HLA-A*31:01/HLA-B*15:02* alleles, which confer susceptibility to carbamazepine-induced severe cutaneous adverse reactions. *HLA* 2017; 90(6): 335–42.

การพัฒนาและการประเมินประสิทธิภาพ วิธี Real-Time PCR สำหรับการตรวจหาฮีน *HLA-A*31:01* ในการคัดกรองทางเภสัชพันธุศาสตร์

นวลจันทร์ วิจักขณ์จินดา¹ วิมาลา อินอุ้นโชติ² ทิพย์รัตน์ โพธิ์พิทักษ์² สุกัญญา วัฒนาโกศกยิก²
และ สุวัศเมธ มหาศิริมงคล³

¹สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000

²สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000

³กองแผนงานและวิชาการ กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ คาร์บามาซีพีน (Carbamazepine: CBZ) เป็นยากันชักที่ใช้กันอย่างแพร่หลายทางการแพทย์ในการรักษาโรคลมชัก โรคปวดเส้นประสาทใบหน้า และโรคอารมณ์สองขั้ว แม้ว่ายานี้จะมีประสิทธิภาพทางคลินิกสูง แต่สามารถก่อให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์จากยารุนแรง (Severe Adverse Drug Reactions: SADR) โดยเฉพาะกลุ่มอาการผื่นแพ้ยารุนแรงที่อาจเป็นอันตรายถึงชีวิต (Severe Cutaneous Adverse Reactions: SCARs) หลักฐานทางเภสัชพันธุศาสตร์ได้ยืนยันว่า *HLA-B*15:02* รวมถึง *HLA-B* alleles ในกลุ่ม *HLA-B75* serotype และ *HLA-A*31:01* เป็นปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการเกิด SADR จากการใช้ยา CBZ ปัจจุบันในประเทศไทยมีการให้บริการตรวจ *HLA-B*15:02/HLA-B75* อย่างแพร่หลายภายใต้ระบบประกันสุขภาพแห่งชาติ ในขณะที่การตรวจ *HLA-A*31:01* ยังมีจำกัด ส่งผลให้การประเมินความเสี่ยงทางเภสัชพันธุกรรมยังไม่ครอบคลุม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประชากรที่พบ *HLA-B*15:02* ในอัตราต่ำ แต่มีความชุกของ *HLA-A*31:01* สูง ซึ่งสัมพันธ์กับกลุ่มอาการแพ้ยาที่หลากหลายและซับซ้อนกว่า การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและประเมินประสิทธิภาพของวิธีตรวจ *HLA-A*31:01* ด้วยเทคนิค Real-time PCR ผลการทดสอบในตัวอย่างดีเอ็นเอ 198 ตัวอย่าง ประกอบด้วย 14 ตัวอย่าง ที่มี *HLA-A*31:01* และ 184 ตัวอย่าง ที่ไม่มี *HLA-A*31:01* พบว่าวิธีนี้ให้ผลสอดคล้องกับวิธีตรวจอ้างอิงร้อยละ 100 และสามารถตรวจดีเอ็นเอได้ในช่วง 0.78–200.00 ng/ปฏิกิริยา แสดงถึงความแม่นยำสูง ใช้งานง่าย รวดเร็ว และเหมาะสมในการประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการทางคลินิก วิธีตรวจนี้ช่วยเพิ่มความครอบคลุมในการคัดกรองความเสี่ยงทางพันธุกรรม และส่งเสริมความปลอดภัยของการใช้ยา CBZ ตามแนวทางการแพทย์แม่นยำ

คำสำคัญ: เอชแอลเอ-เอ 31:01, เรียลไทม์พีซีอาร์, คาร์บามาซีพีน, อาการไม่พึงประสงค์จากยารุนแรง, เภสัชพันธุศาสตร์

การตรวจประเมินห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรอง มาตรฐานสารพิษตกค้างในผักและผลไม้สด ด้วยชุดทดสอบอย่างง่าย ระหว่างปี พ.ศ. 2563-2565

วิลาวัลย์ ศรีสุชา¹ สิริพรรณ แสงอรุณ¹ ชุติพร จันทระเสนา² และ ภัทรวีร์ สร้อยสังวาลย์¹

¹สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

²ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 8 อุดรธานี กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อำเภอเมือง อุดรธานี 41330

บทคัดย่อ การรับรองคุณภาพระบบตรวจสอบสารพิษตกค้างในผักสดและผลไม้สดเป็นมาตรฐานสำคัญสำหรับห้องปฏิบัติการที่ใช้ชุดทดสอบอย่างง่าย วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ คือ การวิเคราะห์สิ่งที่ไม่สอดคล้องกับข้อกำหนดจากผลการตรวจประเมินวิเคราะห์ผลการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing: PT) เปรียบเทียบข้อกำหนดการรับรองคุณภาพระบบตรวจสอบสารพิษตกค้างในผักสด ผลไม้สด (มาตรฐานสารพิษตกค้าง) ฉบับปี พ.ศ. 2563 และ 2566 กับมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025:2017 รวมถึงประเมินความพึงพอใจของผู้ใช้งานโปรแกรมระบบสารสนเทศที่พัฒนาขึ้น ผลการศึกษาพบว่า ข้อบกพร่องที่พบบ่อยที่สุด คือ ระบบตรวจสอบสารพิษตกค้าง (ร้อยละ 25.9) และการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ (ร้อยละ 18.1) ในการเข้าร่วม PT ห้องปฏิบัติการ ร้อยละ 73.8 ผ่านเกณฑ์ประเมิน ขณะที่ร้อยละ 26.2 ไม่ผ่าน โดยสาเหตุหลักมาจากวิธีปฏิบัติงานของเจ้าหน้าที่ ข้อกำหนดฉบับใหม่มีการเพิ่มเติมเกี่ยวกับการควบคุมคุณภาพภายใน การรักษาความลับ และการจัดการข้อมูล แต่ยังคงขาดการจัดการความเสี่ยงและการระบุสิ่งที่ไม่สอดคล้อง ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของระบบคุณภาพ ในการประเมินโปรแกรมระบบสารสนเทศที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้งานได้จริง โดยได้รับคะแนนความพึงพอใจ ร้อยละ 80.9 จากผู้ใช้งานทั้งห้องปฏิบัติการและผู้ตรวจประเมิน โปรแกรมระบบสารสนเทศนี้จึงช่วยลดภาระงาน การประสานงานได้สะดวกขึ้น ลดระยะเวลาการรอคอย และสามารถประยุกต์ใช้กับการรับรองมาตรฐานอื่นได้

คำสำคัญ: การรับรองคุณภาพห้องปฏิบัติการ, การตรวจสอบสารพิษตกค้างในผักสดและผลไม้สด, ชุดทดสอบสารพิษตกค้างอย่างง่าย

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

Received: 9 September 2024

Revised: 13 May 2025

Accepted: 15 May 2025

บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีผักผลไม้เป็นผลผลิตทางการเกษตรที่สำคัญ เกษตรกรที่เพาะปลูกพืชผักและผลไม้มีการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชเพื่อเพิ่มผลผลิต หากใช้ในปริมาณที่สูงเกินไปจะก่อให้เกิดสารพิษตกค้างในผลผลิต ตามพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522⁽¹⁾ ในการควบคุมอาหารตามมาตรา 6 กำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานของอาหาร กระทรวงสาธารณสุขจึงได้มีประกาศกระทรวงสาธารณสุขที่ 387 (พ.ศ. 2560)⁽²⁾ เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้างเพื่อควบคุมปริมาณสารพิษตกค้างทางการเกษตร ซึ่งอาจเป็นอันตรายและส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 393 (พ.ศ. 2561)⁽³⁾ เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้าง (ฉบับที่ 2) เพิ่มเติมชนิดของอาหาร และกำหนดปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด สำหรับวัตถุอันตรายทางการเกษตร ฉบับที่ 419 (พ.ศ. 2563)⁽⁴⁾ เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้าง (ฉบับที่ 3) นิยามวัตถุอันตรายที่ห้ามมิให้มีการผลิต การนำเข้า การส่งออก การนำผ่าน หรือมิไว้ครอบครอง และฉบับที่ 449 (พ.ศ. 2567)⁽⁵⁾ ออกตามความในพระราชบัญญัติอาหาร (พ.ศ. 2522) เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้างฉบับที่ 4 เพิ่มเติม อาหารที่มีวัตถุอันตรายทางการเกษตรชนิดที่ 4 เป็นอาหารที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือจำหน่าย ส่วนใหญ่เป็นประกาศที่เกี่ยวข้องกับการตรวจปริมาณสารพิษตกค้างทางการเกษตร ซึ่งอาจเป็นอันตรายและส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้ที่บริโภคสารพิษตกค้างในผักผลไม้ อย่างไรก็ตามสำหรับการบริโภคผักสดและผลไม้สด ควรหลีกเลี่ยงการบริโภคผักที่มีความเสี่ยงสารเคมีฆ่าแมลงตกค้าง โดยสามารถเลือกซื้อจากแหล่งที่มีความน่าเชื่อถือ มีมาตรการในการคัดคุณภาพผัก และก่อนนำผักมารับประทานควรมีการล้างผักให้สะอาดปราศจากสารเคมีฆ่าแมลงตกค้าง⁽⁶⁾ รวมทั้งผู้บริโภคควรเลือกซื้อผักปลอดสารพิษที่มีเครื่องหมายรับรองสินค้าผักที่ผลิตภายใต้กระบวนการผลิตที่มีมาตรฐานและปลอดสารพิษ โดยหน่วยงานภาครัฐและเอกชนควรประชาสัมพันธ์ให้ผู้บริโภคได้รู้จักเครื่องหมายรับรองคุณภาพสินค้าเกษตรมากขึ้น⁽⁷⁾ ดังนั้นการให้ความสำคัญด้านความปลอดภัย

จากสารพิษตกค้างในผักสดและผลไม้สด ซึ่งมีการกำหนดมาตรการต่างๆ เพื่อควบคุมการใช้สารเคมีตั้งแต่กระบวนการเพาะปลูก การจัดเก็บรักษา และก่อนจำหน่าย รวมถึงการจัดทำคุณภาพระบบตรวจสอบสารพิษตกค้างในผักและผลไม้สดด้วยชุดทดสอบอย่างง่าย

กระทรวงสาธารณสุข โดยสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีบทบาทหน้าที่เป็นหน่วยงานกลางในการกำหนดมาตรฐานและให้การรับรองห้องปฏิบัติการด้านการแพทย์และสาธารณสุข การกำกับดูแลและส่งเสริมพัฒนาห้องปฏิบัติการให้มีการดำเนินการอย่างมีคุณภาพ สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ได้ให้การรับรองคุณภาพระบบตรวจสอบสารพิษตกค้างในผักและผลไม้สด (มาตรฐานสารพิษตกค้าง) ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2542 ปรับปรุงนโยบายข้อกำหนดและเงื่อนไขการรับรองฯ อย่างต่อเนื่อง เพื่อพัฒนาระบบบริหารจัดการของห้องปฏิบัติการ ตั้งแต่โครงสร้างองค์กร หน้าที่ความรับผิดชอบ วิธีดำเนินการ กระบวนการ และทรัพยากรให้เอื้อต่อการปฏิบัติงาน ตรวจสอบสารพิษตกค้างและการควบคุมคุณภาพ เพิ่มหลักเกณฑ์เฉพาะให้สามารถควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ การประกันคุณภาพผลการทดสอบและการปล่อยผลิตภัณฑ์ ห้องปฏิบัติการต้องดำเนินการตามข้อกำหนดและเงื่อนไขการรับรองฯ ตามฉบับเก่า คือ ฉบับปรับปรุงที่ 06 (ปี พ.ศ. 2563)⁽⁸⁾ มีผลบังคับใช้ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2563 ถึง 2566 และฉบับใหม่ปรับปรุงครั้งที่ 07 (ปี พ.ศ. 2566)⁽⁹⁾ มีผลบังคับใช้วันที่ 25 พฤษภาคม พ.ศ. 2566 เป็นต้นมา ห้องปฏิบัติการที่ขอการรับรองต้องมีสถานที่ทำการถาวร เป็นนิติบุคคลหรือกิจการชุมชนที่ เป็นผู้ประกอบการ วิสาหกิจชุมชน รวมทั้งบุคคลธรรมดาที่จดทะเบียนพาณิชย์ที่ดำเนินการตรวจสอบสารพิษตกค้างในผักสดและผลไม้สด การตรวจวิเคราะห์ด้วยชุดทดสอบอย่างง่าย ซึ่งในข้อจำกัดของชุดทดสอบไม่สามารถตรวจวัดปริมาณสารพิษตกค้างได้ อย่างไรก็ตาม แม้จะเป็นชุดทดสอบอย่างง่ายแต่ต้องมีข้อมูลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method Verification) ของวิธีทดสอบ หรือถ้ามีการดัดแปลงจากวิธีมาตรฐานหรือพัฒนาขึ้นเอง ต้องมีข้อมูลแสดงการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี (Method

Validation) ในขอบข่ายชุดทดสอบอย่างง่าย กลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (Organophosphate) กลุ่มคาร์บาเมต (Carbamate) กลุ่มออร์กาโนคลอรีน (Organochlorine) และกลุ่มไพรีทรอยด์ (Pyrethroid)⁽¹⁰⁾ ข้อกำหนดมาตรฐานสารพิษตกค้าง ได้นำข้อกำหนดสำคัญของมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025:2017 ที่เกี่ยวข้องมาปรับใช้เพื่อให้เกิดการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง⁽¹¹⁾ เมื่อห้องปฏิบัติการผ่านการรับรองตาม มาตรฐานสารพิษตกค้าง จะได้ใบรับรองและเครื่องหมาย รับรองจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เพื่อรับรองว่า ห้องปฏิบัติการสามารถดำเนินการตรวจสอบสารพิษ ตกค้างในผักสดและผลไม้สดด้วยชุดทดสอบอย่างง่าย ได้อย่างมีคุณภาพและเป็นระบบ และสามารถทวนสอบ ผลกลับได้ นอกจากนี้ยังมีเครื่องหมายรับรองสินค้า เกษตรในประเทศไทย เช่น มาตรฐานการรับรองสินค้า เกษตรภายใต้กฎหมายมาตรฐานสินค้าเกษตรที่เกี่ยวข้อง กับคุณภาพและความปลอดภัยทางเคมี ชีวภาพ กายภาพ ความปลอดภัยด้านสุขอนามัย ตามประกาศของกระทรวง เกษตรและสหกรณ์⁽¹²⁾ ซึ่งเครื่องหมายรับรองตรวจสอบ คุณภาพสร้างความเชื่อมั่นให้กับผู้บริโภคมากขึ้น⁽¹³⁾

การปรับปรุงข้อกำหนดมาตรฐานสารพิษตกค้าง ไม่เพียงแต่ต้องสอดคล้องกับข้อกำหนดสำคัญของ ISO/IEC 17025:2017 ยังต้องมีการดำเนินการปรับปรุง เพิ่มเติมให้เหมาะสม โดยพิจารณาสิ่งที่ไม่สอดคล้อง ตามข้อกำหนดหรือข้อบกพร่องจากการตรวจประเมิน ห้องปฏิบัติการ เช่น ข้อกำหนดไม่ครอบคลุมหรือไม่ชัดเจนทำให้ห้องปฏิบัติการตีความข้อกำหนด ไม่ถูกต้อง หรืออาจเกิดข้อบกพร่องซ้ำ หากห้องปฏิบัติการ ยังไม่ได้ดำเนินการแก้ไขที่ต้นตอของปัญหา ผลการ เปรียบเทียบกับข้อกำหนดมาตรฐานสากลและข้อมูล ข้อบกพร่องจะถูกนำมาวิเคราะห์และปรับปรุง เพื่อ ยกระดับข้อกำหนดให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

การเข้าร่วมการทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing: PT) เป็นการแสดงถึงความสามารถในการ ทดสอบของห้องปฏิบัติการ และถือเป็นข้อกำหนดสำคัญ

สำหรับการยื่นขอรับรอง หากผลการทดสอบ PT ไม่ผ่าน เกณฑ์ประเมิน ห้องปฏิบัติการต้องดำเนินการวิเคราะห์ หาสาเหตุและแก้ไข และร้องขอรับตัวอย่าง PT ใหม่ เพื่อทำการทดสอบซ้ำเป็นครั้งที่สอง

กระบวนการรับรอง ห้องปฏิบัติการต้องยื่นเอกสาร จำนวนมากส่งมาทางไปรษณีย์ให้หน่วยรับรอง และหน่วย รับรองต้องจัดส่งเอกสารต่อให้ผู้ตรวจประเมิน เกิดความ ลำบากในการจัดส่งเอกสาร ใช้เวลาตั้งแต่ยื่นคำขอ การรับรองจนกระทั่งได้รับการรับรอง อาจต้องใช้เวลา มากที่สุดถึง 200 วัน รวมทั้งต้องจัดการกับเอกสารเป็น จำนวนมาก ในปีงบประมาณ พ.ศ. 2564 สำนักมาตรฐาน ห้องปฏิบัติการ จึงได้พัฒนาระบบสารสนเทศขึ้นใหม่ เพื่อ ใช้ในกระบวนการยื่นขอการรับรองออนไลน์ภายใต้ชื่อ โปรแกรมกระบวนการรับรองคุณภาพระบบตรวจสอบ สารพิษตกค้างในผักสดและผลไม้สด ด้วยระบบ อิเล็กทรอนิกส์ (VAFC LAB) โดยการนำระบบ สารสนเทศมาปรับใช้ในมาตรฐานสารพิษตกค้าง โดยเฉพาะเพื่อปรับกระบวนการทำงานและอำนวยความสะดวกให้กับผู้ใช้งานตามมาตรฐานการรับรองดังกล่าว

การศึกษาเกี่ยวกับการรับรองคุณภาพระบบ ตรวจสอบสารพิษตกค้างในผักสดและผลไม้สด มาตรฐาน กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สามารถใช้เป็นแนวทาง การปรับปรุงการรับรองมาตรฐานกรมวิทยาศาสตร์ การแพทย์ ให้เกิดประโยชน์ต่อห้องปฏิบัติการที่ขอ การรับรอง ผู้ตรวจประเมิน และผู้เกี่ยวข้อง ซึ่งการศึกษา นี้มีวัตถุประสงค์ 1) เพื่อวิเคราะห์สิ่งที่ไม่สอดคล้อง กับข้อกำหนดของห้องปฏิบัติการที่ได้การรับรองตาม มาตรฐานสารพิษตกค้างในผักสด ผลไม้สด ระหว่างปี พ.ศ. 2563–2565 2) เพื่อวิเคราะห์ผลการเข้าร่วมทดสอบ ความชำนาญ (PT) ของห้องปฏิบัติการ 3) เพื่อเปรียบเทียบ ข้อกำหนดมาตรฐานสารพิษตกค้าง ฉบับปี พ.ศ. 2563 และ 2566 กับมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025:2017 และ 4) เพื่อประเมินความพึงพอใจของผู้ใช้งานโปรแกรม ระบบสารสนเทศที่พัฒนาขึ้นใช้ในกระบวนการรับรอง ห้องปฏิบัติการตรวจสอบสารพิษตกค้างในผักและผลไม้สด

วัสดุและวิธีการ

การตรวจประเมินห้องปฏิบัติการมาตรฐานสารพิษตกค้างด้วยชุดทดสอบอย่างง่าย 25 แห่ง ตามมาตรฐานสารพิษตกค้าง ฉบับปี พ.ศ. 2563

การศึกษานี้เป็นการวิจัยเชิงวิเคราะห์แบบย้อนหลัง (Retrospective Analysis Study) จากการรวบรวมข้อมูลผลการดำเนินงานห้องปฏิบัติการที่ขอการรับรองมาตรฐานสารพิษตกค้าง ระหว่างปี พ.ศ. 2563–2565 จำนวน 25 แห่ง ได้แก่ 1) มูลนิธิโครงการหลวงจังหวัดเชียงใหม่ 2) บริษัท แอ็กโกร คอมเมอร์ส กรุ๊ป จำกัด 3) บริษัท อินเทอร์เน็ตชั่นแนล ฟู้ดส์ เทสต์ติ้ง แลบบอราทอรีส์ จำกัด 4) บริษัท พีพีพี พร็อพเพอร์ตี้ จำกัด 5) บริษัท เซ็นทรัล ฟู้ด รีเทล จำกัด สาขาเอฟดีซี 6) บริษัท เอ็กเซล ฟรุตส์ จำกัด 7) บริษัท เอซีเค ไฮโดรฟาร์ม จำกัด 8) บริษัท ดอนเมืองพัฒนา จำกัด 9) บริษัท สยามแม็คโคร จำกัด (มหาชน) สาขาคลังสินค้าอาหารสดวังน้อย 10) บริษัท ไทยแอ็กโกร เอ็กสเซนจ์ จำกัด 11) บริษัท พงศ์เทพรุ่งเรืองเทรดดิ้ง จำกัด 12) ห้างหุ้นส่วนจำกัดลองเทม เทรดดิ้ง บริษัท 13) ตลาดใหม่ชลบุรี จำกัด 14) สหกรณ์การเกษตรท่ายาง จำกัด 15) สหกรณ์การเกษตรบ้านลาด จำกัด 16) บริษัท เอซีเค ฟู้ดเทค จำกัด 17) บริษัท เอ็มเค เรสโตรองต์ กรุ๊ป จำกัด (มหาชน) กม.21 18) บริษัท สยามแม็คโคร จำกัด (มหาชน) สาขาคลังสินค้าอาหารสดมหาชัย 19) บริษัท ระยองสตาร์ จำกัด 20) บริษัท บิ๊กซีซูเปอร์เซ็นเตอร์ จำกัด (มหาชน) ศูนย์กระจายสินค้าจะเชิงเทรา 21) สำนักงานเกษตรจังหวัดตราด 22) บริษัท ไม้คู่ จำกัด 23) สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดศรีสะเกษ 24) บริษัท สยามแม็คโคร จำกัด (มหาชน) คลังสินค้าอาหารสดเชียงใหม่ และ 25) บริษัท นันธวรรณฟู้ดส์ จำกัด

นำสิ่งที่ไม่สอดคล้องตามข้อกำหนดจากผลการตรวจประเมินหรือ “ข้อบกพร่อง” มาวิเคราะห์สถิติเชิงพรรณนา (Descriptive Statistics) โดยแจกแจงความถี่ (Frequency) ค่าร้อยละ (Percentage) และค่าเฉลี่ย (Mean) แจกแจงรายปีตามจำนวนข้อบกพร่องที่ตรวจพบ

การทดสอบความชำนาญ (PT)

การทดสอบความชำนาญ (PT) ดำเนินการโดยศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 8 อุดรธานี กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ การประเมินผลการวิเคราะห์ว่าผ่านหรือไม่ผ่านใช้วิธีเปรียบเทียบผลที่ทราบค่า โดยการรายงานผลการวิเคราะห์เป็น 3 แบบ ได้แก่ ไม่พบ พบปลอดภัย และพบไม่ปลอดภัย โดยเทียบเคียงเฉพาะกลุ่มชุดทดสอบนั้นๆ รวมทั้งห้องปฏิบัติการสามารถใช้ชุดทดสอบอย่างง่ายมากกว่า 1 ชนิด ซึ่งการศึกษานี้กลุ่มเป้าหมาย คือ ห้องปฏิบัติการที่ตรวจสอบสารพิษตกค้างในผักสดและผลไม้สด รวบรวมผลตั้งแต่ปี พ.ศ. 2563–2565 โดยใช้ชุดทดสอบอย่างง่าย ได้แก่ ชุดทดสอบ GT Pesticide Test Kit⁽¹⁴⁾ ชุดทดสอบ GPO-TM Kit ชุดทดสอบ GPO-TM/2 Kit และชุดทดสอบ GPO-M Kit โดยใช้การแจกแจงความถี่ ค่าร้อยละ และค่าเฉลี่ย

การเปรียบเทียบข้อกำหนดมาตรฐานสารพิษตกค้าง

ทำการเปรียบเทียบข้อกำหนดมาตรฐานสารพิษตกค้าง ฉบับปี พ.ศ. 2563⁽⁸⁾ และฉบับปี พ.ศ. 2566⁽⁹⁾ กับข้อกำหนดสำคัญบางส่วนของมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025:2017 ทั้งด้านคุณภาพและวิชาการ

การพัฒนาระบบสารสนเทศเพื่อใช้ในกระบวนการรับรองห้องปฏิบัติการตรวจสอบสารพิษตกค้างในผักและผลไม้สด (โปรแกรม VAFC LAB)

การพัฒนาระบบสารสนเทศเพื่อใช้ในกระบวนการรับรองห้องปฏิบัติการตรวจสอบสารพิษตกค้างในผักและผลไม้สด (โปรแกรม VAFC LAB) ดำเนินการร่วมกับผู้เชี่ยวชาญด้านเทคโนโลยีสารสนเทศ กรมสนับสนุนบริการสุขภาพ กระทรวงสาธารณสุข พัฒนาเพื่อใช้ในกระบวนการรับรองมาตรฐานสารพิษตกค้างที่มีขั้นตอนทั้งหมด 13 ขั้นตอน ให้ลดระยะเวลาใน 5 ขั้นตอน ได้แก่ การส่งเอกสารขอการรับรอง การจัดส่งเอกสารให้ผู้ตรวจประเมินพิจารณา จัดส่งรายงานการตรวจประเมินให้ห้องปฏิบัติการ ห้องปฏิบัติการส่งการแก้ไขข้อบกพร่องและผู้ตรวจประเมินพิจารณาการแก้ไขข้อบกพร่อง รวมทั้งการยื่นเอกสารตรวจเฝ้าระวัง (ดำเนินการพัฒนาทดสอบ

ระบบเดือนมีนาคม พ.ศ. 2564 และเริ่มเปิดให้ใช้งานโปรแกรมตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2564–2566 ซึ่งการศึกษานี้มีการรักษาความลับของผู้ประกอบการเพื่อไม่ให้เกิดความเชื่อมโยงข้อมูลในการทวนสอบได้) หลังการพัฒนาระบบสารสนเทศและนำไปใช้งาน มีการสำรวจความพึงพอใจของกลุ่มผู้ใช้งาน ได้แก่ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ และผู้ตรวจประเมิน ซึ่งวงรอบการประเมิน ได้แก่ ก่อนการใช้งาน เริ่มใช้งานแล้ว 1 ปี และใช้งานมากกว่า 1 ปี จำนวน 35, 18 และ 28 ราย ตามลำดับ รวมผู้ตอบแบบสำรวจ จำนวน 82 ราย แสดงผลโดยการแจกแจงความถี่ ค่าร้อยละ ค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation)

ผล

ข้อบกพร่องที่พบจากการตรวจประเมินห้องปฏิบัติการมาตรฐานสารพิษตกค้างด้วยชุดทดสอบอย่างง่าย 25 แห่ง ตามมาตรฐานสารพิษตกค้าง ฉบับปี พ.ศ. 2563 การวิเคราะห์ข้อมูลสิ่งที่ไม่สอดคล้องตามข้อกำหนด (ข้อบกพร่อง) จากการตรวจประเมินห้องปฏิบัติการที่ได้การรับรองตามมาตรฐานสารพิษตกค้าง ฉบับปี พ.ศ. 2563 ระหว่างปี พ.ศ. 2563–2565 จำนวน 25 แห่ง เมื่อเปรียบเทียบข้อบกพร่องรายปี พบว่าปี พ.ศ. 2564 พบจำนวนข้อบกพร่องสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับปี พ.ศ. 2563 และ 2565 และเมื่อเปรียบเทียบข้อกำหนดแยกรายข้อหลัก 9 ข้อ แบ่งเป็น ด้านคุณภาพหรือเรียกว่า ด้านบริหารจัดการ ประกอบด้วย 4 ข้อหลัก ได้แก่ ข้อ 5.1, 5.7, 5.8, และ 5.9 รวมทั้งหมด 29 ข้อย่อย และด้านวิชาการ ประกอบด้วย 5 ข้อหลัก ได้แก่ ข้อ 5.2–5.6 รวมทั้งหมด 43 ข้อย่อย รวมข้อบกพร่องทั้งหมด 166 ข้อ แจกแจงความถี่จำนวนข้อบกพร่องตามข้อกำหนด พบข้อบกพร่องสูงสุด 3 อันดับแรก ได้แก่ ข้อกำหนด 5.2 ระบบตรวจสอบสารพิษตกค้าง ซึ่งเป็นกระบวนการตรวจวิเคราะห์ ได้แก่ การจัดทำเอกสารคุณภาพ การบริหารจัดการตัวอย่าง การตรวจสอบสารพิษตกค้าง การรายงานผล รวมจำนวน 43 ข้อ คิดเป็นร้อยละ 25.9 สาเหตุเกิดจากการจัดทำคู่มือคุณภาพและ

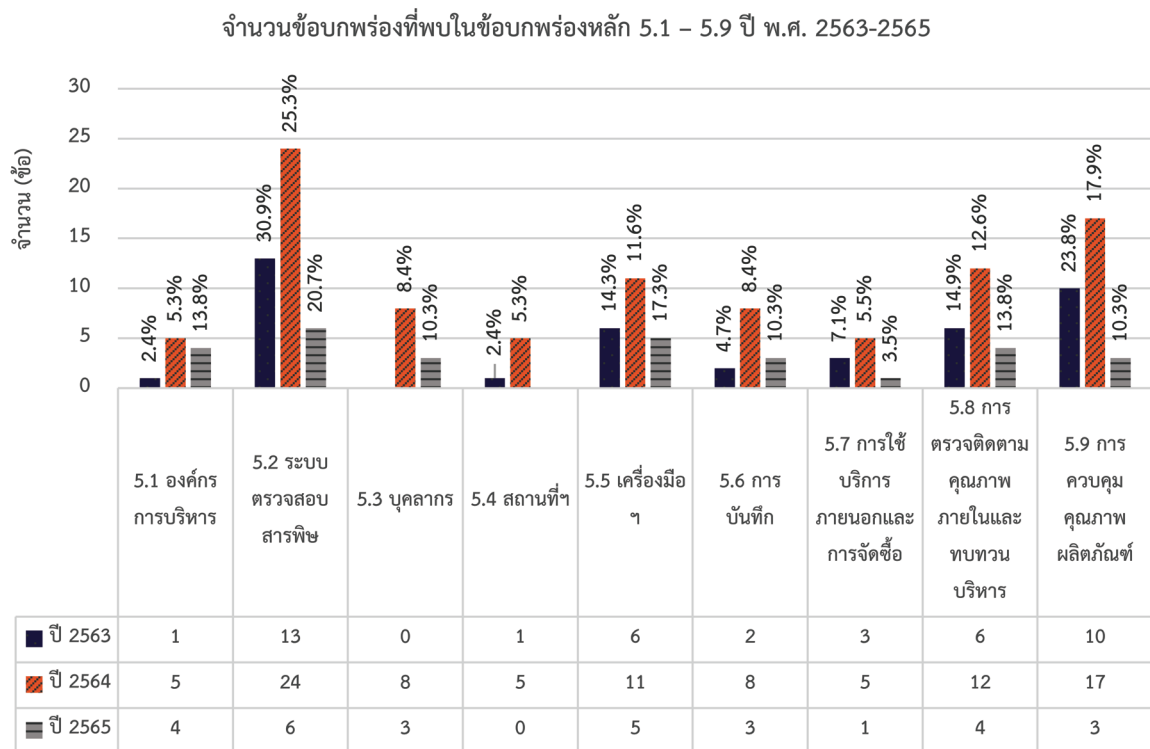
มาตรฐานการปฏิบัติงานมีข้อมูลไม่ครอบคลุมข้อกำหนดข้อกำหนด 5.9 การควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ ได้แก่ การสุ่มตัวอย่าง การประกันคุณภาพผลการทดสอบ และการปล่อยผลิตภัณฑ์ออกจำหน่าย รวมจำนวน 30 ข้อ คิดเป็นร้อยละ 18.1 สาเหตุคือ ไม่พบวิธีการจัดการเรื่องการปล่อยผลิตภัณฑ์ออกจำหน่าย กรณีผลการทดสอบความชำนาญอยู่นอกเกณฑ์ที่กำหนดและไม่พบหลักฐานแสดงการวิเคราะห์สาเหตุ รวมทั้งแผนการสุ่มตัวอย่าง ผักสด ผลไม้สด ไม่ครอบคลุมตามขอบข่ายที่ขอการรับรอง ซึ่งเป็นข้อกำหนดที่มีการทบทวนใหม่ และข้อกำหนด 5.8 การตรวจติดตามคุณภาพภายในและการทบทวนบริหาร ได้แก่ แผนการตรวจติดตามภายในและแผนการทบทวนบริหาร รวมจำนวน 22 ข้อ คิดเป็นร้อยละ 13.2 สาเหตุเกิดจากรายงานการประชุมทบทวนระบบบริหารหัวข้อไม่ครบถ้วนตามข้อกำหนด และไม่พบแผนการตรวจติดตามคุณภาพภายใน อีกทั้งพบข้อกำหนด 5.5 เรื่อง เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ได้แก่ อุปกรณ์เครื่องมือที่จำเป็น การดูแลการทำงานของเครื่องมือการบันทึกการใช้งานเครื่องมือ และการสอบเทียบเครื่องมือ รวมจำนวน 22 ข้อ คิดเป็นร้อยละ 13.2 สาเหตุเกิดจากไม่พบบันทึกการใช้งานเครื่องมือที่จำเป็นและการสอบเทียบเครื่องมือโดยปัจจัยที่พบ คือ มีการเปลี่ยนแปลงบุคลากรในตำแหน่งหัวหน้าห้องปฏิบัติการ ดังแสดงในภาพที่ 1

การทดสอบความชำนาญ (PT)

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลการเข้าร่วม PT ของห้องปฏิบัติการมาตรฐานสารพิษตกค้างด้วยชุดทดสอบอย่างง่าย ระหว่างปี พ.ศ. 2563–2565 ที่มีการเปรียบเทียบผลการทดสอบความชำนาญกับศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 8 อุดรธานี แจกแจงข้อมูลรายปีจากการเข้าร่วม PT ของห้องปฏิบัติการ 25 แห่ง ตามขอบข่ายการรับรองชุดทดสอบอย่างง่าย ได้แก่ ชุดทดสอบ GT Pesticide Test Kit ชุดทดสอบ GPO-TM Kit ชุดทดสอบ GPO-TM/2 Kit และชุดทดสอบ GPO-M Kit มีการเข้าร่วม PT จำนวน 84 ครั้ง พบว่าผ่านเกณฑ์ประเมิน 62 ครั้ง คิดเป็นร้อยละ 73.8 ไม่ผ่านเกณฑ์ประเมิน 22 ครั้ง คิดเป็นร้อยละ 26.2

โดยมีการทดสอบซ้ำในครั้งที่ 2 ผลผ่านเกณฑ์ประเมิน
ทั้งหมดจากการวิเคราะห์หาสาเหตุที่ไม่ผ่านเกณฑ์ประเมิน
ส่วนใหญ่เกิดจากเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ของ

เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ การแปลผล และการบริหาร
จัดการตัวอย่าง โดยมีความถี่เท่ากับ ร้อยละ 60.0, 33.3
และ 6.7 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1



ภาพที่ 1 การเปรียบเทียบข้อบกพร่องที่พบจากการตรวจประเมินห้องปฏิบัติการมาตรฐานสารพิษตกค้างด้วยชุด
ทดสอบอย่างง่าย ตามมาตรฐานสารพิษตกค้าง ฉบับปี พ.ศ. 2563 จำนวน 25 แห่ง ระหว่างปี พ.ศ. 2563–2565

ตารางที่ 1 ผลการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญ (PT) ของห้องปฏิบัติการมาตรฐานสารพิษตกค้างด้วยชุดทดสอบ
อย่างง่าย จำนวน 25 แห่ง ระหว่างปี พ.ศ. 2563–2565

ชนิดชุดทดสอบ อย่างง่าย	ปี พ.ศ. 2563		ปี พ.ศ. 2564		ปี พ.ศ. 2565		จำนวน เข้าร่วม PT	ผลเข้าร่วม PT ปี พ.ศ. 2563–2565	
	ผ่านเกณฑ์	ไม่ผ่านเกณฑ์	ผ่านเกณฑ์	ไม่ผ่านเกณฑ์	ผ่านเกณฑ์	ไม่ผ่านเกณฑ์		ผ่านเกณฑ์	ไม่ผ่านเกณฑ์
GT Pesticide Test Kit	16	3	17	5	19	4	64 (76.2%)	52 (81.3%)	12 (18.8%)
GPO- TM Kit	1	0	0	1	3	1	6 (7.1%)	4 (66.7%)	2 (33.3%)
GPO- TM/2 Kit	0	2	0	2	2	1	7 (8.3%)	2 (28.6%)	5 (71.4%)
GPO- M-Kit	0	1	2	1	2	1	7 (8.3%)	4 (57.1%)	3 (42.9%)
รวม	17	6	19	9	26	7	84 (100%)	62 (73.8%)	22 (26.2%)

หมายเหตุ: ตัวอย่างวัตถุทดสอบแยกตามชุดทดสอบและอาจไม่ใช่ตัวอย่างวัตถุทดสอบชนิดเดียวกัน

การเปรียบเทียบข้อกำหนดมาตรฐานสารพิษตกค้าง

การศึกษาเปรียบเทียบตามข้อกำหนดมาตรฐานสารพิษตกค้าง ฉบับปี พ.ศ. 2563 และฉบับปี พ.ศ. 2566 และข้อกำหนดสำคัญบางส่วนของมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025:2017 โดยเปรียบเทียบด้วยวิธีการวิเคราะห์เนื้อหา “มีข้อกำหนดและไม่มีข้อกำหนด” ข้อกำหนดที่นำมาเปรียบเทียบของมาตรฐานสารพิษตกค้าง จำนวน 2 ฉบับดังกล่าว มีจำนวน 3 ข้อหลัก และ 26 ข้อย่อย ประกอบด้วย ข้อกำหนดด้านทรัพยากร จำนวน 6 ข้อ ข้อกำหนดด้านกระบวนการ จำนวน 11 ข้อ และข้อกำหนดด้านระบบการบริหารงาน จำนวน 9 ข้อ

ซึ่งข้อกำหนดมาตรฐานการรับรองฯ ผักสด ผลไม้สด ยังไม่ครอบคลุมข้อกำหนดตามมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025:2017 เช่น ข้อกำหนดที่ 6 ด้านทรัพยากร คือ การสอบกลับได้ทางมาตรวิทยา ข้อกำหนดที่ 7 ด้านกระบวนการ ได้แก่ การทบทวนคำขอ ข้อเสนอการประมูลและข้อสัญญาการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด ข้อร้องเรียน สิ่งที่ไม่เป็นไปตามข้อกำหนด และข้อกำหนดที่ 8 ด้านระบบการบริหารงาน เอกสารระบบการบริหารงาน การปฏิบัติ เพื่อจัดการความเสี่ยงและโอกาส และการปฏิบัติการแก้ไข ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบระหว่างข้อกำหนดมาตรฐานการรับรองคุณภาพระบบตรวจสอบสารพิษตกค้างในผักสด ผลไม้สด ปี พ.ศ. 2563 และ 2566 และมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025:2017

ข้อ	มาตรฐานฯ ISO/IEC 17025:2017	ข้อ	มาตรฐานฯ ผักสด ผลไม้สด ฉบับปี พ.ศ. 2563	ข้อ	มาตรฐานฯ ผักสด ผลไม้สด ฉบับปี พ.ศ. 2566
4	ข้อกำหนดทั่วไป		อยู่ในเงื่อนไขและนโยบายการยื่นขอรับรอง		อยู่ในเงื่อนไขและนโยบายการยื่นขอรับรอง
4.1	ความเป็นกลาง	4.6	การปฏิบัติงานอย่างอิสระ	5.1.2	การปฏิบัติงานอย่างอิสระ
4.2	การรักษาความลับ	-	-	5.1.2	การรักษาความลับ
5	ข้อกำหนดด้านโครงสร้าง	5.1	องค์กรและการบริหาร	5.1	องค์กรและการบริหาร
6	ข้อกำหนดด้านทรัพยากร	5.1.2	นโยบายสนับสนุนทรัพยากร	5.1.1	นโยบายสนับสนุนทรัพยากร
6.1	ทั่วไป	5.1	องค์กรและการบริหาร	5.1	องค์กรและการบริหาร
6.2	บุคลากร	5.3	บุคลากร	5.2	บุคลากร
6.3	สิ่งอำนวยความสะดวกและสภาวะแวดล้อม	5.4	สถานที่และภาวะแวดล้อม	5.6	สถานที่และภาวะแวดล้อม
6.4	เครื่องมือ	5.5	เครื่องมือวิทยาศาสตร์	5.7	เครื่องมือวิทยาศาสตร์ชุดทดสอบและสารเคมี
6.5	การสอบกลับได้ทางมาตรวิทยา	-	-	-	-
6.6	ผลิตภัณฑ์และบริการจากภายนอก	5.7	การใช้บริการภายนอกและการจัดซื้อการจัดซื้อ	5.4	การใช้บริการภายนอกและการจัดซื้อ
7	ข้อกำหนดด้านกระบวนการ				
7.1	การทบทวนคำขอ ข้อเสนอการประมูลและข้อสัญญา	-	-	-	-
7.2	การเลือก การทวนสอบการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี	5.2.4	การตรวจสอบสารพิษตกค้าง	5.8.	กระบวนการทดสอบ
7.3	การชักตัวอย่าง	5.9.1.2	การสุ่มตัวอย่าง	5.9.1	การสุ่มตัวอย่าง
7.4	การจัดการตัวอย่างทดสอบหรือสอบเทียบ	5.5.4	การสอบเทียบเครื่องมือ	5.7	เครื่องมือวิทยาศาสตร์

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบระหว่างข้อกำหนดมาตรฐานการรับรองคุณภาพระบบตรวจสอบสารพิษตกค้างในผักสด
ผลไม้สด ปี พ.ศ. 2563 และ 2566 และมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025:2017 (ต่อ)

ข้อ	มาตรฐานฯ ISO/IEC 17025:2017	ข้อ	มาตรฐานฯ ผักสด ผลไม้สด ฉบับปี พ.ศ. 2563	ข้อ	มาตรฐานฯ ผักสด ผลไม้สด ฉบับปี พ.ศ. 2566
7.5	บันทึกทางด้านวิชาการ	5.6	การบันทึก	5.3	การบริหารจัดการเอกสาร บันทึก และข้อมูลสารสนเทศ
7.6	การประเมินค่าความไม่แน่นอนของ การวัด	-		-	
7.7	การสร้างเชื่อมั่นในความใช้ได้ ของผล	5.9	การควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์	5.9.2	การประกันคุณภาพผลการทดสอบ
7.8	การรายงานผล	5.2.5	การรายงานผล	5.8.4	การรายงานผล
7.9	ข้อร้องเรียน	-		-	
7.10	สิ่งที่ไม่เป็นไปตามข้อกำหนด	-		-	
7.11	การควบคุมข้อมูลและการจัดการ สารสนเทศ	5.6.4	การบันทึกข้อมูลในระบบ อิเล็กทรอนิกส์	5.3.4	ข้อมูลสารสนเทศมีระเบียบปฏิบัติที่ เหมาะสม
8.	ข้อกำหนดด้านระบบการบริหารงาน				
8.1	*ทางเลือกการดำเนินการ A หรือ B	-		-	
8.2	เอกสารระบบการบริหารงาน	-		5.3	การบริหารจัดการเอกสาร บันทึก และข้อมูลสารสนเทศ
8.3	การควบคุมเอกสารระบบ การบริหารงาน	5.2.2	การจัดทำเอกสารคุณภาพ	5.3.1	การจัดทำเอกสารคุณภาพ
8.4	การควบคุมบันทึก	5.6	การบันทึก	5.3.2	การบันทึก
8.5	การปฏิบัติการเพื่อจัดการความเสี่ยง และโอกาส	-		-	
8.6	การปรับปรุงคุณภาพอย่างต่อเนื่อง	-		5.5.2	การทบทวนบริหาร
8.7	การปฏิบัติการแก้ไข	-		-	
8.8	การตรวจติดตามภายใน	5.8.1	การตรวจติดตามคุณภาพภายใน	5.5.1	การตรวจติดตามคุณภาพภายใน
8.9	การทบทวนการบริหาร	5.8.2	การทบทวนบริหาร	5.5.2	การทบทวนบริหาร

หมายเหตุ: สัญลักษณ์ - หมายถึง ไม่ได้กล่าวถึงในข้อกำหนดมาตรฐานผักสด ผลไม้สด

*ทางเลือก หมายถึง ทางเลือกการดำเนินการด้านระบบการบริหารงาน (ทางเลือก A คือ มีการดำเนินการตาม ข้อกำหนด
ISO/IEC 17025:2017 และทางเลือก B คือ มีการดำเนินการด้านระบบบริหารคุณภาพตามข้อกำหนด ISO 9001:2015)

การพัฒนาระบบสารสนเทศเพื่อใช้ในกระบวนการ รับรอง (โปรแกรม VAFC LAB)

การพัฒนาโปรแกรมระบบสารสนเทศของ
กระบวนการรับรองสารพิษตกค้าง โดยนําระบบออนไลน์
มาปรับใช้ (โปรแกรม VAFC LAB) มีการออกแบบ
ระบบและใช้เครื่องมือที่จำเป็นต่อการพัฒนาระบบ
สารสนเทศ ได้แก่ เครื่องคอมพิวเตอร์ชนิดพกพา

โปรแกรมจำลองเว็บเซิร์ฟเวอร์ XAMPP ใช้ภาษา PHP,
HTML, JavaScript และ MySQL เชื่อมต่อคอมพิวเตอร์
แม่ข่ายกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เปรียบเทียบกับ
กระบวนการรับรองเดิม เพื่อลดขั้นตอนและระยะเวลา
การจัดส่งเอกสารได้ 5 ขั้นตอนจาก 13 ขั้นตอน ได้แก่
การส่งเอกสารขอการรับรอง การจัดส่งเอกสารให้ผู้ตรวจ
ประเมินพิจารณา การจัดส่งรายงานการตรวจประเมินให้

ห้องปฏิบัติการ ห้องปฏิบัติการส่งการแก้ไขข้อบกพร่อง และผู้ตรวจพิจารณาการแก้ไขข้อบกพร่อง ระบบสารสนเทศนี้มีผู้ใช้งาน 2 กลุ่มเป้าหมาย คือ ห้องปฏิบัติการ ที่ขอการรับรองและผู้ตรวจประเมิน จึงมีการจัดส่งแบบสำรวจความพึงพอใจของผู้ใช้งานระบบในด้านต่างๆ ดังนี้ 1) ด้านความรู้ความเข้าใจในการใช้คอมพิวเตอร์ 2) ด้านความรู้ความเข้าใจในการใช้โปรแกรม VAFC LAB 3) ด้านความน่าเชื่อถือของโปรแกรม 4) ด้านความปลอดภัยและสิทธิในการกำหนดให้เข้าถึงข้อมูล 5) ด้านระบบมีการประมวลข้อมูลที่ถูกต้องและแม่นยำ 6) ด้านความสามารถแก้ไขข้อมูลที่ผิดพลาดได้โดยไม่ซับซ้อน 7) ด้านความรวดเร็วต่อการใช้งาน 8) ด้านการประมวลผลของโปรแกรม 9) ด้านผู้ใช้สามารถเรียนรู้การใช้งานได้เองโดยไม่ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญช่วยเหลือ และ 10) ด้านอื่นๆ ได้แก่ ข้อมูล และภาพประกอบมีความ

เหมาะสม โปรแกรมที่นำมาใช้งานมีการจัดองค์ประกอบที่ชัดเจน ภาษาที่ใช้มีความชัดเจน ถูกต้อง และเหมาะสม มีสีสันทที่เรียบง่ายและสบายตา รูปแบบหน้าจอมีการแบ่งหน้าที่สอดคล้องกัน ทำการสำรวจความพึงพอใจในการใช้งาน จำนวน 3 รอบ (ก่อนการใช้งาน การใช้งานแล้ว 1 ปี และการใช้งานแล้วมากกว่า 1 ปี)

โปรแกรม VAFC LAB ที่นำมาใช้ในกระบวนการรับรองสารพิษตกค้างมีการใช้งานมากกว่า 2 ปี กลุ่มผู้ใช้งานมีความพึงพอใจมาก ร้อยละ 80.9 ค่าเฉลี่ย ($\bar{X} = 4.05$) มีข้อเสนอแนะในเรื่องเพิ่มการป้องกันการเปลี่ยนแปลงเอกสารหลังส่งเข้าระบบเรียบร้อยแล้ว และเพิ่มช่องทางในการแนบไฟล์เอกสารเพิ่มเติม รวมทั้งการติดตั้งโปรแกรมหน้าเว็บไซต์เพื่อการเข้าใช้งานได้ง่ายขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลสำรวจความพึงพอใจของผู้ใช้บริการระบบสารสนเทศของกระบวนการรับรองสารพิษตกค้างโปรแกรม VAFC LAB

การสำรวจครั้งที่	ระยะเวลาสำรวจ	จำนวน (คน)	ร้อยละ ความพึงพอใจ	ค่าเฉลี่ย ความพึงพอใจ ($\bar{X}$)	ค่า S.D.
1. ก่อนการใช้งาน	มี.ค. 2564	35	78.20	3.91	0.10
2. ใช้งาน 1 ปี	เม.ย. 2564 – ก.ค. 2564	19	78.86	3.94	0.19
3. ใช้งานมากกว่า 1 ปี	ก.ค. 2564 – ก.พ. 2566	28	80.90	4.05	0.20

วิจารณ์

การศึกษาข้อบกพร่องหรือสิ่งที่ไม่สอดคล้องตามข้อกำหนดจากผลการตรวจประเมินห้องปฏิบัติการ ตรวจสอบสารพิษตกค้างในผักและผลไม้สด เมื่อเปรียบเทียบข้อบกพร่องที่พบแยกตามรายปี พ.ศ. 2563, 2564 และ 2565 พบว่าในปี พ.ศ. 2564 มีจำนวนข้อบกพร่องสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับปี พ.ศ. 2563 และ 2565 อาจเกิดจากข้อกำหนดฉบับ ปี พ.ศ. 2563 มีการประกาศใช้ในช่วงกลางปี และทันวงจรที่ประกาศใช้ข้อกำหนด คือ ปี พ.ศ. 2564 ข้อกำหนดที่พบเป็นอันดับแรก คือ ข้อกำหนดที่ 5.2 ระบบตรวจสอบสารพิษตกค้าง ได้แก่ ห้องปฏิบัติการตรวจสอบสารพิษตกค้าง จัดทำเอกสารคุณภาพอย่างเหมาะสม การ

บริหารจัดการตัวอย่าง และวิธีการตรวจสอบสารพิษตกค้าง เป็นข้อกำหนดที่พบอันดับแรก เนื่องจากระบบเอกสารคุณภาพยังไม่ครอบคลุมตามขอบข่ายที่ขอรับรอง ข้อกำหนดที่ 5.9 การควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ ได้แก่ การสุ่มตัวอย่าง การประกันคุณภาพผลการทดสอบ และการปล่อยผลิตภัณฑ์ออกจำหน่าย ส่วนใหญ่ขาดหลักเกณฑ์การปล่อยผลิตภัณฑ์ เนื่องจากเป็นข้อกำหนดใหม่ การสุ่มตัวอย่างไม่ครอบคลุมชนิดตัวอย่าง และผลการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญไม่ผ่านเกณฑ์การประเมินและไม่พบการวิเคราะห์หาสาเหตุ ข้อกำหนดที่ 5.8 การตรวจติดตามคุณภาพภายในและการทบทวนบริหาร เนื่องจากมีการปรับรายละเอียดหัวข้อดำเนินการ ส่งผลให้ไม่ครอบคลุมตามข้อกำหนด ปัจจัยที่พบข้อบกพร่องอาจเกิดจากการ

เปลี่ยนแปลงของบุคลากรทั้งระดับหัวหน้างานจนถึงผู้ปฏิบัติงานที่อาจส่งผลกระทบต่อการทำงานเนื่องจากขาดความต่อเนื่องของการปฏิบัติงาน จากการวิเคราะห์ในแต่ละปี ไม่พบข้อบกพร่องที่เกิดซ้ำในประเด็นเดิม แสดงถึงองค์กรให้ความสำคัญของการพัฒนาระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการและการเรียนรู้จากข้อผิดพลาดนำไปวางแผนแก้ไข และป้องกันสิ่งที่อาจเกิดขึ้นซ้ำได้ดี รวมทั้งหน่วยงานให้ความร่วมมือในการกำหนดแนวทางการปฏิบัติเป็นอย่างดี เช่นเดียวกับการศึกษาแนวทางการยกระดับมาตรฐานการรับรองคุณภาพระบบตรวจสอบสารพิษตกค้างในผักสด ผลไม้สด⁽¹⁵⁾ จากผลจากการปรับปรุงข้อกำหนดฉบับใหม่ส่งผลให้ห้องปฏิบัติการเตรียมความพร้อมไม่สมบูรณ์ และความตระหนักในการรักษาระบบอย่างต่อเนื่อง เช่นเดียวกับการศึกษาการพัฒนาระบบคุณภาพการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการทดสอบด้านสาธารณสุขจากมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2005 สู่มาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017⁽¹⁶⁾ สะท้อนให้เห็นถึงการธำรงรักษาระบบคุณภาพของห้องปฏิบัติการต้องได้รับการสนับสนุนและยกระดับมาตรฐานให้เป็นไปตามข้อกำหนด

การทดสอบความชำนาญ (PT) การตรวจผักสดและผลไม้สดด้วยชุดทดสอบอย่างง่าย ซึ่งการรับรองนี้อยู่ในขอบเขตของห้องปฏิบัติการสามารถเลือกใช้การตรวจด้วยชุดทดสอบอย่างง่าย เพื่อคัดกรองสารพิษตกค้างในผักสด ผลไม้สด ที่มีข้อมูลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (Method Verification) เฉพาะชุดทดสอบนั้นๆ และข้อจำกัดที่ยังไม่สามารถระบุปริมาณสารพิษตกค้าง และจากผลการเข้าร่วม PT ของห้องปฏิบัติการจำนวน 25 แห่ง ในปี พ.ศ. 2563–2565 พบว่าห้องปฏิบัติการที่ผลไม่ผ่านเกณฑ์ประเมินในครั้งที่ 1 ได้ขอตัวอย่างทดสอบเพื่อทำการทดสอบซ้ำ เมื่อทดสอบซ้ำในครั้งที่ 2 พบว่าผลผ่านเกณฑ์ประเมินทั้งหมด จากการวิเคราะห์ผลการเข้าร่วม PT อย่างต่อเนื่องทั้ง 3 ปี พ.ศ. 2563–2565 ห้องปฏิบัติการผ่านเกณฑ์ประเมินเพิ่มขึ้นในปี พ.ศ. 2565 คิดเป็นร้อยละ 31.0 นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ที่ไม่ผ่านเกณฑ์ประเมินดังกล่าว มีปัญหาเกิดจากเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ของเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ความเชี่ยวชาญ ในการตรวจวิเคราะห์ของผู้ปฏิบัติงาน

การแปลผลที่เกิดจากสภาวะแวดล้อมในห้องปฏิบัติการที่มีแสงสว่างไม่เพียงพอต่อการอ่านผลการวิเคราะห์ และการบริหารจัดการตัวอย่าง พบความถี่เท่ากับร้อยละ 60.0, 33.3 และ 6.7 ตามลำดับ ซึ่งเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการต้องมีความรู้ความสามารถและความเชี่ยวชาญในการตรวจวิเคราะห์ รวมทั้งห้องปฏิบัติการต้องมีการอบรมวิธีการปฏิบัติงานของเจ้าหน้าที่ เพื่อลดความผิดพลาดของผลการวิเคราะห์ การเข้าร่วม PT เป็นข้อกำหนดด้านวิชาการ (ข้อ 5.9.2.1) ห้องปฏิบัติการที่ขอการรับรองต้องเข้าร่วม PT กับหน่วยจัดการทดสอบความชำนาญอย่างน้อยปีละ 1 ครั้ง การเข้าร่วมทดสอบความชำนาญจึงเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อห้องปฏิบัติการผลการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญเป็นกระบวนการที่แสดงถึงความสามารถห้องปฏิบัติการ สร้างความเชื่อมั่นเป็นที่ยอมรับ และเป็นไปตามมาตรฐานที่ขอการรับรอง เช่นเดียวกับการศึกษาการรับรองความสามารถผู้จัดโปรแกรมการทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการ⁽¹⁷⁾ สะท้อนให้เห็นถึงความสำคัญของการทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการ ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งในการประกันคุณภาพของห้องปฏิบัติการ

ในการศึกษาเปรียบเทียบข้อกำหนดมาตรฐานสารพิษตกค้าง ฉบับปี พ.ศ. 2563 และฉบับปี พ.ศ. 2566 กับข้อกำหนด ISO/IEC 17025:2017 พบว่าข้อกำหนดมาตรฐานสารพิษตกค้างมุ่งเน้น เรื่อง บุคลากรต้องมีความสามารถในการตรวจวิเคราะห์ เครื่องมือต้องมีเพียงพอและมีพร้อมใช้งาน ชุดทดสอบต้องมีคุณภาพ มีความไวความจำเพาะที่ดีเหมาะสมกับวัตถุประสงค์ ต้องมีผลการเข้าร่วมการทดสอบความชำนาญ ห้องปฏิบัติการต้องมีระบบการจัดการที่ดีมีคุณภาพ เพื่อให้เกิดความมั่นใจในผลการทดสอบ และเกิดการพัฒนาคุณภาพอย่างต่อเนื่อง แต่ในบางข้อกำหนดหลักยังไม่ครอบคลุมตามข้อกำหนดมาตรฐานสากล เนื่องจากการตรวจวิเคราะห์ด้วยชุดทดสอบอย่างง่าย จึงไม่สามารถนำมาปรับใช้กับมาตรฐานสารพิษตกค้างนี้ได้ เช่น การสอบกลับได้ทางมาตรวิทยา การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัดและการทบทวนคำขอ และข้อเสนอการประมูลและข้อสัญญา ข้อร้องเรียน สิ่งที่ไม่เป็นไปตามข้อกำหนด

ด้านระบบการบริหารงาน ได้แก่ เอกสารระบบการบริหารงาน การปฏิบัติเพื่อจัดการความเสี่ยงและโอกาส และการปฏิบัติการแก้ไข และข้อกำหนดสำคัญของมาตรฐานสากลที่ได้นำไปปรับใช้ในข้อกำหนดมาตรฐานสารพิษตกค้างฉบับใหม่ ได้แก่ การควบคุมคุณภาพภายใน การรักษาความลับ และการจัดการข้อมูล ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของระบบคุณภาพ

การพัฒนาโปรแกรมระบบสารสนเทศขึ้นมาเพื่อใช้ในกระบวนการรับรองสารพิษตกค้าง ในการยื่นเอกสารออนไลน์ ตั้งแต่เปิดใช้งานพบว่ากลุ่มเป้าหมายที่เป็นผู้ใช้งานระบบ ได้แก่ ห้องปฏิบัติการที่ขอการรับรอง และผู้ตรวจประเมิน มีความพึงพอใจมาก หลังจากใช้งานมากกว่า 2 ปี คิดเป็นร้อยละ 80.9 เนื่องจากการยื่นเอกสารผ่านระบบออนไลน์มีความสะดวกรวดเร็ว ลดขั้นตอน และระยะเวลาการจัดส่งเอกสารได้ 5 ขั้นตอน จาก 13 ขั้นตอน นอกจากนี้ มีข้อเสนอแนะเพื่อนำมาปรับปรุง เช่น ปรับระบบการอัปโหลดไฟล์เอกสารให้สามารถเพิ่มเติมได้มากขึ้น มีระบบแจ้งเตือนผ่านมือถือ สแกนใบรับรองแบบสี ประวัติการผ่านรับรอง ระบบการลงทะเบียน และการป้องกันการเปลี่ยนเอกสารที่ส่งเข้าระบบ อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องมีงบประมาณสำหรับการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง การบำรุงรักษาและให้มีการป้องกันการโจมตีระบบจาก Malware หรือ Ransomware

สรุป

การรับรองคุณภาพระบบตรวจสอบสารพิษตกค้างในผักสด ผลไม้สดด้วยชุดทดสอบอย่างง่าย เพื่อประโยชน์กับห้องปฏิบัติการที่ขอการรับรอง ระหว่างปี พ.ศ. 2563–2565 มีห้องปฏิบัติการที่ขอการรับรอง จำนวน 25 แห่ง จากผลการตรวจประเมินพบสิ่งที่ไม่สอดคล้องตามข้อกำหนดหรือข้อบกพร่อง สาเหตุจากข้อกำหนดในแต่ละข้อควรปรับปรุงให้ครอบคลุมและชัดเจน ประสิทธิภาพของการสื่อสารข้อกำหนดไม่ครอบคลุมผู้ปฏิบัติงาน ส่งผลให้ห้องปฏิบัติการปรับไม่ทันตามรอบการตรวจประเมิน ดังนั้นเพื่อการพัฒนาปรับปรุงคุณภาพของห้องปฏิบัติการ

สามารถสร้างความรู้ความเข้าใจให้กับเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ และผู้ตรวจประเมิน ให้มีความรู้ความเข้าใจ และนำไปปฏิบัติเป็นแนวทางเดียวกัน เพื่อลดการเกิดข้อบกพร่อง การรับรองตามมาตรฐานสารพิษตกค้าง มีข้อกำหนดให้ห้องปฏิบัติการที่ขอการรับรอง เข้าร่วมการทดสอบความชำนาญ ห้องปฏิบัติการที่ผลไม่ผ่านเกณฑ์ประเมินในครั้งที่ 1 เมื่อทำการทดสอบซ้ำในครั้งที่ 2 พบว่าผลผ่านเกณฑ์ประเมินทั้งหมด มีการปรับปรุงข้อกำหนดของมาตรฐานการรับรองสารพิษตกค้างเป็นระยะ โดยเปรียบเทียบกับมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025 ข้อกำหนดหลักบางรายการที่ยังไม่สามารถนำมาปรับใช้กับมาตรฐานสารพิษตกค้าง เนื่องจากความจำเพาะเหมาะสมกับบริบทของห้องปฏิบัติการที่ขอการรับรองด้วยชุดทดสอบอย่างง่าย หรือเตรียมความพร้อมให้สามารถพัฒนาระดับระบบคุณภาพ ฐานมาตรฐานสากล และมาตรฐานการรับรองสารพิษตกค้าง การพัฒนาระบบสารสนเทศเป็นประโยชน์เพื่อสนับสนุนกระบวนการยื่นเอกสารผ่านระบบออนไลน์ ลดระยะเวลาอำนวยความสะดวกแก่ผู้รับบริการและผู้มีส่วนได้ส่วนเสีย รวมทั้งสามารถขยายผลการพัฒนาระบบสารสนเทศในรูปแบบเดียวกันสู่งานรับรองห้องปฏิบัติการมาตรฐานระดับประเทศอื่นๆ ที่มีกระบวนการงานเดียวกัน เช่น การรับรองระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการด้านอาหาร และยา เพื่อเพิ่มช่องทางการเข้าถึงที่สะดวก รวดเร็ว และลดระยะเวลาการขอรับรอง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนายวราวุธ ศรีสุชา กลุ่มประชาสัมพันธ์องค์กร สำนักสื่อสารและประชาสัมพันธ์ กรมสนับสนุนบริการสุขภาพ ในการพัฒนาโปรแกรมการรับรองคุณภาพระบบตรวจสอบสารพิษตกค้างในผักสด ผลไม้สดด้วยระบบอิเล็กทรอนิกส์ และขอขอบคุณห้องปฏิบัติการที่ขอการรับรองมาตรฐานสารพิษตกค้าง จำนวน 25 แห่ง ที่ให้ความอนุเคราะห์ข้อมูล และบทความต่างๆ ในการศึกษาครั้งนี้จนสำเร็จได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522. ราชกิจจานุเบกษา ฉบับพิเศษ เล่ม 96 ตอนที่ 79. (วันที่ 13 พฤษภาคม 2522). หน้า 1.
2. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 387 (พ.ศ. 2560) เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้าง. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 134 ตอนพิเศษ 228 ง (วันที่ 18 กันยายน 2560). หน้า 8.
3. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 393 (พ.ศ. 2561) ออกตามความในพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้าง (ฉบับที่ 2). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 135 ตอนพิเศษ 264 ง (วันที่ 22 ตุลาคม 2561). หน้า 10.
4. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 419 (พ.ศ. 2563) ออกตามความในพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้าง (ฉบับที่ 3). ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 137 ตอนพิเศษ 257 ง. (วันที่ 2 พฤศจิกายน 2563). หน้า 27.
5. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 449 (พ.ศ. 2567) ออกตามความในพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้าง (ฉบับที่ 4). ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 141 ตอนพิเศษ 158 ง. (วันที่ 11 มิถุนายน 2567). หน้า 7.
6. ศุจิน มังคลรังษี, สุวิทย์ เตชะสาน, วีรยา สินธุกันท์, จิตาภา รัตนถาวร, ธัญญ์สิริ วิทยาคม, ภูษณิศ กิจกาญจนกุล, และคณะ. ความชุกของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมต ตกค้างในผักที่จำหน่ายในตลาดสดและห้างสรรพสินค้า ในพื้นที่กรุงเทพมหานคร. วารสารสาธารณสุขชุมชน.[วารสารออนไลน์]. 2565; [สืบค้น 24 มิ.ย. 2566]; 8(4): [12 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: <https://he02.tci-thaijo.org/index.php/ajcph/article/view/258133>.
7. ภคิน ปัญญาฤทธิสร, อธิรัตน์ ธนมิตรามณี, ปุณณัฐ สุนทรวงศ์, ชัชฎาภรณ์ใจ, วสุพล จุฑานพณี, พัสกร เพ็ชรผ่อง, และคณะ. สถานการณ์การตกค้างของสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมต ในผักที่โฆษณาปลอดสารพิษ ในเขตกรุงเทพมหานคร. วารสารสาธารณสุขมหาวิทยาลัยบูรพา.[วารสารออนไลน์]. 2566; [สืบค้น 24 มิ.ย. 2566]; 18(1): [13 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: <https://he02.tci-thaijo.org/index.php/phjbuu/article/view/260307/178972>.
8. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. มาตรฐานคุณภาพระบบตรวจสอบสารพิษตกค้างในผักสด ผลไม้สด. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 14 มิ.ย. 2566]; [16 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://blqs.dmsc.moph.go.th/QSD/FruitsSTD2020.pdf>.
9. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. ข้อกำหนดทั่วไป ข้อกำหนดด้านคุณภาพและวิชาการสำหรับการรับรองระบบตรวจสอบสารพิษตกค้างในผักสด ผลไม้สด สารปนเปื้อนในอาหาร และห้องปฏิบัติการด้านอาหารและยา. [ออนไลน์]. 2566; [สืบค้น 17 ก.พ. 2568]; [11 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://blqs.dmsc.moph.go.th/QSD/Requirement_QSD_2566.pdf.
10. สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. คู่มือการใช้ชุดทดสอบอาหาร. [ออนไลน์]. 2560; [สืบค้น 13 ก.พ. 68]; [118 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <http://bqsf.dmsc.moph.go.th/bqsfWeb/index.php/food-testkit-book>.
11. เสาวนีย์ อารมย์สุข, ชาญฤทธิ สัพพัญญู. คู่มือการตรวจประเมินเพื่อรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการ ตามมาตรฐาน ISO/ IEC 17025: 2017. นนทบุรี: สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2565.
12. จรรยา สุวัฒนพิเศษ. มาตรฐานความปลอดภัยสินค้าผักและผลไม้ของประเทศไทย: หลักความสอดคล้องกลมกลืนภายใต้ความตกลงว่าด้วยการใช้บังคับมาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช. วารสารมหาวิทยาลัยเวสเทิร์น มนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์ 2566; 9(2): 265–78.
13. ธมสรธรรม เชื้อจินดาวงศ์, โสภณ แยมกลิ่น, เออวดี เปรมษ์เจริญ. ปัจจัยที่มีผลต่อความเชื่อมั่นของผู้บริโภคในการเลือกซื้อสินค้าผักและผลไม้ในตลาดสดติดดาว. วารสารสังคมศาสตร์ปัญญาพัฒนา.[วารสารออนไลน์]. 2567; [สืบค้น 12 ก.พ. 2568]; 6(4): [13 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: <https://so06.tci-thaijo.org/index.php/JSSP/article/view/276245/185890>.

14. กอบทอง รูปหอม. Handbook GT-pesticide test kit, organophosphorus, carbamate, cholinesterase inhibitor. เอกสารเรียบเรียงใหม่ ครั้งที่ 7. นนทบุรี: ศูนย์อบรมจีที; 2556.
15. อมรรัตน์ ทศนกิจ, ปนัดดา ชิลวา. แนวทางการยกระดับมาตรฐานการรับรองคุณภาพระบบตรวจสอบสารพิษตกค้างในผักสดผลไม้สด. วารสารสาธารณสุข. [วารสารออนไลน์]. 2562; [สืบค้น 14 มิ.ย. 2566]; 28(5): [16 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: <https://thaidj.org/index.php/JHS/article/download/8132/7521/11351>.
16. เสาวนีย์ อารมย์สุข, ชื่นสมน บุญเจริญ. การพัฒนาระบบคุณภาพการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการทดสอบด้านสาธารณสุขจากมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2005สู่มาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017. ว วิชาการสาธารณสุข. [วารสารออนไลน์]. 2564; [สืบค้น 12 ก.พ. 2568]; 30(2): [16 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: <https://www.thaidj.org/index.php/JHS/article/view/10661/9372>.
17. สูดานันท์วิทยา. การรับรองความสามารถผู้จัดโปรแกรมการทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการ. ว สำนักบริหารและรับรองห้องปฏิบัติการ. [วารสารออนไลน์]. 2552; [สืบค้น 12 ก.พ. 2568]; 5(14): [3 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: http://lib3.dss.go.th/fulltext/BLA_J/BLA2552_5_14P2-4.pdf.

Assessment of Accredited Laboratories for Pesticide Residue Screening in Fresh Vegetables and Fruits Using Simple Test Kits during 2020–2022

Wilawan Srisuka¹, Siriphan Saeng-aroon¹, Chuleeporn Chantharasena²,
and Patravee Soisangwan¹

¹Bureau of Laboratory Quality Standards, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

²Regional Medical Sciences Center 8 Udon Thani, Department of Medical Sciences, Muang District,
Udon Thani 41330, Thailand

ABSTRACT Laboratory accreditation for pesticide residue screening in fresh vegetables and fruits is a crucial standard for laboratories that utilize simple test kits. This study aims to analyze nonconformities identified in assessment reports, evaluate the results of Proficiency Testing (PT) participation, compare standards for pesticide residue testing systems in fresh vegetables and fruits (pesticide residue standards) during the years 2020 and 2023 with the international standard ISO/IEC 17025:2017, and assess user satisfaction with the developed information program for laboratory accreditation processes. The findings indicated that the most common nonconformities were in the pesticide residue inspection system (25.9%) and product quality control (18.1%). Among laboratories participating in the PT, 73.8% met the assessment criteria, while 26.2% did not, primarily due to procedural errors by laboratory personnel. The updated standard includes enhancements in internal quality control, confidentiality, and information management. However, compared to ISO/IEC 17025:2017, it still lacks essential elements such as risk management and nonconformity identification, which are fundamental to the quality management system. The developed information system was successfully implemented, receiving an 80.9% satisfaction rating from both laboratories and assessors. This system helps reduce workload, facilitates communication, shortens processing time, systematically records data, and can be adapted for other accreditation standards.

Keywords: Laboratory accreditation, Testing of pesticide residues in fresh vegetables and fruits, Simple pesticide residue test kit

วิธีการเลือกในการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผักและผลไม้

วีรวุฒิ วิทยานันท์

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ ข้อกำหนดตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 ห้องปฏิบัติการต้องมีความสามารถในการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดสำหรับการรายงานผลการวิเคราะห์ การรายงานค่าความไม่แน่นอนเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชเพื่อใช้ประเมินความสอดคล้องกับมาตรฐาน การศึกษานี้ทำการเปรียบเทียบการประมาณค่าความไม่แน่นอนสามวิธี ได้แก่ วิธี Bottom-up ตามแนวทางของ ISO GUM ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้โดยทั่วไป และวิธีการเลือกสองวิธีตามแนวทาง Top-down คือ วิธีที่ใช้ข้อมูลการควบคุมคุณภาพภายใน และข้อมูลจากผลการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญ (PT) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกวิธีที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการรายงานประกอบผลการวิเคราะห์ วิธีแรกคำนวณผลตามแนวทางของ ISO GUM สำหรับวิธีใหม่ตามแนวทาง Top-down โดยใช้ข้อมูล QC ผลความแม่นยำและความเที่ยงจาก Spiked sample จำนวน 28 ตัวอย่าง จากการเก็บข้อมูลในงานประจำเป็นเวลา 2 ปี และวิธีที่ใช้ข้อมูลผลการประเมินการทดสอบความชำนาญ จำนวน 33 ข้อมูล ได้จากการเข้าร่วม PT 3 รอบ ผลพบค่าความไม่แน่นอนสัมพัทธ์ขยายที่ได้จากการคำนวณ 3 วิธี ได้แก่ วิธี ISO GUM วิธีที่ใช้ข้อมูล QC และวิธีที่ใช้ข้อมูล PT มีค่าเป็นร้อยละ 8.0, 31.7 และ 32.4 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานตามที่หน่วยงานระหว่างประเทศกำหนดที่ร้อยละ 50 พบว่าการคำนวณทั้งสามวิธีให้ค่าน้อยกว่าและสอดคล้องกับค่ากำหนด อย่างไรก็ตามวิธี ISO GUM ให้ค่าที่น้อยที่สุด และแตกต่างจากวิธีตามแนวทาง Top-down ทั้งสองวิธี ซึ่งมีค่าที่ใกล้เคียงกันมาก ดังนั้นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการรายงานค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช คือ วิธีตามแนวทาง Top-down ที่เป็นวิธีการเลือกใหม่ทั้งสองวิธี

คำสำคัญ: สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช, ผักและผลไม้, ความไม่แน่นอนของการวัด, แนวทางบนลงล่าง, แนวทางล่างขึ้นบน

Corresponding author E-mail: weerawut.w@dmasc.mail.go.th

Received: 20 January 2025

Revised: 30 April 2025

Accepted: 1 May 2025

บทนำ

ความไม่แน่นอนของการวัด (Measurement Uncertainty) เป็นพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับผลการวัดซึ่งบ่งบอกลักษณะการกระจายของค่าปริมาณของสิ่งที่ถูกวัด โดยเป็นการแสดงถึงช่วงของค่าปริมาณซึ่งมีค่าจริงอยู่ ณ ระดับความเชื่อมั่นที่ระบุไว้⁽¹⁾ และการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดเป็นหนึ่งในข้อกำหนดตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017⁽²⁾ ซึ่งกำหนดให้ห้องปฏิบัติการต้องมีความสามารถในการรายงานค่าความไม่แน่นอนประกอบผลการทดสอบในกรณีต่างๆ เช่น เมื่อเป็นความต้องการของลูกค้า หรือในกรณีที่ความไม่แน่นอนมีผลต่อการพิจารณาความสอดคล้องกับเกณฑ์กำหนดหรือเกณฑ์มาตรฐาน เป็นต้น และในใบรายงานผลการสอบเทียบต้องมีค่าความไม่แน่นอนที่อยู่ในหน่วยเดียวกันกับสิ่งที่วัดระบุในรายงานด้วยเสมอ ปัจจุบันมีแนวทางการประมาณค่าความไม่แน่นอนและการประมาณค่าตัวแปรในวิธีทดสอบหลายวิธี ซึ่งข้อกำหนด ISO/IEC 17025:2017 ไม่ได้ระบุว่าต้องใช้แนวทางใด แต่ห้องปฏิบัติการต้องเลือกใช้แนวทางทางสถิติที่ถูกต้อง (valid approaches) แนวทางที่มีการประมาณค่าความไม่แน่นอนอย่างสมเหตุสมผลและถูกต้องตามหลักวิชาการ⁽³⁾ ตัวอย่างแนวทางต่างๆ เช่น แนวทางการประมาณค่าความไม่แน่นอนตาม ISO GUM⁽⁴⁾ หรือ Bottom-up Approach หรือ Uncertainty Budget หรือ Deconstructive Approach และแนวทางการประมาณค่าความไม่แน่นอนจากข้อมูลที่ได้จากวิธีทดสอบ (Analytical Method Approach) หรือ Top-down Approach เช่น แนวทางการประมาณค่าความไม่แน่นอนจากข้อมูลในกระบวนการตรวจสอบความใช้ได้ในวิธีวิเคราะห์ (Method Validation Data Approach)^(5,6) แนวทางการประมาณค่าความไม่แน่นอนจากวิธีการทดสอบที่เป็นที่รู้จักกันดี (well recognized test method)⁽⁷⁾ เป็นต้น

การวิเคราะห์ทางเคมีมีลักษณะเฉพาะอย่างหนึ่งคือ เมื่อทำการวิเคราะห์ตัวอย่างเดียวกันซ้ำหลายครั้ง โดยเฉพาะการวิเคราะห์ที่ระดับต่ำมาก (0.001–10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ค่าที่วิเคราะห์ได้ในแต่ละครั้งอาจไม่เท่ากัน แม้การวิเคราะห์นั้นจะเป็นแบบ Within-

หรือ Between-laboratories ก็ตาม และในบางประเภทของการทดสอบที่มีความจำเพาะแตกต่างจากการทดสอบทางเคมีอื่น ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำอาจแตกต่างกันสูงถึงมากกว่าร้อยละ 50⁽⁸⁾ นอกจากจะเป็นการวิเคราะห์ที่ระดับต่ำมากแล้วยังมีปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อค่าความไม่แน่นอนหลายปัจจัย ซึ่งการประมาณค่าความไม่แน่นอนตามแนวทางมาตรวิทยาทางฟิสิกส์ อาจไม่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการณินี้ได้ ปัจจัยที่ส่งผลต่อค่าความไม่แน่นอนเหล่านี้ ได้แก่ ความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่าง⁽⁹⁾ การใช้เครื่องมือวิเคราะห์และวิธีวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน⁽¹⁰⁾ ความคงตัวของสารที่วิเคราะห์ (analyte) แต่ละชนิดระหว่างการเตรียมตัวอย่าง การใช้ตัวทำละลายในการสกัดที่มีคุณสมบัติแตกต่างกัน ความบริสุทธิ์ของสารเคมีที่ใช้ความสะอาดของอุปกรณ์และเครื่องแก้ว ความเป็นกรด-เบสของ analyte ที่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการวิเคราะห์ ปัจจัยเกี่ยวกับค่าการคืนกลับ (Recovery) ต่ำเมื่อผ่านขั้นตอนต่างๆ เช่น ขั้นตอนทำให้บริสุทธิ์ การระเหยตัวทำละลาย ขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือที่บริเวณ injection port หรือบริเวณ analytical column ผลกระทบจาก Matrix Effect ที่เกิดจากการสกัดผักและผลไม้ ยังส่งผลกระทบต่อปริมาณที่วิเคราะห์ และยังมีปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่ง คือ ศักยภาพและทักษะของนักวิเคราะห์ที่จะทำได้ผลการวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน วิธีการทางมาตรวิทยาทางฟิสิกส์อาจไม่สามารถรวบรวมปัจจัยทั้งหมดนี้เพื่อนำมาประมาณค่าความไม่แน่นอนได้ครบถ้วน จึงมีความจำเป็นที่ต้องพิจารณาลดทอนปัจจัยที่ได้จากการทดลองให้เหลือเพียง 2 ปัจจัยหลัก ได้แก่ ความแม่นยำ (Bias) และความเที่ยง (Precision) ทั้งนี้แม้ห้องปฏิบัติการจะสามารถลดอิทธิพลของบางปัจจัยได้ เช่น การใช้วิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์ การใช้สารมาตรฐานชนิดวัสดุอ้างอิงรับรอง อย่างไรก็ตามเมื่อมีการวิเคราะห์แบบ Multi-residue Method ซึ่งเป็นการวิเคราะห์สารหลายชนิด ทำให้ค่าความไม่แน่นอนยังคงมีการกระจายตัวสูง⁽³⁾ ในทางปฏิบัติแล้วการคำนวณค่าความไม่แน่นอนของสารเคมีแต่ละชนิด เพื่อประกอบรายงานแต่ละครั้งจะใช้เวลาในการรวบรวมข้อมูลพื้นฐานมาก เพราะมีสารหลายชนิดที่ต้องคำนึงถึง และแต่ละสารมีความจำเพาะและคุณสมบัติทางเคมีที่แตกต่างกัน

รวมทั้งช่วงเวลาที่วิเคราะห์ที่แตกต่างกันก็ส่งผลถึงปริมาณที่วิเคราะห์ได้เช่นเดียวกัน

ในขณะที่ประเทศไทยไม่มีข้อกำหนดทางกฎหมายในการรายงานค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในอาหาร แต่ในระดับสากลห้องปฏิบัติการอ้างอิงของสหภาพยุโรป (The European Union Reference Laboratory for Pesticide Residues, EURL) แนะนำให้ใช้การรายงานค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยใช้ Default Value ที่ร้อยละ 50 ของค่าที่วิเคราะห์ได้⁽¹¹⁾ โดยมีเงื่อนไขว่า Recovery จะต้องไม่ต่ำกว่าร้อยละ 20 สำหรับกรณีที่ Recovery มีค่าเกินกว่าค่าดังกล่าวให้คำนวณโดย Recovery Correct ($100\% / \% \text{Recovery}$) โดยค่า Recovery ที่นำมาคำนวณนี้สามารถเลือกใช้จากการทดสอบความใช้ได้ของวิธีเริ่มต้นก่อนนำวิธีไปใช้งาน (initial validation) ข้อมูลจากการทำ on-going validation หรืออาจมาจาก Recovery เมื่อเติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่าง (spiked/fortified sample) ในชุดนั้น ๆ ก็ได้ การใช้ค่า Default Value นี้คำนวณจาก 2 เท่าของค่า Relative Standard Deviation (RSD) ที่ได้จาก Horwitz's equation ที่ให้ค่าระหว่าง 20-30% ภายใต้ช่วงการวิเคราะห์ปกติ⁽¹²⁾ และค่า RSD ได้จากการรวบรวมผลการวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการเครือข่ายของสหภาพยุโรป⁽¹³⁾ สาเหตุที่สามารถเลือกใช้ค่านี้ได้เพราะมีข้อมูลเชิงวิชาการสนับสนุนและเป็นข้อตกลงร่วมกันระหว่างหน่วยงานควบคุมทางกฎหมายใช้สำหรับการตัดสินใจสอดคล้องกับข้อกำหนดทางกฎหมายซึ่งส่วนใหญ่ตัดสินจากค่า Maximum Residue Limit (MRL) หรือค่า Default Limit ที่ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในกรณีไม่มีค่า MRL ระบุไว้ แต่กรณีที่ตรวจพบปริมาณที่สูงกว่านี้ ค่าความไม่แน่นอนที่จะรายงานอาจมีค่ามากเกินไปและไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้งาน อาจต้องใช้วิธีการประมาณค่าวิธีอื่นที่สมเหตุสมผลกว่าและจะต้องพิจารณาเป็นกรณี ๆ ไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อประเมินวิธีประมาณค่าความไม่แน่นอนที่เหมาะสมที่สุด สำหรับการรายงานผลการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช

ในผักและผลไม้ โดยเป็นวิธีที่ห้องปฏิบัติการสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานประจำได้ การคำนวณและการประมาณค่าความไม่แน่นอนต้องง่าย สะดวกรวดเร็ว ใช้เวลาน้อยแต่ยังคงไว้ซึ่งความถูกต้องเชิงวิชาการ เป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับในระดับสากลและให้ค่าที่สมเหตุสมผลอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ โดยทำการเปรียบเทียบการประมาณค่าความไม่แน่นอน 3 วิธี ได้แก่ การคำนวณผลตามแนวทางของ ISO GUM ซึ่งเป็นแนวทาง Bottom-up Approach และวิธีตามแนวทาง Top-down Approach 2 วิธี ได้แก่ การใช้ข้อมูล Quality Control โดยใช้ความแม่นยำและความเที่ยงจาก Spiked Sample ในงานประจำจากการเก็บข้อมูลช่วงเวลาหนึ่ง และวิธีสุดท้าย คือ การใช้ข้อมูลผลการประเมินจากการเข้าร่วมการทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing, PT) ที่ได้จากการเข้าร่วมจำนวน 3 รอบ

วัสดุและวิธีการ

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี: acetonitrile, HPLC grade (Merck, USA), acetone, AR grade (RCl Labscan, USA) n-hexane, Pesticide grade (Burdick & Jackson, USA), ethyl acetate, HPLC grade (Burdick & Jackson, Korea), QuEChERS Extraction Packet, EN Method Part No: 5982-7650 (ประกอบด้วย MgSO_4 4 กรัม, NaCl 1 กรัม, sodium citrate dehydrate 1 กรัม และ disodium hydrogen citrate sesquihydrate 0.5 กรัม) และ Dispersive SPE EN method (ประกอบด้วย MgSO_4 900 มิลลิกรัม, PSA 50 มิลลิกรัม, และ graphite carbon black (GCB) 50 มิลลิกรัม) (Agilent Technologies, USA), DI water (Type I, resistivity > 18 mΩ.cm, D-sorbitol AR, purity ≥ 98%

สารมาตรฐาน: วัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified Reference Material: CRM) (CPAChem, France) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (with traceability) ทั้งสิ้น 132 ชนิด ประกอบด้วย

สารมาตรฐานที่วิเคราะห์โดยเครื่อง GC-MS/MS 106 ชนิด ได้แก่ 4,4'-DDD (p,p'-TDE), 4,4'-DDE

(p,p'-DDE), 4,4'-DDT (p,p'-DDT), acephate, alachlor, aldrin, ametryn, azinphos-ethyl, azinphos-methyl, BHC-alpha (alpha-HCH), BHC-beta (beta-HCH), BHC-delta (delta-HCH), BHC-gamma (gamma-HCH), bifenthrin, bromophos-ethyl, bromopropylate, buprofezin, butachlor, cadusafos, chlordane-alpha, chlordane-oxy, chlordane-gamma, chlorfenapyr, chlorfenvinphos, chlorobenzilate, chloroneb, chlorothalonil, chlorpropham, chlorpyrifos, chlorpyrifosmethyl, cyanophos, cyfluthrin, cypermethrin, DCPA (Dacthal), DEET, deltamethrin, demeton-s-methyl, diazinon, dichlorvos, dicofol, dicrotophos, dieldrin, dimethoate, dioxathion, disulfoton, ditalimfos, endosulfan sulfate, endosulfan-alpha, endosulfan-beta, endrin, EPN, ethion, ethoprofos, etrimfos, fenclorophos, fenitrothion, fenpropathrin, fenthion, fenvalerate, fipronil, folpet, fosthiazate, heptachlor, heptachlor epoxide-cis, heptachlor epoxide-trans, heptenophos, hexachlorobenzene, isofenphos, isoxathion, lambda-cyhalothrin, malathion, methacrifos, methamidophos, methidathion, methoxychlor, metribuzin, mevinphos, naled, parathion, parathion-methyl, permethrin, phorate, phosalone, phosmet, phosphamidon, picoxystrobin, pirimiphos-ethyl, pirimiphos-methyl, profenofos, propachlor, propargite, propetamphos, prothiofos, quinalphos, quintozone, tecnazene, terbacil, terbufos, tetrachlorvinphos, tetradifon, thiometon, tolylfluanid, triadimefon, triazophos และ trifluralin

สารมาตรฐานที่วิเคราะห์โดยเครื่อง LC-MS/MS 26 ชนิด ได้แก่ aldicarb, atrazine, bendiocarb, bromacil, carbary, carbendazim, carbofuran-3-hydroxy, carbofuran, carboxin, fenobucarb, hexazinone, isoprocarb, metalaxyl, methiocarb, methomyl, metolachlor, monocrotophos,

omethoate, oxamyl, phenthoate, pyrimethanil, simazine, tebufenpyrad, thiabendazole, thiophanate-methyl และ tolclofos-methyl

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน: ผสมสารละลายมาตรฐาน stock standard solution ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน acetone เพื่อให้ได้ intermediate standard solution ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำกว่า -18°C ก่อนการใช้งาน เจือจาง intermediate standard solution ด้วย acetone หรือสารสกัดจากตัวอย่าง เพื่อทำ working standard solution ช่วงความเข้มข้น 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.25 และ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เติมสารละลาย D-sorbitol 3% ปริมาณ 3 ไมโครลิตร ในสารละลาย 1 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ทันทีหรือสามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำกว่า -18°C ไม่เกิน 1 สัปดาห์

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องซึ่งไฟฟ้าความละเอียด 0.001 กรัม (LC 620S, Sartorius, Germany) และ 0.01 มิลลิกรัม (MC 210S, Sartorius, Germany) เครื่องระเหยสารละลายแบบ Heating Box และใช้แก๊สไนโตรเจนในการระเหยสารสกัด (REACTI-THERM III #TS-18824, Thermo scientific, USA) เครื่องบดปั่นอาหาร (RONIC, Poland) เครื่องหมุนปั่นผสมสารละลาย (Vortex-2 Genie, Scientific Industries, USA) micropipette ขนาด 2-20 ไมโครลิตร ขนาด 20-200 ไมโครลิตร และขนาด 100-1,000 ไมโครลิตร (Eppendorf, Germany) amber vial ขนาด 4 มิลลิลิตร centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร และ 15 มิลลิลิตร ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำกว่า -18°C certified volumetric flask เครื่องแก้วทุกชนิดล้างด้วย acetone 2 ครั้ง และ n-hexane 2 ครั้ง แล้วผึ่งให้แห้งก่อนนำมาใช้งาน เครื่อง GC-MS/MS: (7890B, TQ7000C Triple Quadrupole MS/MS, Agilent Technology, USA) เครื่อง LC-MS/MS (1260 Series, AB Sciex API 5500 QTRAP Sciex, Agilent Technology, USA)

ตัวอย่างผักและผลไม้

ตัวอย่างผักและผลไม้ใช้ส่วนที่นำมาวิเคราะห์ตาม SANTE/11312/2021⁽¹¹⁾ แบ่งเป็น 2 ประเภท ได้แก่ 1) High water content และ 2) High acid and high-water content และใช้ตัวอย่างจากงานประจำที่มีชนิดตัวอย่างที่หลากหลายครอบคลุมทุกกลุ่มย่อยรายละเอียดดังนี้

High water content; กลุ่มผลไม้จากฐานรองดอก (pome fruit) ใช้ apple, กลุ่มผลเดี่ยว (stone fruit) ใช้ cherry, กลุ่มผลไม้อื่นๆ ใช้ mango, กลุ่มพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (allium) ใช้ garlic, กลุ่มผักประเภทผลและพืชวงศ์แตง (fruiting vegetables/cucurbit) ใช้ tomato, กลุ่มพืชวงศ์กะหล่ำปลี (brassica) ใช้ cabbage, กลุ่มผักใบและสมุนไพรใบสด (leafy vegetable and fresh herb) ใช้ lettuce, กลุ่มผักลำต้น (stem and stalk vegetable) ใช้ celery, กลุ่มพืชตระกูลถั่วกินสด (fresh legume) ใช้ bean, กลุ่มเห็ดสด (fresh fungi) ใช้เห็ด champignon และกลุ่มผักหัว (root and tuber) ใช้ carrot เป็นตัวแทน

High acid and high-water content; กลุ่ม citrus ใช้ lemon กลุ่มผลไม้ผลเล็กและเบอร์รี่ (small fruit and berry) ใช้ strawberry และ grape เป็นตัวแทน

การวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช

ใช้วิธี Modified QuEChERS In-house Method Based on BS EN 15662:2018⁽¹⁴⁾ เป็นการวิเคราะห์แบบ Multi-residue Method โดยซังตัวอย่างผักและผลไม้ที่บดละเอียด 10.0 กรัม ลงใน centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำ acetonitrile 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยมือ 1 นาที เติมน้ำผสม extraction Packet, EN Method (EN 15662) แล้วเขย่าให้เข้ากันด้วยมืออีก 1 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 RPM เป็นเวลา 5 นาที ตัวอย่างจะเกิดการแยกชั้น แบ่งสารสกัดส่วนใสด้านบนที่ได้เป็น 2 ส่วน สำหรับตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างด้วยเทคนิค GC-MS/MS และ LC-MS/MS

การวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชด้วยเครื่อง GC-MS/MS

สารสกัดส่วนที่ 1 ปิเปตสารละลาย 3 มิลลิลิตร มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย Dispersive SPE ที่เหมาะสม จากนั้นหมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 4,000 RPM เป็นเวลา 5 นาที ปิเปตสารละลายด้านบน 2 มิลลิลิตร ระเหยแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายผสมระหว่าง n-hexane: ethyl acetate 3:1 เติมน้ำละลาย 3% D-sorbitol ปริมาตร 3 ไมโครลิตร นำไปตรวจวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณด้วยเครื่องมือ GC-MS/MS ด้วยเทคนิค Matrix-Matched Calibration Curve โดยใช้ column: DB-5MS 30 m, 0.25 mm id, 0.25 μ m film thickness (Agilent Technology, USA) มีสถานะเครื่องดังนี้ ส่วน injector เป็น ALS, pulsed splitless mode, initial temperature 80°C hold 0.1 min, 300°C to 300°C cryogenic temperature 50°C มี injection volume เป็น 4 ไมโครลิตร oven temperature program เป็น initial 70°C hold 1 min, rate 50°C/min to 150°C, rate 6°C/min to 200°C, rate 16°C/min to 280°C hold 8.5 min, rate 50°C/min to final 300°C hold 0.5 min และ post-run at 70 °C ใช้เวลาในการวิเคราะห์ประมาณ 30 นาที ใช้ ion source temperature 280°C, quadrupole temperature MS1 และ MS2 เป็น 180°C, mode constant pressure ที่ 15.8 psi และใช้โปรแกรมควบคุมเครื่องมือให้สาร chlorpyrifos มี RT คงที่ 12.0 $\pm$ 0.1 นาที สารสนใจเมื่อเข้าสู่เครื่อง GC-MS/MS จะถูกทำให้แตกตัวเป็นประจุโดยใช้แก๊ส He เป็น quench gas และ N₂ เป็น collision gas ที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที และถูกตรวจวัดด้วย multiple reaction monitoring, MRM mode โดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ มี LOD = 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ LOQ = 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

การวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชด้วยเครื่อง LC-MS/MS

สารสกัดส่วนที่ 2 ปิเปตสารละลายส่วนใส 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Dispersive SPE เขย่า 1 นาที จากนั้น

หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 4,000 RPM เป็นเวลา 5 นาที แล้วเปิดสารละลายส่วนใสลงใน micro-spin filters 0.2 μm ชนิด nylon จากนั้นหมุนเหวี่ยงอีกครั้ง เก็บสารละลายส่วนใส นำไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารเคมี ป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างด้วยเทคนิค LC-MS/MS วิเคราะห์ด้วยเทคนิค Procedural Calibration Curve เครื่อง LC-MS/MS ใช้ column: Synergi TM 2.5 μm Fusion-PR 100 $^{\circ}\text{A}$, 50×2.0 mm (Phenomenex, USA), mobile phase: 1M NH_4HCO_2 :MeOH:H₂O, A สัดส่วน 5:95:900 และ B สัดส่วน 5:900:5 มีสภาวะเครื่องดังนี้ flow rate:

0.4 ml/min, injection volume: 2 μl , column temperature: 40 $^{\circ}\text{C}$ การแยกสารเป็นแบบ gradient ดังแสดงในตารางที่ 1 และมีสภาวะของเครื่อง mass spectrometer เป็น ionization mode: ESI (turbo spray), polarity: negative & positive, ion spray voltage 5,000 และ -4,200 eV, scan type MRM, temperature TEM 400 $^{\circ}\text{C}$, collision gas, CAD: nitrogen; medium, curtain gas (CUR): 30 psi, ion source gas (GS1): 60 psi, ion source gas (GS2): 60 psi โดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ มี LOD = 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ LOQ = 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ตารางที่ 1 Gradient profile: Agilent 1260 Series

Time (min)	flow rate (ml/min)	Mobile phase A	Mobile phase B
0.0	0.4	100	0
1.0	0.4	100	0
12.0	0.4	0	100
16.0	0.4	0	100
16.1	0.4	100	0
25.0	0.4	100	0

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด

วิธีการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด สำหรับการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในผัก และผลไม้ใช้ 2 แนวทางหลัก แบ่งออกเป็น 3 วิธีย่อย

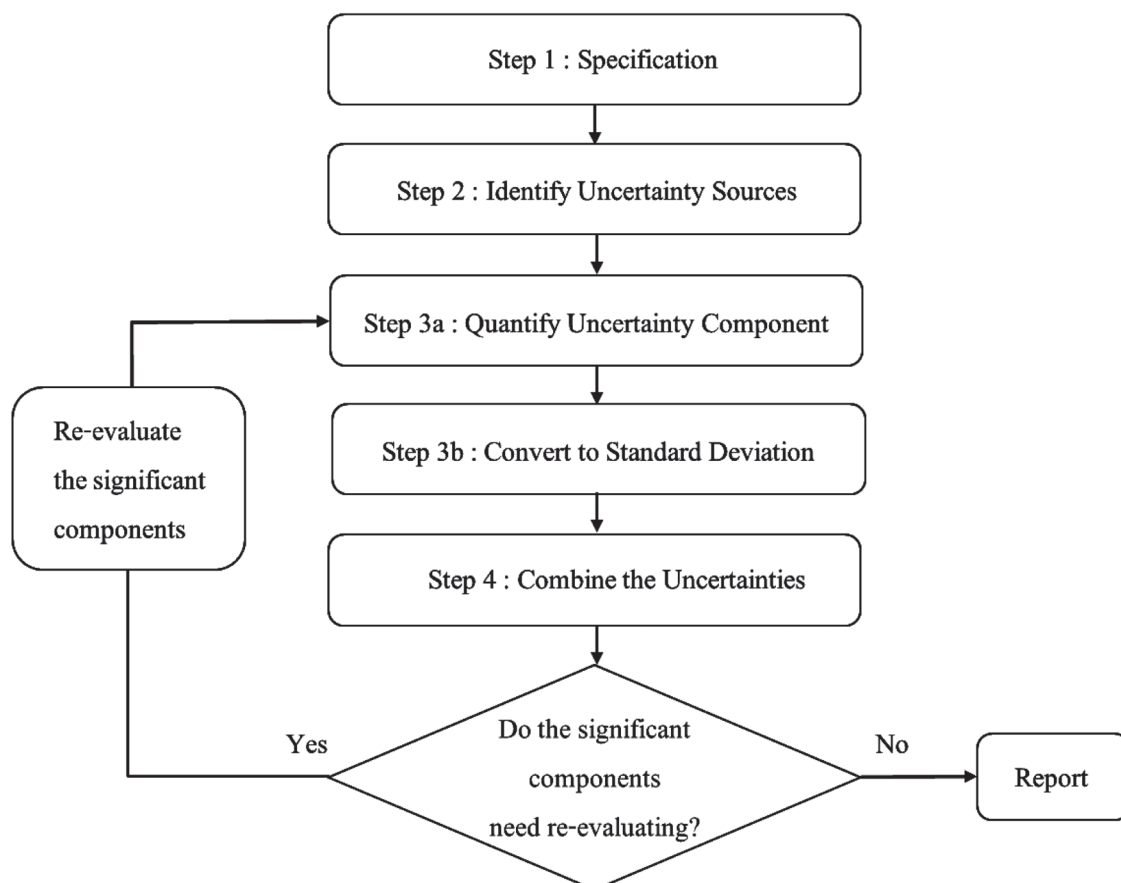
แนวทาง Bottom-up โดยวิธี ISO GUM⁽¹⁵⁾

วิธี ISO GUM นี้เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมอย่างกว้างขวาง มีรูปแบบการคำนวณค่าความไม่แน่นอนที่ชัดเจนเป็นลำดับขั้นตอน ดังแสดงในภาพที่ 1 จึงเหมาะสมกับวิธีวิเคราะห์ใหม่ที่ยังไม่มีข้อมูลจากการประกันคุณภาพ และการควบคุมคุณภาพอย่างเพียงพอและเหมาะสม แนวทางนี้ถูกพัฒนามาจากการวัดทางฟิสิกส์ แล้วนำมาประยุกต์ใช้ในเอกสาร EURACHEM ซึ่งห้องปฏิบัติการที่ต้องการพัฒนาวิธีทดสอบขึ้นใหม่ ห้องปฏิบัติการสามารถใช้แนวทางนี้ในการพิจารณาและตรวจสอบแนวทางการพัฒนาจากปริมาณค่าความไม่แน่นอนของแต่ละแหล่งได้ โดยในปัจจุบันห้องปฏิบัติการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชส่วนใหญ่ใช้วิธีนี้

สำหรับขั้นตอนการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดโดยวิธี ISO GUM เริ่มจากขั้นตอนที่ 1 การระบุสิ่งที่ต้องการทดสอบพร้อมหน่วย พิจารณาพารามิเตอร์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับปริมาณที่ต้องการวัด เช่น ความเข้มข้น อุณหภูมิ ปริมาตร ค่าคงที่ เขียนสูตรหรือสมการการคำนวณผลการวิเคราะห์ เขียนภาพแสดงขั้นตอนการวิเคราะห์ รวมถึงระบุเครื่องมือและสารมาตรฐาน ขั้นตอนที่ 2 ระบุแหล่งที่มาของความไม่แน่นอน รวบรวมแหล่งที่มาที่มีผลต่อการวัด พิจารณาเทอมต่างๆ ในสมการการคำนวณ เครื่องมือที่ใช้วัด ปัจจัยจากบุคลากร ความแตกต่างระหว่างผู้ทดสอบ ความเอนเอียงในการอ่านค่า สภาพแวดล้อมที่ทำการทดสอบ การสุ่มตัวอย่าง การชั่งและการสกัดตัวอย่าง ความเป็นเนื้อเดียวกัน ความคงตัวของตัวอย่าง สภาวะการเก็บรักษาตัวอย่าง สารปนเปื้อนจากเนื้อตัวอย่าง การเตรียมกราฟมาตรฐาน ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน การเลือกใช้โมเดลในการสร้างกราฟมาตรฐาน

การปิดเศษทศนิยม ความแปรปรวนจากการทำซ้ำ ความเบี่ยงเบน จัดกลุ่มและพิจารณาองค์ประกอบของความไม่แน่นอน ทำแผนภูมิแก๊งปลาประกอบ (Cause and Effect Analysis by Fishbone Diagram) ขั้นตอนที่ 3 ระบุค่าของแต่ละองค์ประกอบ โดยอาจมาจากแหล่งต่างๆ เช่น จากข้อมูลที่มีอยู่ Specification/Certification จากการทดลอง เช่น Method validation กราฟมาตรฐาน ข้อมูลการประกันคุณภาพและจากประสบการณ์ เมื่อระบุค่าต่างๆ ได้แล้ว จึงเปลี่ยนค่า

ของแต่ละองค์ประกอบให้เป็นค่าความไม่แน่นอนมาตรฐาน (Standard Uncertainty) เปลี่ยนค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานเป็นค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative Standard Uncertainty) ขั้นตอนที่ 4 นำค่าความไม่แน่นอนที่ได้มาจากแต่ละองค์ประกอบมาคำนวณค่าความไม่แน่นอนมาตรฐานรวม (Combined Standard Uncertainty) แล้วคำนวณค่าความไม่แน่นอนมาตรฐาน (Expanded Standard Uncertainty)⁽¹⁶⁾ เพื่อรายงานผล ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 กระบวนการประมาณค่าความไม่แน่นอนตามแนวทางของวิธี ISO GUM

แนวทาง Top-down โดยวิธี Intra-laboratory QC Data

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดตามแนวทางนี้เป็นการใช้ข้อมูลจากกระบวนการตรวจสอบความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการ⁽¹⁷⁾ ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์อาจได้จากผลการทดสอบจากห้องปฏิบัติการที่ต่างกันหรือ

จากภายในห้องปฏิบัติการเดียว การคำนวณผลรวมขององค์ประกอบของค่าความไม่แน่นอนมาจากข้อมูลการประกันคุณภาพของห้องปฏิบัติการหรือการควบคุมคุณภาพภายใน คือ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดสอบ Intermediate Precision ค่า Bias ของกระบวนการวัด และข้อมูลอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น การศึกษา Ruggedness/Robustness แนวทางนี้เป็นแนวทางที่

ปฏิบัติได้ง่าย ค่าใช้จ่ายไม่สูง และประยุกต์ได้สะดวก เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี ISO GUM ในการศึกษาที่ใช้ข้อมูลการควบคุมคุณภาพภายในของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช ในการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีโดยการเติมสารมาตรฐานที่ระดับ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในผักและผลไม้ต่างชนิดกัน ในแต่ละชุดการวิเคราะห์ ใช้ data point 28 จุด เก็บข้อมูลในช่วงเวลาตั้งแต่วันที่ 3 สิงหาคม พ.ศ. 2565 ถึง วันที่ 11 ธันวาคม พ.ศ. 2567 แล้วนำข้อมูลมาประมวลผล โดยอาศัยหลักการ SANTE/11312/2021 (V2) Appendix C.

แนวทาง Top-down โดยวิธี Proficiency Testing Data

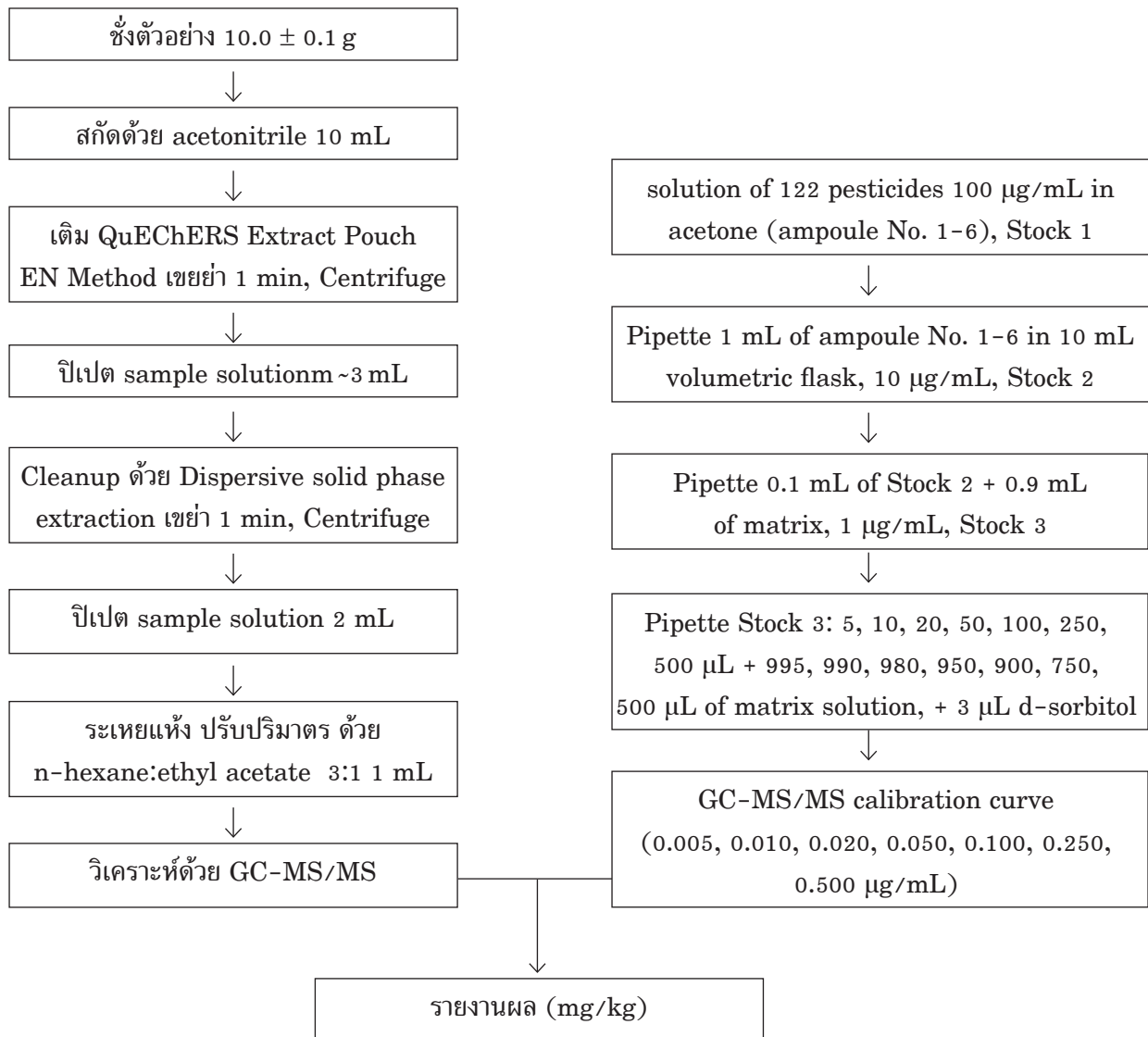
วิธีนี้เป็นแนวทางที่ได้จากข้อมูลการเข้าร่วมการทดสอบความชำนาญ ซึ่งมีความไม่แน่นอนที่สามารถอ้างอิงจากกลุ่มห้องปฏิบัติการ⁽¹⁸⁾ โดยการนำค่าความผิดพลาดเชิงระบบ คือ Bias และค่าความผิดพลาดเชิงสุ่ม คือ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการทดสอบ Repeatability และ Reproducibility มาพิจารณาหาความไม่แน่นอนรวม แต่ไม่นำรายละเอียดของแหล่งความไม่แน่นอนย่อยมาคิด เนื่องจากมีการอนุมานว่าได้คิดรวมไว้แล้ว วิธีนี้จะดำเนินการได้หากมีแผนการทดสอบความชำนาญอย่างเหมาะสม โดยต้องครอบคลุมช่วงการวัดและเนื้อชนิดตัวอย่าง (Matrix) ซึ่งแผนทดสอบความชำนาญการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในผักและผลไม้เป็นแผนที่มีการจัดอย่างสม่ำเสมอ ครอบคลุมชนิดและปริมาณสารที่มีคุณสมบัติหลากหลายในเนื้อตัวอย่างที่เป็นตัวแทนของกลุ่มตัวอย่างได้ นอกจากนี้อาจมีการใช้สมการของ Horwitz's equation สำหรับการประมาณค่าความไม่แน่นอนในการทดสอบที่มีความหลากหลายของความเข้มข้นหากเป็นการใช้ข้อมูลจากหลายห้องปฏิบัติการ สำหรับการคำนวณในครั้งนี้ใช้ข้อมูลการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการ กับหน่วยงาน FAPAS[®]

3 รอบ ได้แก่ FAPAS[®] 19366 beetroot puree, FAPAS[®] 19341 peas with pods puree และ FAPAS[®] 19313 cucumber puree โดยใช้ผลการวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการ (x_i), ค่ากำหนด (assigned value, x_{pt}), Standard Deviation for Proficiency Assessment (σ_{pt}), จำนวนผลการวิเคราะห์ที่เข้าร่วมในแต่ละรายการ (No.) มี datapoints รวมทั้งสิ้น 33 ข้อมูลเป็นการประมาณค่าความไม่แน่นอนที่คำนึงถึงความหลากหลายของ analyte ในชนิดตัวอย่างที่แตกต่างกัน

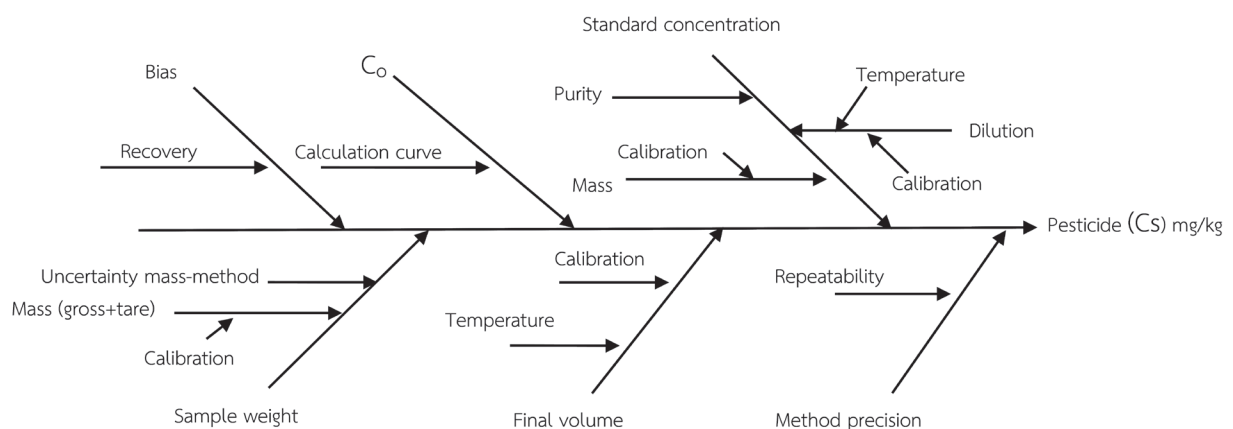
ผล

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดแนวทาง Bottom-up ด้วยวิธี ISO GUM

ประมาณค่าความไม่แน่นอนโดยเริ่มจากพิจารณาขั้นตอนการทดสอบ โดยกำหนดแผนภูมิขั้นตอนวิธีวิเคราะห์ การเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในผักและผลไม้ ด้วยวิธี QuEChERS ES BN 15662:2018 เทคนิค GC-MS/MS และ LC-MS/MS ดังแสดงในภาพที่ 2 จากนั้นกำหนดสิ่งที่จะตรวจวัด (measurand) เป็นปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช (pesticides) เลือกสาร chlorpyrifos ที่ตรวจพบในตัวอย่างผักและผลไม้ ด้วยเครื่อง GC-MS/MS หน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (mg/kg) คำนวณปริมาณสารที่ตรวจวัด โดยใช้ค่าความเข้มข้น (C_0) ที่อ่านได้จาก Calibration Curve ชนิด Matrix matched ที่สร้างจากความสัมพันธ์ระหว่าง Concentration กับ Peak area แต่ละขั้นตอนของการวิเคราะห์สามารถระบุแหล่งที่มาของค่าความไม่แน่นอน นำมาสรุปเป็น Cause and Effect Diagram ดังแสดงในภาพที่ 3 ทำการคำนวณค่าความไม่แน่นอนของแต่ละองค์ประกอบตัวอย่างการวิเคราะห์สาร chlorpyrifos ในผักและผลไม้ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 mg/kg ดังแสดงในตารางที่ 2



ภาพที่ 2 Flow diagram แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในผักและผลไม้ด้วยวิธี QuEChERS



ภาพที่ 3 แผนภูมิแก๊งปลา Cause and Effect Diagram แสดงแหล่งที่มาของความไม่แน่นอนการวิเคราะห์ สารเคมี ป้องกันกำจัดศัตรูพืชในผักและผลไม้ด้วยวิธี QuEChERS

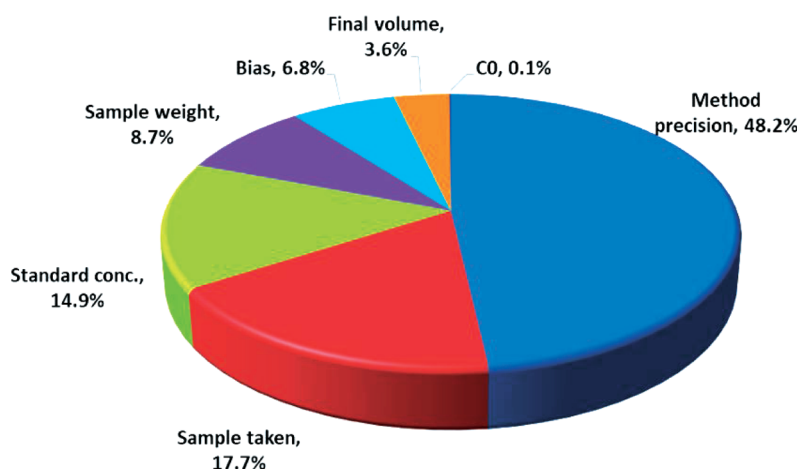
ตารางที่ 2 ผลการคำนวณหาความไม่แน่นอนมาตรฐานรวม (Calculation of Combined Standard Uncertainty) การวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในผักและผลไม้ด้วยวิธี QuEChERS

Component	Value, x	Uncertainty $\pm U$	Divisor	Standard Uncertainty, $u(x)$	Relative Standard Uncertainty, $u(x)/x$
Sample weight					
- weight variation	10 g	0.1 g	$\sqrt{3}$	0.05774 g	0.005770
- tare	10 g	0.003 g	2	0.00150 g	0.000150
- gross	10 g	0.003 g	2	0.00150 g	0.000150
Combined Standard Uncertainty					0.005777
Sample taken					
- calibration (pipette)	10 ml	0.0015 ml	2	0.00075 ml	0.000075
- temperature (pipette)	10 ml	0.04 ml	$\sqrt{3}$	0.02309 ml	0.002309
- calibration (pipette)	2 ml	0.001 ml	2	0.00050 ml	0.000250
- temperature (pipette)	2 ml	0.04 ml	$\sqrt{3}$	0.02309 ml	0.011545
Combined Standard Uncertainty					0.011777
Final volume					
- calibration (pipette)	1 ml	0.001 ml	2	0.00050 ml	0.000500
- temperature (pipette)	1 ml	0.004 ml	$\sqrt{3}$	0.00231 ml	0.002309
Combined Standard Uncertainty					0.002363
C_o	100 $\mu\text{g/ml}$	0.0072 $\mu\text{g/ml}$	1	0.0072 $\mu\text{g/ml}$	0.000072
Conc. of standard					
1. Stock standard					
purity	100.32 $\mu\text{g/ml}$	1.14 $\mu\text{g/ml}$	$\sqrt{3}$	0.65818 $\mu\text{g/ml}$	0.00656
2. Working standard					
Dilution					
-calibration (pipette)	1 ml	0.005 ml	2	0.00250 ml	0.00250
-temperature (pipette)	1 ml	0.005 ml	$\sqrt{3}$	0.00289 ml	0.00289
-calibration (flask)	10 ml	0.04 ml	$\sqrt{6}$	0.01633 ml	0.00163
-temperature (flask)	10 ml	0.05 ml	$\sqrt{3}$	0.02887 ml	0.00289
-calibration (pipette)	0.1 ml	0.000425 ml	2	0.00021 ml	0.00213
-temperature (pipette)	0.1 ml	0.0005 ml	$\sqrt{3}$	0.00029 ml	0.00289
-calibration (pipette)	0.9 ml	0.005 ml	2	0.00250 ml	0.00278
-temperature (pipette)	0.9 ml	0.0045 ml	$\sqrt{3}$	0.00260 ml	0.00297
Combined Standard Uncertainty					0.00988
Method precision					
- Repeatability	0.1 mg/kg	0.00320 mg/kg	1	0.00320 mg/kg	0.032000
Bias	119.6%	2.65%	$\sqrt{24}$	0.54093%	0.004523
- Recovery					
Combined Relative Standard Uncertainty $u_c(X)/X$					0.036328

การคำนวณหาค่าความไม่แน่นอนขยาย (Expanded Uncertainty) จากตารางที่ 2 พบค่า Combined Relative Standard Uncertainty ($u_c(X)/X$) มีค่าเป็น 0.036 ในกรณีตัวอย่างตรวจพบสาร chlorpyrifos ปริมาณ 0.05 mg/kg ได้ค่า $u_c(x) = 0.036 \times 0.05 = 0.002$ mg/kg จากนั้นขยายความไม่แน่นอนมาตรฐานด้วยการคูณด้วยค่า Coverage factor, k ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% Expanded Uncertainty at Confidence Interval (C.I.) 95% ($k=2$) จะได้ $U(x) = 2 \times 0.002 = 0.004$ mg/kg สำหรับขั้นตอนการรายงานค่าความไม่แน่นอน ตัวอย่างการรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ เช่น พบ chlorpyrifos 0.05 ± 0.004 mg/kg (ที่ระดับความเชื่อมั่นประมาณ 95%, $k=2$) โดยค่าความไม่แน่นอนที่รายงานมีค่าคิดเป็นร้อยละ 8

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดการวิเคราะห์สาร chlorpyrifos ในผักและผลไม้ ตามแนวทางของ ISO GUM พบสัดส่วนค่าความไม่แน่นอนจากแหล่งความไม่แน่นอนที่ส่งผลต่อปริมาณสาร chlorpyrifos ที่

เป็นองค์ประกอบหลัก 3 องค์ประกอบ เรียงจากมากไปน้อย ได้แก่ Method precision (48.2%) Sample taken (17.7%) และ Standard concentration (14.9%) ส่วนองค์ประกอบอื่นๆ เช่น Sample weight (8.7%) Bias (6.8%) Final volume (3.6%) และ C_0 (0.1%) คิดเป็นสัดส่วนน้อยกว่าร้อยละ 10 ดังแสดงในภาพที่ 4 โดยเกณฑ์ความสมเหตุสมผลของค่าความไม่แน่นอนสามารถพิจารณาได้ 2 กรณี ได้แก่ กรณีที่ 1 ต้องมีค่าน้อยกว่า $2 \times SD$ โดย Predicted SD ได้จาก Horwitz Equation Modified by Thompson⁽¹⁹⁾ เมื่อ Concentration Ratio < 120 $\mu\text{g/kg}$ ใช้สูตร $SD = 0.22 \times C$ เมื่อ C คือ Concentration Ratio ที่ต้องการรายงาน หรือเท่ากับ $2 \times 22 = 44\%$ หรือกรณีที่ 2 ใช้ค่า Default Expanded Measurement Uncertainty ของ SANTE/11312/2021 (V2) ที่กำหนดไว้ว่า ห้ามเกิน 50% เมื่อพิจารณาพบว่าค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% มีค่าน้อยกว่าเกณฑ์ยอมรับทั้ง 2 กรณี แสดงว่าการประมาณค่าความไม่แน่นอนดังกล่าว มีความสมเหตุสมผล



ภาพที่ 4 สัดส่วนองค์ประกอบแหล่งความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์สาร chlorpyrifos ในผักและผลไม้ โดยวิธี ISO GUM

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดแนวทาง Top-down โดยใช้ Intra-laboratory QC data

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดวิธีนี้พิจารณาจากข้อมูลการวิเคราะห์ภายในห้องปฏิบัติการในส่วนของ Bias และ Precision ซึ่งถือเป็นสัดส่วนที่

สำคัญที่สุด โดยทั่วไปพบว่ามีความมากกว่า 1 ใน 3 ของค่าความไม่แน่นอนทั้งหมด อย่างไรก็ตามที่มาของความไม่แน่นอนที่อาจมาจากแหล่งอื่นๆ เช่น ความไม่แน่นอนเดียวกันของตัวอย่าง และความไม่แน่นอนจากสารมาตรฐานที่ใช้วิเคราะห์จะถูกพิจารณาว่าแหล่งเหล่านี้

ได้ถูกรวมไว้ในการวิเคราะห์แล้ว ในที่นี้จะพิจารณาเฉพาะค่า Bias และ Precision เท่านั้น ค่าความไม่แน่นอนที่คำนวณได้ มาจากการขยายความไม่แน่นอนมาตรฐานด้วยการคูณด้วยค่าคงที่ Coverage Factor, k ที่ระดับ

ความเชื่อมั่น 95% Expanded Uncertainty at C.I. 95% ($k = 2$) ดังสมการที่ 1 โดยสัญลักษณ์ ($'$) หมายถึงค่าความไม่แน่นอนที่ถูกดัดแปลงให้เหลือแหล่งที่มาเพียง 2 แหล่ง คือ Bias และ Precision เท่านั้น

$$U' = k \times u' \quad \text{สมการที่ 1}$$

$$u' = \sqrt{u'(bias)^2 + u'(precision)^2} \quad \text{สมการที่ 2}$$

เมื่อ $u' =$ measurement uncertainty

$u'(bias) =$ Uncertainty Component จาก Bias

$u'(precision) =$ Uncertainty Component จาก Precision

โดยทั่วไปนั้น $u'(bias)$ จะคำนวณโดยใช้ Uncertainty จากวัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified Reference Material; CRM) แต่ในทางปฏิบัติวัสดุที่เป็น CRM ที่มี Analyte และ Matrix ตรงกับขอบข่ายที่ต้องการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด/การวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในผักและผลไม้ นั้น ห้องปฏิบัติการไม่สามารถจัดหาได้ เนื่องจากเป็นข้อจำกัดของผู้ผลิตในการให้ความเชื่อมั่นระยะเวลาความคงตัวของวัสดุที่เป็นของสดเน่าเสียง่าย ทำให้ไม่มีวัสดุอ้างอิงรับรองจำหน่ายในท้องตลาดที่ครอบคลุมสารที่สนใจทั้งหมดได้ ดังนั้นการประมาณค่าความไม่แน่นอน

ของการวัด/การวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชจะสามารถทำได้โดยใช้ข้อมูล Bias และ Precision จากการทดสอบความใช้ได้ของวิธีและข้อมูลการควบคุมคุณภาพภายใน

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดจาก Bias, $u'(bias)$

กรณีที่ 1 ไม่มีการปรับแก้ Recovery (Estimation of the $u'(bias)$ component without correction for recovery) จะใช้ในกรณีที่ Expanded Uncertainty น้อยกว่า 50% Relative Bias คำนวณได้จากสมการที่ 3 และ $u'(bias)$ คำนวณได้จากสมการที่ 4

$$\text{Relative Bias (\%)} = \frac{(\text{measured concentration} - \text{spiked concentration})}{(\text{spiked concentration})} \times 100\% \quad \text{สมการที่ 3}$$

$$u'(bias) = \sqrt{\text{RMS}'(bias)^2 + u'(C_{ref})^2} \quad \text{สมการที่ 4}$$

เมื่อ $\text{RMS}'(bias) =$ root mean square of the relative bias

$$= \sqrt{\frac{\sum bias_i^2}{n}} = \sqrt{\text{mean}_{bias}^2 + \text{SD} \cdot P_{bias}^2}$$

$\text{mean}_{bias} =$ Mean of the Relative Bias

$\text{SD} \cdot P_{bias} =$ Population SD of the Relative Bias (สูตร stdev.p ใน Excel)

$u'(C_{ref}) =$ Uncertainty of the Spiked Concentration เมื่อมีค่าน้อยหากเปรียบเทียบกับ Bias และ Precision จึงสามารถนำออกจากสมการที่ 4 ได้ จึงเหลือสมการที่ 5

$$u'(bias) = \sqrt{\text{mean}_{bias}^2 + \text{SD} \cdot P_{bias}^2} \quad \text{สมการที่ 5}$$

กรณีที่ 2 มีการปรับแก้ Recovery (Estimation of the u' (bias) component with correction for recovery) กรณี Expanded Uncertainty มากกว่า 50%

$$u'(\text{bias}) = \sqrt{\left(\frac{\text{RSD}_{\text{wR}}}{\sqrt{n}}\right)^2 + u'(\text{Cref})^2} \quad \text{สมการที่ 6}$$

เมื่อ RSD_{wR} = Within-laboratory reproducibility of the recovery
 n = Number of recovery tests
 $u'(\text{Cref})$ = Uncertainty of the spiked concentration เมื่อมีค่าน้อยหากเปรียบเทียบกับ Bias และ Precision จึงสามารถนำออกจากสมการที่ 6 ได้ จึงเหลือสมการที่ 7

$$u'(\text{bias}) = \frac{\text{RSD}_{\text{RW}}}{\sqrt{n}} \quad \text{สมการที่ 7}$$

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดจาก Precision, $u'(\text{precision})$
 คำนวณได้จากสมการที่ 8

$$u'(\text{precision}) = \text{RSD}_{\text{rw}} \quad \text{สมการที่ 8}$$

เมื่อ RSD_{rw} = Within-laboratory reproducibility

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดรวม คำนวณจากสมการที่ 9

$$u' = \sqrt{\text{mean}_{\text{bias}}^2 + \text{SD} \cdot P_{\text{bias}}^2 + \text{RSD}_{\text{rw}}^2} \quad \text{สมการที่ 9}$$

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดการวิเคราะห์ chlorpyrifos ในผักและผลไม้โดย Intra-laboratory QC data โดยยกตัวอย่างข้อมูลการควบคุมคุณภาพภายใน (Internal Quality Control, IQC) โดยการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงจากการทดสอบ spiked sample ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 mg/kg แล้วคำนวณ Recovery ในชนิดตัวอย่างผักและผลไม้ที่มีความหลากหลายครอบคลุมทุก commodity ช่วงเวลา

ตั้งแต่วันที่ 3 สิงหาคม พ.ศ. 2565 ถึง วันที่ 11 ธันวาคม พ.ศ. 2567 ในแต่ละชุดการทดสอบ (batch) ประจำวัน ซึ่งเป็นข้อมูลที่ได้จากห้องปฏิบัติการในการวิเคราะห์จริง ความเข้มข้นของ chlorpyrifos ที่วิเคราะห์ได้มีค่าตั้งแต่ 0.041–0.058 mg/kg คิดเป็น Recovery 82.0–116.0% จำนวนผลการวิเคราะห์ (n) ทั้งสิ้น 28 ข้อมูล นำข้อมูลเหล่านี้มาคำนวณผล ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ข้อมูลการควบคุมคุณภาพภายใน (Intra-laboratory QC data) สำหรับการคำนวณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ chlorpyrifos ผักและผลไม้ด้วยวิธี QueChERS (ต่อ)

n	Date	Spiked at 0.05 mg/kg		Relative bias (%)
		Vegetables and fruits	Measured (mg/kg)	
1	3 Aug 2022	Orange	0.046	-8
2	7 Sep 2022	Peas	0.053	6
3	4 Oct 2022	Garlic	0.050	0
4	23 Dec 2022	Cherry	0.056	12
5	20 Feb 2023	Mango	0.047	-6
6	5 May 2023	Beetroot	0.045	-10
7	19 Feb 2023	Water melon	0.058	16
8	7 Nov 2023	Broccoli	0.044	-12
9	13 Nov 2023	Chinese broccoli	0.047	-6
10	16 Nov 2023	Mushroom	0.046	-8
11	1 Dec 2023	Banana	0.048	-4
12	5 Jan 2024	Cabbage	0.045	-10
13	18 Jan 2024	Agasta	0.055	10
14	29 Jan 2024	Stawberry	0.049	-2
15	6 Mar 2024	Potato	0.042	-16
16	29 Apr 2024	Lettuce	0.042	-16
17	29 Apr 2024	Rose apple	0.052	4
18	25 Jun 2024	Spring onion	0.044	-12
19	15 Jul 2024	Shallot	0.046	-8
20	5 Aug 2024	Apple	0.050	0
21	11 Sep 2024	Durian	0.046	-8
22	22 Oct 2024	Peach	0.064	28
23	6 Nov 2024	Spinach	0.051	2
24	8 Nov 2024	Grapes	0.049	-2
25	26 Nov 2024	Apple	0.041	-18
26	11 Dec 2024	Celery	0.049	-2
27	11 Dec 2024	Grapes	0.041	-18
28	11 Dec 2024	Green pea	0.044	-12
n			28	
mean			0.048	-3.57
SD Pbias (stdev.p) (%)				10.574
SD measured (mg/kg) (stdev.s)			0.005	
RSDwR (%)			11.167	
กรณี 1	u' (bias) (%) (Without correction recovery)			11.161
	u' (precision) = RSDwR (%)		11.167	
	u' combined (%)		15.789	
	U' (Expanded MU) (%) (k = 2)		31.577	
กรณี 2	u' (bias) (%) (With correction recovery)			2.110
	u' (precision) = RSDwR (%)		11.167	
	u' combined (%)		11.365	
	U' (Expanded MU) (%) (k = 2)		22.730	

ในการรายงานค่าความไม่แน่นอน เนื่องจากมีการกระจายตัวของผลการทดสอบ QC ในช่วงระยะเวลาหนึ่งสูง ทำให้ Expanded Standard Uncertainty มีค่าสูง แต่ยังต่ำกว่าร้อยละ 50 ในกรณีที่ 1 ร้อยละ 31.6 ในกรณีที่ไม่มี Recovery correct หากพิจารณากรณีที่ 2 ค่ารวมโดยมีการ Recovery correct จะทำให้ Expanded Standard Uncertainty มีค่าต่ำลงเป็นร้อยละ 22.7 เมื่อพิจารณาใช้ค่า Default Uncertainty Value กำหนดโดย SANTE/11312/2021 ที่ร้อยละ 50 ทั้ง 2 กรณี อยู่ในเกณฑ์ความสมเหตุสมผล ตัวอย่างการรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ เช่น พบ chlorpyrifos 0.05 mg/kg Expanded Uncertainty 31.6% = $0.05 \times 31.6/100 = 0.016$ mg/kg จึงรายงาน

พบ chlorpyrifos 0.05 ± 0.016 mg/kg (ที่ระดับความเชื่อมั่นประมาณ 95%, $k = 2$)

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดแนวทาง Top-down โดยใช้ PT Data

การวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชแบบ Multi-residue Method ที่ใช้กับเนื้อตัวอย่างผักและผลไม้ (Matrix) ที่หลากหลาย การคำนวณ MU ของสารใดสารหนึ่งอาจจะเป็นไปได้หรือไม่ได้หรือเป็นไปได้ยาก เนื่องจากขาดข้อมูล Bias ที่ตรงกับ Matrix นั้น ๆ การคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายสามารถใช้ Within-laboratory Reproducibility โดยนำข้อมูล Relative Standard Deviation มาพิจารณาร่วมกับข้อมูล PT ซึ่งเป็น Laboratory Bias พิจารณาจากสมการที่ 10

$$u' = \sqrt{u'(\text{bias})^2 + u'(\text{RSD}_{\text{WR}})^2} \quad \text{สมการที่ 10}$$

เมื่อ $u' = \text{Combined Standard Uncertainty}$

$u'(\text{RSD}_{\text{WR}}) = \text{Within-laboratory Reproducibility}$

$u'(\text{bias}) = \text{Uncertainty Component ที่มาจากวิธีที่ใช้และความเปี่ยงเบนของห้องปฏิบัติการในการเข้าร่วม PT}$

การคำนวณ $u'(\text{RSD}_{\text{WR}})$ สามารถใช้ข้อมูล Recovery ที่ได้จากการควบคุมคุณภาพในระยะยาว เพื่อสะท้อนพฤติกรรมธรรมชาติของการวิเคราะห์ นอกจากนี้แล้วยังสามารถนำข้อมูลจากการทดสอบความใช้ได้ของวิธีมาพิจารณาร่วมได้แต่จะได้ข้อมูลที่มีความเที่ยงน้อยเกินไป โดยต้องใช้จำนวนข้อมูลอย่างน้อย 31 ข้อมูล ใช้ข้อมูล Relative Standard Deviation มาประกอบการพิจารณา ในกรณีห้องปฏิบัติการสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ทำการทดสอบความแม่นยำจาก Recovery และเข้าร่วม PT ขอบข่ายจำนวนสาร 250 ชนิด วิเคราะห์โดย GC-MS/MS 106 ชนิด และ LC-MS/MS 144 ชนิด โดยวิธีเดียวกัน สำหรับข้อมูล QC ที่เก็บมาในระยะยาว กำหนดเกณฑ์ยอมรับที่ร้อยละ 70-120% วิเคราะห์ที่ระดับ 0.05 mg/kg ทดสอบ

ใน Matrix ที่หลากหลายตามชนิดตัวอย่างที่วิเคราะห์ในงานประจำ

$u'(\text{bias})$ คำนวณจากความสามารถของห้องปฏิบัติการในการเข้าร่วมการทดสอบความชำนาญ โดยใช้ข้อมูลจำนวนไม่น้อยกว่า 31 ข้อมูล⁽⁶⁾ มาใช้ในการคำนวณ ใช้ข้อมูลการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญกับ FAPAS[®] 3 รอบ ได้แก่ FAPAS[®] 19366 beetroot puree, FAPAS[®] 19341 peas with pods puree, และ FAPAS[®] 19313 cucumber puree มี data point รวมทั้งสิ้น 33 ข้อมูล นอกจากปริมาณสารที่รายงานแล้วยังมีข้อมูลที่ต้องใช้สำหรับการคำนวณ ได้แก่ Assigned Value หรือ Median การกระจายตัวของข้อมูลในรูปของ Robust Standard Deviation หรือ Qn และจำนวนห้องปฏิบัติการที่รายงานปริมาณสารนั้น ๆ ข้อมูลแสดงในตารางที่ 3

$u'(bias)$ คำนวณได้จากสมการที่ 11

$$\sqrt{u'(bias)} = \sqrt{RMS_{bias}^{'2} + u'(C_{ref})^2} \quad \text{สมการที่ 11}$$

RMS'_{bias} = Root Mean Square of the Relative Bias, คำนวณได้จากสมการที่ 12 นำข้อมูล QC จากตารางที่ 3 มาคำนวณ โดย $m = 33$ จะได้

$$RMS'_{bias} = \sqrt{\sum \frac{(bias_i')^2}{m}} = \sqrt{\frac{3406.61}{33}} = 10.16\% \quad \text{สมการที่ 12}$$

$u'(C_{ref})$ คำนวณได้จากการเข้าร่วม PT หลายรอบ โดยการนำค่า sum ของ Qn หาด้วยรากที่ 2 ของจำนวนผลการวิเคราะห์ที่รายงานโดยห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วม หาด้วยจำนวนผลการวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการเอง นำจำนวนดังกล่าวมาคูณด้วย factor 1.25 ตาม ISO 13528:2022⁽²⁰⁾ ดังสมการที่ 13 แทนที่ด้วยข้อมูลจากตารางที่ 4

$$u'(C_{ref}) = \frac{\sum_i \frac{Qn}{\sqrt{No.}}}{m} \times 1.25 = \frac{155.65}{33} \times 1.25 = 5.90\% \quad \text{สมการที่ 13}$$

$$u'(bias) = \sqrt{RMS_{bias}^{'2} + u'(C_{ref})^2} = \sqrt{10.16^2 + 5.90^2} = 11.75\%$$

Relative Standard Deviation (RSD) ของ % Recovery ของห้องปฏิบัติการโดยใช้ข้อมูล QC 28 ค่า จากตารางที่ 4 มีค่าเป็น 11.17% ดังนั้น $u'(RSD_{wR})$ จึงใช้ค่า 10.77%

$$u' = \sqrt{u'(bias)^2 + u'(RSD_{wR})^2} = \sqrt{11.75^2 + 11.17^2} = 16.2\%$$

$$U' = k \times u'$$

$$U' = 2 \times 16.2 = 32.4\%$$

ตารางที่ 4 การคำนวณค่าความไม่แน่นอนของการวัดโดยใช้ PT Data

PT Round	m	Pesticides	X_i (mg/kg)	X_{pt} (mg/kg)	Bias' _i (%)	$(Bias'_i)^2$	Qn (σ_{pt})	Qn (ratio)	No. Results	$\sqrt{No.}$	$\frac{Qn}{\sqrt{No.}}$
FAPAS 19366	1	azinphos-methyl	0.0756	0.0630	20.00	400.00	0.01390	22.06	10	3.162	6.977
beetroot puree	2	azoxystrobin	0.0627	0.0630	-0.48	0.23	0.01390	22.06	12	3.464	6.369
	3	boscalid	0.0433	0.0360	20.28	411.19	0.00792	22.00	10	3.162	6.957
	4	carbofuran	0.0248	0.0300	-17.33	300.44	0.00660	22.00	11	3.317	6.633
	5	epoxiconazole	0.0915	0.0790	15.82	250.36	0.01740	22.03	11	3.317	6.641
	6	fipronil	0.0403	0.0411	-1.95	3.79	0.00904	22.00	11	3.317	6.632
	7	phosphamidon	0.0393	0.0460	-14.57	212.15	0.01010	21.96	9	3.000	7.319
	8	propoxur	0.0779	0.0754	3.32	10.99	0.01660	22.02	11	3.317	6.638
	9	pyridaben	0.0623	0.0655	-4.89	23.87	0.01440	21.98	12	3.464	6.346
	10	trifloxystrobin	0.1175	0.1100	6.82	46.49	0.02430	22.09	10	3.162	6.986

ตารางที่ 4 การคำนวณค่าความไม่แน่นอนของการวัดโดยใช้ PT Data (ต่อ)

PT Round	m	Pesticides	x_i (mg/kg)	x_{pt} (mg/kg)	Bias' _i (%)	(Bias' _i) ²	Qn (σ_{pt})	Qn (ratio)	No. Results	$\sqrt{\text{No.}}$	Qn $\sqrt{\text{No.}}$		
FAPAS	11	cypermethrin	0.1200	0.1250	-4.00	16.00	0.02740	21.92	20	4.472	4.901		
19341	12	diazion	0.0317	0.0344	-7.85	61.60	0.00756	21.98	22	4.690	4.685		
peas with	13	etofenprox	0.0646	0.0744	-13.17	173.50	0.01640	22.04	21	4.583	4.810		
Pods puree	14	fenitrothion	0.0513	0.0506	1.38	1.91	0.01110	21.94	16	4.000	5.484		
	15	fenvalerate	0.1160	0.1120	3.57	12.76	0.02470	22.05	18	4.243	5.198		
	16	heptachlor	0.0603	0.0519	16.18	261.95	0.01160	22.35	16	4.000	5.588		
	17	methidathion	0.0577	0.0603	-4.31	18.59	0.01330	22.06	17	4.123	5.349		
	18	monocrotophos	0.0308	0.0273	12.82	164.37	0.00601	22.01	19	4.359	5.051		
	19	pyrimethanil	0.0481	0.0430	11.86	140.67	0.00945	21.98	22	4.690	4.685		
	20	triadimenol	0.1036	0.0951	8.94	79.89	0.02090	21.98	21	4.583	4.796		
	21	trifloxystrobin	0.0472	0.0420	12.38	153.29	0.00925	22.02	21	4.583	4.806		
FAPAS	22	boscalid	0.1194	0.1190	0.34	0.11	0.02620	22.02	69	8.307	2.651		
19313	23	buprofezin	0.1100	0.1260	-12.70	161.25	0.02740	21.75	69	8.307	2.618		
cucumber	24	chlorpyrifos	0.0322	0.0309	4.21	17.70	0.00679	21.97	70	8.367	2.626		
puree	25	endosulfan-sulfate	0.0171	0.0186	-8.06	65.04	0.00408	21.94	62	7.874	2.786		
	26	fenhexamid	0.0735	0.0679	8.25	68.02	0.01490	21.94	64	8.000	2.743		
	27	fludloxonil	0.0718	0.0680	5.59	31.23	0.01500	22.06	65	8.062	2.736		
	28	flusilazole	0.0706	0.0662	6.65	44.18	0.01460	22.05	68	8.246	2.674		
	29	imazalil	0.0234	0.0220	6.36	40.50	0.00485	22.05	65	8.062	2.734		
	30	methamidophos	0.0632	0.0692	-8.67	75.18	0.01520	21.97	52	7.211	3.046		
	31	oxamyl	0.1222	0.1200	1.83	3.36	0.02630	21.92	64	8.000	2.740		
	32	profenofos	0.0378	0.0344	9.88	97.69	0.00757	22.01	68	8.246	2.669		
	33	quinalphos	0.0451	0.0419	7.64	58.33	0.00922	22.00	63	7.937	2.772		
$\sum(\text{bias}'_i)^2$					=	3406.16	$\sum \frac{\text{Qn}}{\sqrt{\text{No.}}}$					=	155.65
No of Results (m)					=	33	$\frac{\sum \frac{\text{Qn}}{\sqrt{\text{No.}}}}{\text{m}} \times 1.25$					=	5.90
$\sqrt{\frac{\sum(\text{bias}'_i)^2}{\text{m}}}$					=	10.16							

ในการรายงานค่าความไม่แน่นอน เนื่องจากมีการกระจายตัวของผลการเข้าร่วมการทดสอบความชำนาญ ในช่วงระยะเวลาหนึ่งมีค่าสูง ทำให้ Expanded Uncertainty มีค่าสูง ($U' = 32.4\%$) ห่างจากค่า Default Uncertainty Value กำหนดโดย SANTE/11312/2021 ที่ 50% ไม่มาก และสูงกว่าค่าที่ได้จากการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดวิธี ISO GUM มาก แต่พบว่ามีค่าใกล้เคียงกับวิธีที่ใช้ค่า QC ตัวอย่างการรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ เช่น พบ chlorpyrifos 0.05 mg/kg Expanded Uncertainty $32.4\% = 0.05 \times 32.4 / 100 = 0.016$ mg/kg จึงรายงานค่า พบ chlorpyrifos 0.05 ± 0.016 mg/kg (ที่ระดับความเชื่อมั่นประมาณ 95%, $k = 2$)

เมื่อกำหนดปริมาณความเข้มข้นของสาร chlorpyrifos ตกค้างในผักและผลไม้เป็นที่ต้องรายงานเป็น 0.05 mg/kg ค่าความไม่แน่นอนที่คำนวณได้จากแนวทางต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 5 โดยแนวทางการประมาณค่าความไม่แน่นอนในการศึกษาครั้งนี้ทั้ง 3 แนวทาง ได้แก่ 1) แนวทาง Bottom-up หรือ ISO GUM, 2) แนวทาง Top-down โดยใช้ QC data และ 3) แนวทาง Top-down โดยใช้ PT data ให้ค่า Expanded Uncertainty (U) ที่คำนวณได้มีค่าเป็น 8.0, 31.7 และ 32.4% ตามลำดับ เมื่อนำปริมาณความเข้มข้นที่กำหนด (0.05 mg/kg) ไปคำนวณโดยใช้ Horwitz's equation จากสมการที่ 14 จะได้ Expanded Uncertainty (U) สูงสุดไม่เกิน RSD (%) ที่ 33.2% และหากใช้ Horwitz's equation

modified Thompson ดังสมการที่ 15 และ 16 สำหรับความเข้มข้นน้อยกว่า 0.12 mg/kg จะได้ Expanded Uncertainty (U) สูงสุดไม่เกิน RDS (%) ที่ 44.0%

อย่างไรก็ตาม Expanded Uncertainty (U) ทั้ง 5 กรณีข้างต้นยังคงมีค่าน้อยกว่า default value ของสหภาพยุโรปที่กำหนดไว้เป็น 50%

$$RSD (\%) = 2^{(1-0.5 \cdot \log C)}$$

สมการที่ 14

$$RSD (\%) = 0.02c^{0.8495} \text{ เมื่อ } c \geq 0.12 \text{ mg/kg}$$

สมการที่ 15

$$RSD (\%) = 0.22c \text{ เมื่อ } c < 0.12 \text{ mg/kg}$$

สมการที่ 16

ตารางที่ 5 ผลการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดสาร chlorpyrifos ในผักและผลไม้ของแต่ละแนวทาง

วิธี	u (%)	U (%)	การรายงานผล (mg/kg)
Bottom-up approach, ISO GUM ⁽⁴⁾	4.0	8.0	0.05±0.004
Top-down approach, QC data ⁽¹¹⁾	15.8	31.7	0.05±0.016
Top-down approach, PT data ⁽¹¹⁾	16.2	32.4	0.05±0.016
Horwitz's equation	16.6	33.2	0.05±0.017
Horwitz's equation modified Thompson ⁽¹⁹⁾	22.0	44.0	0.05±0.022
SANTE/11312/2021 (V2)	25.0	50.0	0.05±0.025

วิจารณ์

ความไม่แน่นอนของการวัด (Measurement Uncertainty) เป็น “Nonnegative parameters” ที่แสดงถึงการกระจายตัวของค่าปริมาณที่วัดได้ โดยเอกสารฉบับแรกที่ระบุแนวทางการประมาณค่าดังกล่าวคือ Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement หรือ GUM ซึ่งตีพิมพ์เมื่อ พ.ศ. 2536 เอกสารนี้จัดทำขึ้นโดยความร่วมมือระหว่างคณะทำงานจากหลายหน่วยงานเช่น The Bureau International des Poids et Mesures (BIPM), International Organization of Legal Metrology (OIML), International Electrotechnical Commission (IEC) และ International Organization for Standardization (ISO) ดำเนินการโดยนักฟิสิกส์และใช้แนวทางด้านมาตรวิทยาทางฟิสิกส์ เป็นคู่มือการคำนวณหาความไม่แน่นอนของการวัดที่เป็นที่รู้จักและนำไปประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลายมากที่สุด เป็นวิธีการที่รวบรวมแหล่งที่มาของความไม่แน่นอนทุกแหล่งที่ส่งผล

กระทบถึงปริมาณค่าที่วัดได้ ค่าความไม่แน่นอนที่รายงานควบคู่กับปริมาณที่วัดได้จะต้องมีการระบุระดับความเชื่อมั่นประกอบด้วยเสมอ เนื่องจากความไม่แน่นอนนี้จะถูกนำไปใช้งานในกรณีที่ต้องการตัดสินใจกับเกณฑ์ต่างๆ เช่น ความสอดคล้องกับค่ากำหนด ผ่านหรือไม่ผ่านยอมรับหรือปฏิเสธ ซึ่งจะต้องมีกระบวนการตัดสินใจตาม Decision Rules ที่กำหนดไว้ล่วงหน้าแล้ว ค่าความไม่แน่นอนขยาย (U) เป็นช่วงที่ใช้ประกอบการตัดสินใจได้จากการคูณความไม่แน่นอนมาตรฐาน (u_c) กับค่าคงตัวค่าหนึ่ง (k) ซึ่งเป็นค่าที่ถูกกำหนดตามระดับความเชื่อมั่น โดยทั่วไปจะเลือกใช้ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ค่า $k = 1.96$ หรือเพื่อความสะดวกมักใช้ $k = 2$ ในการคำนวณ ต่อมาในปี พ.ศ. 2550 หน่วยงาน Eurolab ได้ออกเอกสาร Technical Report 1/2007⁽⁶⁾ ระบุวิธีการในการประมาณค่าความไม่แน่นอนเพิ่มเติมจากแนวทางเดิม ได้แก่ Single Laboratory Validation (including quality control), Interlaboratory Comparisons และ External Quality Assessment

(EQA) หรือ Proficiency Testing (PT) ซึ่ง 2 วิธีนี้เป็นแนวทางที่แตกต่างจาก GUM โดย Dybkaer⁽²¹⁾ ซึ่งเป็นผู้ดำรงตำแหน่งประธานคณะกรรมการบริหารของ The International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) ในขณะนั้นได้ให้ความเห็นไว้ว่า แนวทางของ Eurochem⁽⁴⁾ นี้เป็นการทำให้วิธีการของ GUM ที่ยุ่งยากซับซ้อน มีขั้นตอนการดำเนินงานมากและใช้เวลานาน กลายเป็นวิธีการที่ง่ายขึ้น สามารถนำไปใช้งานได้จริงในการวิเคราะห์ทางเคมีโดยไม่ต้องใช้ทรัพยากรที่สิ้นเปลือง นอกจากนี้การประยุกต์ใช้วิธีของ GUM อาจไม่เหมาะสมกับการวิเคราะห์ทางเคมี Eurachem⁽⁴⁾ จึงเสนอแนวทางที่จำเพาะสำหรับการวิเคราะห์ทางเคมีซึ่งมีการพิจารณาและคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ในห้องปฏิบัติการที่ทำให้เกิดความไม่แน่นอนขึ้น แนวทางนี้ให้ข้อมูลประกอบการคำนวณที่ดีกว่าและครอบคลุมปัจจัยต่าง ๆ มากกว่าวิธีเดิม

แนวทางการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดที่ใช้ข้อมูลการควบคุมคุณภาพภายใน (IQC) เป็นแนวทางที่มุ่งเน้นปัจจัยหลักที่สำคัญที่สุด คือ ความเียงเบนจากค่าจริง (Bias) และความเที่ยง (Precision) ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ข้อมูลจากการควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์โดยการศึกษาคืน Recovery จาก Spiked samples ในตัวอย่างที่มีความหลากหลาย เป็นตัวอย่างที่เป็นตัวแทนตัวอย่างจริงที่ห้องปฏิบัติการได้รับ ทำการรวบรวมข้อมูลในช่วงระยะเวลาหนึ่ง ทำให้ได้ข้อมูลที่ใกล้เคียงกับการทำงานในชีวิตจริงมากที่สุด ทั้งนี้มีการพิจารณาจาก Bias แต่เป็นที่ทราบว่าการปฏิบัติการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชไม่สามารถศึกษาตัวอย่างที่เป็น CRM ที่มีค่าจริงประกอบกับค่าความไม่แน่นอนได้ จึงปรับเปลี่ยนไปใช้ค่าปริมาณที่เติมในตัวอย่าง (Spiked concentration) แทนค่าอ้างอิง แต่ต้องตระหนักว่าการใช้ข้อมูล QC นี้ อาจจะได้ค่าความไม่แน่นอนที่น้อยกว่าความเป็นจริงเล็กน้อย เนื่องจากข้อมูล Recovery ที่นำมาคำนวณแล้วแต่มีค่าที่ผ่านเกณฑ์ยอมรับที่ร้อยละ 70-120 ตามเอกสารอ้างอิงทั้งสิ้น หากมีการทดสอบ Recovery แล้วให้ค่าที่ไม่สอดคล้องกับเกณฑ์ดังกล่าว ห้องปฏิบัติการไม่สามารถรายงานผลการวิเคราะห์ได้และต้องทำการวิเคราะห์ใหม่ซ้ำ เมื่อได้ผลการทดสอบใหม่

ที่มีผลการประกันคุณภาพผลการวิเคราะห์ที่ผ่านเกณฑ์ยอมรับจึงจะสามารถนำมาใช้ในการคำนวณได้ในบางกรณี ห้องปฏิบัติการไม่สามารถนำหรือมีข้อมูล QC ในช่วงระยะเวลาที่เหมาะสมมาใช้ในการคำนวณ สามารถใช้ข้อมูลการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงจากการทดสอบความใช้ได้ของวิธีก่อนการเปิดให้บริการได้ แต่การทดสอบลักษณะนี้ใช้ช่วงเวลาสั้นกว่าข้อมูล QC และอาจไม่ครอบคลุมชนิดตัวอย่างในการวิเคราะห์ ค่าความไม่แน่นอนที่ประมาณได้จะมีการกระจายที่แคบกว่าความเป็นจริงได้

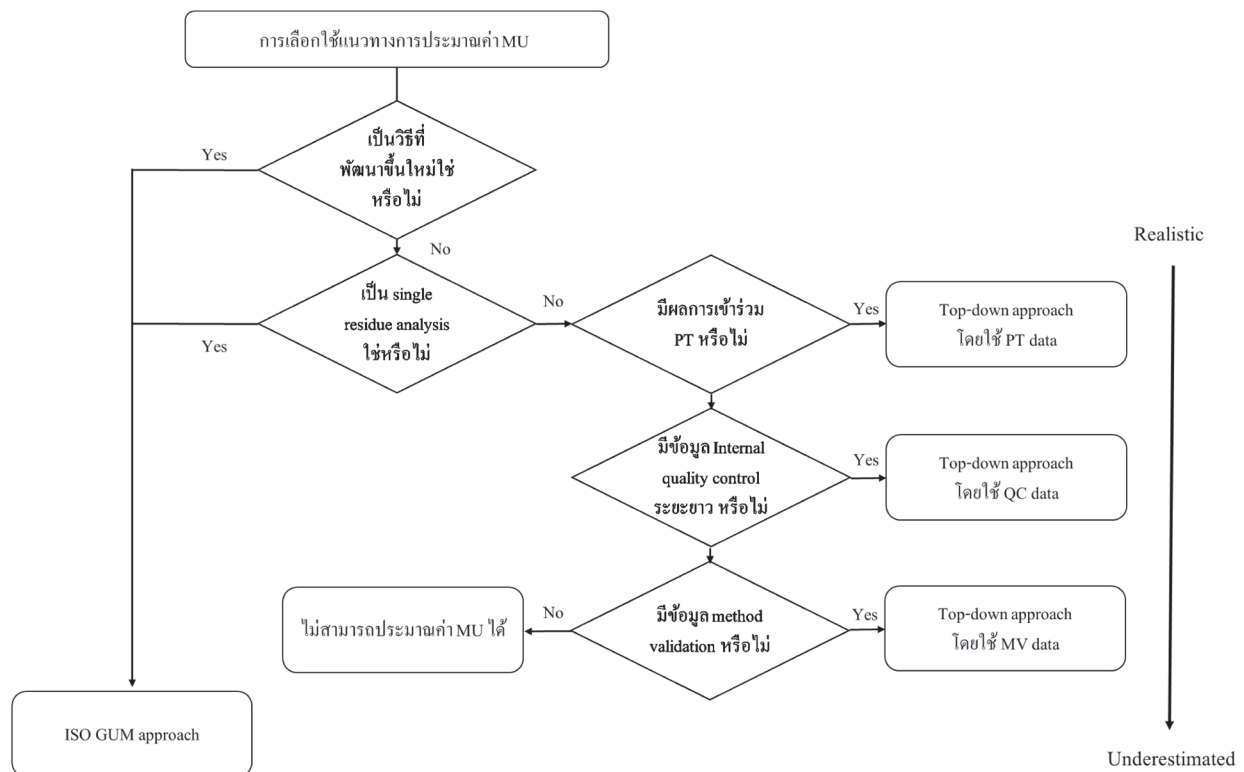
แนวทางการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดที่ใช้ข้อมูลการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญ⁽²²⁾ ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับกลุ่มห้องปฏิบัติการหนึ่ง ๆ เป็นอีกแนวทางหนึ่งในวิธี Top-down เป็นการคำนวณทำนองเดียวกันกับการใช้ข้อมูล QC โดยพิจารณาเฉพาะ Bias และ Precision ส่วนที่แตกต่างจากแบบแรกคือการใช้ค่าอ้างอิงจาก assigned value (x_{pt}) และ standard deviation for proficiency assessment (σ_{pt}) ค่าดังกล่าวอาจไม่ใช่ค่าจริงตามแนวทางของมาตรวิทยา และบางครั้งไม่สามารถสอบกลับไปยัง SI unit ได้ แต่เป็นค่าที่มีการยอมรับกันว่าสามารถใช้เป็นค่าอ้างอิงได้ เช่น การใช้ Consensus value หรือค่าพ้องที่มาจากสมาชิก เช่น Algorithm A, Median หรือมาจากการคำนวณเชิงสถิติอื่น ๆ น้อยครั้งที่ผู้จัดแผน PT ในรายการการทดสอบสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในผักและผลไม้จะใช้ Reference value จากห้องปฏิบัติการเดียว ซึ่งจะจัดในกรณีมีวัตถุประสงค์เฉพาะเท่านั้น แนวทางนี้เป็นการบ่งบอกว่าค่าที่ทดสอบได้จากห้องปฏิบัติการมีการกระจายตัวรอบค่าอ้างอิงมากน้อยเพียงใด ผลการประมาณค่าความไม่แน่นอนของแนวทาง Top-down ทั้ง 2 วิธี ได้แก่ ข้อมูล QC และข้อมูล PT ให้ผลที่สอดคล้องใกล้เคียงกัน $U = 31.7\%$ และ 32.4% ตามลำดับ แสดงถึงการประมาณค่าความไม่แน่นอนที่สมเหตุสมผลและสะท้อนความไม่แน่นอนที่แท้จริงของห้องปฏิบัติการ

เมื่อพิจารณาค่าความไม่แน่นอนที่ได้จากแนวทางต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 5 หากคำนึงถึงเกณฑ์ความสมเหตุสมผลที่ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์สารเคมี

ป้องกันกำจัดศัตรูพืชใช้โดยทั่วไป คือ ร้อยละ 50.0 ตาม SANTE Guideline ค่าที่คำนวณได้มีความสมเหตุสมผลและสามารถใช้สำหรับการรายงานผลได้ในทำนองเดียวกันเมื่อใช้เกณฑ์จาก Horwitz's equation และ Horwitz's Equation Modified Thompson ที่มีการปรับสมการให้ใช้งานง่ายขึ้นได้ค่าที่ 33.2 และ 44.0% ตามลำดับ ผลการคำนวณยังคงมีความสมเหตุสมผลเช่นเดียวกัน โดยมีข้อสังเกตว่าค่าที่ได้จากวิธี ISO GUM มีค่าน้อยมาก และอาจน้อยกว่าความเป็นจริงเมื่อพิจารณาจากพฤติกรรมธรรมชาติการวิเคราะห์ที่ระดับต่ำในชนิดตัวอย่างที่หลากหลาย และอาจไม่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ตัดสินผล การที่วิธีนี้ให้ค่าความไม่แน่นอนน้อยเกิดจากการนำค่า Method Precision ซึ่งโดยปกติแล้วจะเป็นสัดส่วนที่มากที่สุดเมื่อเทียบกับปัจจัยอื่น คำนี้นำจากการทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีในช่วงเวลาสั้น ๆ ในชนิดตัวอย่างเพียงชนิดเดียว ค่าที่ใช้คำนวณจึงน้อยเกินไป และอาจไม่เหมาะสม

ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสำหรับการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผักและผลไม้ แนวทางที่ใช้ประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดแบบ ISO GUM หรือแนวทาง Bottom-up เหมาะสมกับวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ และเป็นการวิเคราะห์แบบสารเดี่ยว (Single-residue Analysis) เท่านั้น แต่ไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้สำหรับการวิเคราะห์แบบ Multi-residue Analysis เนื่องจากมีความยุ่งยากซับซ้อน มีค่าใช้จ่ายสูง ใช้ทรัพยากรมาก และที่ยิ่งไปกว่านั้นแนวทางนี้จะทำให้การประมาณค่าความไม่แน่นอนมีความผิดพลาดไม่สะท้อนความเป็นจริง เพราะมิได้นำแหล่งที่มาทั้งหมดมาพิจารณา ด้วยเหตุผลดังกล่าวการใช้วิธีทางเลือกใหม่ตามแนวทาง Top-down ทั้งโดยการใช้ QC data และ ใช้ PT data จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้ โดยมีข้อมูลเชิงวิชาการสนับสนุนเพียงพอและให้ค่าที่ใกล้เคียงกับความเป็นจริงมากกว่า อย่างไรก็ตามแนวทางการประมาณค่าความไม่แน่นอนที่แต่ละห้องปฏิบัติการเลือกใช้ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์การใช้งานและข้อจำกัด

แนวทางการเลือกใช้วิธีในการประมาณค่าความไม่แน่นอน ดังแสดงในภาพที่ 5 โดยมีความน่าเชื่อถือของผลการประมาณค่าความไม่แน่นอนแตกต่างกันตามข้อมูลที่น่ามาประกอบการคำนวณ หากเป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ และยังไม่มีการควบคุมคุณภาพภายใน หรือผลการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญในช่วงระยะเวลาที่เพียงพอ หรือเป็นวิธีวิเคราะห์สารเดี่ยว Single-residue Analysis ทั้งสองกรณีนี้จำเป็นต้องใช้วิธีของ ISO GUM เป็นการประมาณค่าความไม่แน่นอนเบื้องต้นแต่จะสะท้อนความเป็นจริงน้อยที่สุด เมื่อวิธีมีผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีในช่วงระยะเวลาที่เพียงพอหรือที่เรียกว่า On-going Validation สามารถนำค่าความเที่ยงชนิด Intermediate Precision มาคำนวณค่าความไม่แน่นอนตามวิธี Top-down ได้ และเมื่อใช้วิธีในการวิเคราะห์ในงานประจำโดยมีการเก็บข้อมูลการควบคุมคุณภาพภายในในตัวอย่างที่หลากหลาย จะได้ค่าความไม่แน่นอนที่มาจากตัวอย่างต่างชนิดกันเพิ่มขึ้น ทำให้มีความน่าเชื่อถือเพิ่มขึ้นด้วย สำหรับการประมาณค่าความไม่แน่นอนที่รวบรวมข้อมูลได้ครอบคลุมทุกปัจจัยและครบถ้วนมากที่สุด คือ แนวทาง Top-down ที่ใช้ข้อมูลจากการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญ เพราะนอกจากข้อมูลที่ได้จากภายในห้องปฏิบัติการเองแล้ว ยังมีการเปรียบเทียบผลการทดสอบกับห้องปฏิบัติการอื่นสะท้อน Reproducibility ของวิธีได้อีกด้วย ซึ่งวิธีที่น่าเสนอเป็นวิธีทางเลือกทั้ง 2 วิธีนี้ครอบคลุมความไม่แน่นอนทั้ง 2 ประเภททั้งความไม่แน่นอน Type A ที่สามารถประมาณค่าได้โดยวิธีทางสถิติหรือการทำซ้ำ และความไม่แน่นอน Type B ที่แสดงถึงการสอบกลับได้ทางมาตรวิทยาผ่านการใช้วัสดุอ้างอิงรับรอง อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้คิดรวมค่าความไม่แน่นอนที่จากการชักตัวอย่าง (Sampling) ก่อนที่ตัวอย่างจะถูกส่งเข้าห้องปฏิบัติการ เมื่อนำผลการวิเคราะห์ที่มีค่าความไม่แน่นอนไปใช้ในการตัดสินความสอดคล้องกับเกณฑ์มาตรฐานต่างๆ ต้องพิจารณาอย่างระมัดระวัง เพราะอาจมีผลกระทบต่อผู้มีส่วนได้ส่วนเสียที่เกี่ยวข้องได้



ภาพที่ 5 แผนภูมิ (Flow chart) สำหรับการเลือกใช้แนวทางในการประมาณค่าความไม่แน่นอนวิธีต่างๆ

สรุป

การศึกษาการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด/การวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในผักและผลไม้ พบค่าความไม่แน่นอนขยายสัมพัทธ์ (Relative Expanded Uncertainty) ที่ได้จากการคำนวณ 3 วิธี ได้แก่ 1) วิธี ISO GUM 2) วิธี Top-down ที่ใช้ QC data และ 3) วิธี Top-down ที่ใช้ข้อมูล PT data มีค่าเป็นร้อยละ 8.0, 31.7 และ 32.4 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าอ้างอิงแนะนำตามที่หน่วยงานระหว่างประเทศกำหนดที่ไม่เกินร้อยละ 50 พบว่าการคำนวณทั้ง 3 วิธีให้ค่าน้อยกว่าและสอดคล้องกับค่ากำหนด ทั้งนี้วิธี ISO GUM ให้ค่าน้อยที่สุดและแตกต่างจากวิธี Top-down ทั้ง 2 วิธี ซึ่งมีค่าที่ใกล้เคียงกันมาก หากพิจารณาความสมเหตุสมผลแล้วการรายงานค่าความไม่แน่นอนที่น้อยกว่าร้อยละ 10 เป็นค่าที่น้อยเกินไป ดังนั้นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการรายงานค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในผักและผลไม้ คือ วิธีตามแนวทาง Top-down ซึ่งเป็นวิธีทางเลือกใหม่ทั้งสองวิธี และสามารถนำทั้งสองวิธีไปประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นางวิชาดา จงมีवासนา ผู้อำนวยการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สำหรับการให้คำปรึกษาในการเลือกใช้ค่าต่างๆ ประกอบการคำนวณและการจัดทำต้นฉบับ

เอกสารอ้างอิง

1. Codex Alimentarius Commission Guideline CAC/GL 59-2006, Guidelines on estimation of uncertainty of results. [online]. 2006; [cited 2025 Jan 2]; [16 screens]. Available from: URL: https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXG%2B59-2006%252Fcxg_059e.pdf.
2. ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2017.

3. Alder L, Korth W, Patey AL, van der Schee HA, Schoeneweiss S. Estimation of measurement uncertainty in pesticide residue analysis. *J AOAC Int* 2001; 84(5): 1569–78.
4. Ellison SLR, Williams A, editors. Eurachem/CITAC guide CG 4: Quantifying uncertainty in analytical measurement. 3rd ed. United Kingdom: Eurachem; 2012.
5. Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories, Nordtest NT TR 537 edition 4. [online]. 2017; [cited 2025 Jan 2]; [56 screens]. Available from: URL: https://nordtest.info/images/documents/nt-technical-reports/NT_TR_537_edition4_English_Handbook_for_calculation_of_measurement_uncertainty_in_environmental_laboratories.pdf.
6. EUROLAB Technical Report 1/2007. Measurement uncertainty revised: alternative approaches to uncertainty evaluation. Paris, France: European Federation of National Associations of Measurement, Testing and Analytical Laboratories; 2007.
7. Kilic M. Validation and measurement uncertainty of the determination of 24 elements in drinking water using ICP-MS. *Water Pract Technol* 2023; 18(12): 3299–314.
8. Valverde A, Aguilera A, Valverde-Monterreal A. Practical and valid guidelines for realistic estimation of measurement uncertainty in multi-residue analysis of pesticides. *Food Control* 2017; 71: 1–9.
9. Veiga-del-Bano JM, Cuenca-Martinez JJ, Andreo-Martinez P, Camara MA, Oliva J, Motas M. Uncertainty and associated risks in the analysis of pesticides in homogeneous paprika samples. *Food Chem* 2023; 429: 136963. (7 pages).
10. Ambrus A, Zentai A, Sali J, Ficzer I. Hidden contributors to uncertainty and accuracy of results of residue analysis. *Accredit Qual Assur* 2011; 16(1): 3–11.
11. SANTE 11312/2021 V2. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. [online]. 2024; [cited 2024 Nov 4]; [55 screens]. Available from: URL: https://food.ec.europa.eu/system/files/2023-11/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2021-11312.pdf.
12. Kim SH, Cho H, Heo SW, Hwang E. APMP-APLAC joint proficiency testing programs for elemental analysis in food with metrological reference values: assessment of participants' performance considering measurement uncertainties. *Talanta* 2023; 255: 124184. (13 pages).
13. Hakme E, Herrmann SS, Poulsen ME. European Union Proficiency Tests for pesticide residues in cereals and feedstuff, from 2007 to 2022- Data collection experience. *Food Control* 2023; 152: 109867. (11 pages).
14. BS EN 15662:2018. Foods of plant origin - determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/ partitioning and cleanup by dispersive SPE QuEChERS-method. [online]. 2018; [cited 2024 Nov 4]; [84 screens]. Available from: URL: <https://www.doc88.com/p-9039138664942.html?r=1>.
15. Kanrar B, Mandal S, Bhattacharyya A. Validation and uncertainty analysis of a multiresidue method for 67 pesticides in tea, tea infusion, and spent leaves using ethyl acetate extraction and gas chromatography/mass spectrometry. *J AOAC Int* 2010; 93(2): 411–24.
16. Banerjee K, Oulkar DP, Patil SB, Patil SH, Dasgupta S, Savant R, et al. Single-laboratory validation and uncertainty analysis of 82 pesticides determined in pomegranate, apple, and orange by ethyl acetate extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J AOAC Int* 2008; 91(6): 1435–45.
17. Kilincer M, Ozyurek M. Comparison between top-down and bottom-up approaches in the estimation of measurement uncertainty in

- Bisphenol A analysis by HPLC-FLD. *J Chem Metrol* 2023; 17(2): 225-37.
18. Barwick VJ, Ellison SLR. VAM Project 3.2.1 Development and harmonisation of measurement uncertainty principles Part (d): Protocol for uncertainty evaluation from validation data. Report no. LGC/VAM/1998/088. Middlesex, UK: LGC (Teddington) Limited; 2000.
 19. Thompson M. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. *Analyst* 2000; 125: 385-6.
 20. ISO 13528:2022. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2022.
 21. Dybkaer R. From total allowable error via metrological traceability to uncertainty of measurement of the unbiased result. *Accred Qual Assur* 1999; 4(9): 401-5.
 22. ISO 5725-2. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 2: Basic Method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 1994.
-

Alternatives in Estimation of Measurement Uncertainty in Analysis of Pesticide Residues in Vegetables and Fruits

Weerawut Wittayanan

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

ABSTRACT It is a requirement under ISO/IEC 17025:2017 that laboratories can assess the measurement uncertainty associated with analytical results. Estimating measurement uncertainty (MU) is necessary in pesticide residue analysis to comply with relevant regulations. In this study, three calculation methods in MU estimation were examined. The conventional bottom-up method for MU estimation using the ISO GUM approach was compared with two alternative top-down methods, including the estimation of MU based on intra-laboratory quality control (QC) data and proficiency testing (PT) data. The aim was to determine the method of choice for the estimation of MU in routine reports. The first typical method of MU by the ISO GUM was the conventional method. On the other hand, two alternative top-down methods were used: one using the QC data of 28 spiked samples collected for two years, and the other using the 3-round PT data collected from 33 data points. The results showed the relative expanded uncertainty of the conventional ISO-GUM method and two alternative methods based on QC data and PT data were 8.0, 31.7, and 32.4%, respectively. By comparing with the 50% default value used by international regulatory authorities, all approaches met the requirements to demonstrate that the laboratory's MU did not exceed this value. However, the minimum value obtained from the ISO GUM was different from the two alternative top-down methods, which were comparable. The top-down methods were more appropriate and suitable alternatives for estimating measurement uncertainties.

Keywords: Pesticide residues, Vegetables and Fruits, Measurement Uncertainty, Top-down approach, Bottom-up approach

โคนบีบซีที: ประโยชน์ที่ได้รับกับโอกาสเกิดโรคมะเร็ง ในยุคทันตกรรมดิจิทัล

อรรถพล ขงวิกุล^{1,2} วิราภา เสนารักษ์³ และ สัญญา เรืองสิทธิ์¹

¹แผนกศัลยกรรมช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยกรุงเทพธนบุรี กรุงเทพมหานคร 10170

²แผนกศัลยกรรมช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล โรงพยาบาลศัลยกรรมมาสเตอร์พีช กรุงเทพมหานคร 10300

³แผนกจักษุวิทยา โรงพยาบาลศรีสะเกษ กระทรวงสาธารณสุข อำเภอเมือง ศรีสะเกษ 33000

บทคัดย่อ ในยุคทันตกรรมดิจิทัลการตรวจช่องปากด้วยเครื่องถ่ายภาพโคนบีบซีที (CBCT) เป็นอุปกรณ์ที่ถูกใช้อย่างแพร่หลายและมีราคาแพงมากขึ้น เป็นหนึ่งในวิธีการตรวจที่เป็นมาตรฐานของการวินิจฉัย การรักษา จนถึงติดตามอาการ อย่างไรก็ตามหากไม่มีการควบคุมการใช้งาน และการเรียนรู้ถึงผลกระทบของการใช้งานเกินขอบเขตหรือเกินความจำเป็น ย่อมทำให้เกิดผลเสียต่อผู้ป่วยได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแง่ของการเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็ง บทความนี้จะรวบรวมข้อมูลตั้งแต่ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับรังสีและผลของร่างกายต่อการรับรังสีเอ็กซ์ วิธีการวัดค่ารังสี การป้องกันรังสีไม่ได้รับเกินความจำเป็น แต่ยังเพียงพอต่อการวินิจฉัยและสมเหตุสมผล รวมไปถึงการควบคุมปริมาณรังสี โดยเลือกค่าพารามิเตอร์ตามแต่ละสถานการณ์ ไม่ควรใช้ค่าเดียวในทุกสถานการณ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเด็กและสตรีที่มีโอกาสสะสมรังสีมากกว่า โดยยึดหลัก 3 ประการของการสัมผัสรังสี จากคณะกรรมการระหว่างประเทศด้านการป้องกันรังสี รวมทั้งมีการอธิบายทำความเข้าใจแก่ผู้ป่วยถึงโอกาสการเกิดมะเร็งจากรังสีวินิจฉัยแม้จะน้อยมากก็ตาม และการขอความยินยอมทุกครั้งก่อนผู้ป่วยจะสัมผัสรังสี

คำสำคัญ: โคนบีบซีที, รังสีวินิจฉัย, ทันตกรรมดิจิทัล, มะเร็งศีรษะและลำคอ

Corresponding author E-mail: atapol88@gmail.com

Received: 24 December 2024

Revised: 1 May 2025

Accepted: 27 May 2025

บทนำ

หมุดหมายหนึ่งของการพัฒนาด้านทันตกรรม คือ การตรวจเอกซเรย์คอมพิวเตอร์แบบรังสีรูปกรวยหรือโคนบีมซีที (Cone Beam Computed Tomography: CBCT) โดยเป็นการสร้างภาพสามมิติของโครงสร้างทางกายวิภาคที่มีความละเอียดสูง โดยมีความแม่นยำมากขึ้น และมีการใช้รังสีน้อยกว่าการตรวจเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ทางการแพทย์ (Multi-slice Computed Tomography: MSCT) โคนบีมซีทีพัฒนาในช่วงทศวรรษที่ 1990 เพื่อแก้ไขข้อจำกัดของการถ่ายภาพรังสีสองมิติแบบเดิมที่ใช้ในทันตกรรม ความสามารถในการเห็นโครงสร้างจากมุมต่างๆ และการสร้างภาพสามมิติทำให้โคนบีมซีทีเป็นเครื่องมือสำคัญในการวินิจฉัยและการวางแผนการรักษาที่มีความซับซ้อนมากขึ้น⁽¹⁻³⁾ เทคโนโลยีของโคนบีมซีทีใช้ลำแสงเอกซเรย์แบบกรวย ซึ่งจับภาพหลายภาพรอบๆ ผู้ป่วย ภาพเหล่านี้ถูกประมวลผลเพื่อสร้างข้อมูลเชิงปริมาตร สร้างภาพสามมิติที่มีความละเอียดสูงในบริเวณฟัน กระดูกขากรรไกร และเนื้อเยื่อโดยรอบแตกต่างจากการตรวจเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ทางการแพทย์ ซึ่งใช้ลำแสงรูปพัด (Fan Beam) และปริมาณรังสีที่สูงกว่า ทำให้เป็นตัวเลือกที่ปลอดภัยมากขึ้น^(2,4)

การใช้ในระยะแรกเน้นไปที่กรณีทางทันตกรรมที่ซับซ้อน ซึ่งวิธีการถ่ายภาพแบบสองมิติไม่เพียงพอ แต่เมื่อเวลาผ่านไปการประยุกต์ใช้โคนบีมซีทีได้ขยายไปยังขั้นตอนทางทันตกรรมต่างๆ ไป เช่น การฝังรากเทียม การรักษาคอลงรากฟัน การผ่าตัดช่องปากและใบหน้า และการประเมินข้อต่อขากรรไกร ความสามารถของโคนบีมซีทีในการวัดขนาดของกระดูกอย่างแม่นยำ การประเมินสภาวะทางพยาธิวิทยา และการประเมินความสัมพันธ์กับอวัยวะข้างเคียงทำให้โคนบีมซีทีเป็นเครื่องมือที่ขาดไม่ได้ในยุคทันตกรรมดิจิทัล^(1,5,6) ในทางศัลยกรรมช่องปาก โคนบีมซีทีช่วยให้แพทย์ประเมินปริมาณและคุณภาพของกระดูกในตำแหน่งที่จะปลูกถ่าย ประเมินจุดสำคัญทางกายวิภาค เช่น เส้นประสาทขากรรไกรล่าง และเพิ่มประสิทธิภาพในการเลือกวางตำแหน่งรากฟันเทียม⁽⁷⁾ แพทย์จัดฟันใช้โคนบีมซีทีในการดูตำแหน่งรากฟัน ประเมินทางเดินหายใจ และความเสี่ยงการอุดกั้นทางเดินหายใจ และประเมินความ

สัมพันธ์ของขากรรไกรบนล่าง หรืออาจสร้างแบบจำลองสามมิติในการผ่าตัดขากรรไกร ทำให้แผนการรักษามีความแม่นยำมากขึ้น⁽⁸⁾ ในงานที่มีความละเอียดขึ้น เช่น การรักษาคอลงรากฟัน โคนบีมซีทีมีประโยชน์ในการระบุตำแหน่งรอยแตกของรากฟัน โครงสร้างคลองรากฟันที่ซับซ้อน และรอยโรคที่ปลายรากฟันที่ไม่สามารถมองเห็นได้ในภาพถ่ายสองมิติปกติ⁽⁹⁾

แนวโน้มการปรับเข้าสู่ยุคทันตกรรมดิจิทัลในปัจจุบัน ระบบโคนบีมซีทีเข้าถึงได้ง่ายและมีราคาย่อมเยามากขึ้น การใช้โคนบีมซีทีได้แพร่หลายในหลากหลายของทันตกรรม เครื่องโคนบีมซีทีสมัยใหม่มีขอบเขตภาพ (Field of View: FOV) ที่ปรับแต่งได้ทำให้แพทย์สามารถปรับพื้นที่การถ่ายภาพให้ตรงกับความต้องการในการวินิจฉัยเฉพาะของผู้ป่วย ทำให้รังสีที่ผู้ป่วยได้รับเหมาะสมที่สุด^(2,10) ประกอบกับความก้าวหน้าอย่างต่อเนื่องในซอฟต์แวร์และการประมวลผลภาพทำให้โคนบีมซีทีมีประสิทธิภาพโดยเฉพาะความคมชัดมากขึ้น ลดเวลาในการสแกน ในขณะเดียวกันก็ลดปริมาณรังสีที่ใช้ให้น้อยลง^(3,11) นำไปสู่การเพิ่มความแม่นยำในการวินิจฉัย และนำไปสู่ผลลัพธ์ของการรักษาร่วมกับเพิ่มความสะดวกต่อแพทย์ จึงกล่าวได้ว่าภาพสามมิติที่มีความละเอียดสูงของเครื่องมือชนิดนี้เป็นหนึ่งในวิธีการตรวจที่แทบจะเป็นมาตรฐานของหลายๆ การวินิจฉัยการรักษา จนถึงติดตามอาการ⁽¹²⁾ อย่างไรก็ตามด้วยการใช้งานที่แพร่หลายหากไม่ทราบถึงผลข้างเคียงการใช้งานเกินความจำเป็นอาจนำไปสู่ผลร้ายตามมาบทความนี้เป็น การสรุปความเข้าใจโดยสังเขปเกี่ยวกับการใช้รังสีทางทันตกรรม การแนะนำหลักการประเมินและจัดการความเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับการได้รับรังสี โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแง่ของความกังวลเกี่ยวกับปริมาณรังสีสะสมและความเสี่ยงของโรคมะเร็ง^(1,13) เพื่อให้ผู้ใช้งานที่มีอยู่อย่างแพร่หลายได้เข้าใจถึงผลกระทบที่อาจเกิดจากการใช้รังสีเกินความจำเป็น

วิธีการสืบค้นข้อมูล

การสืบค้นงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับภาพรังสีโคนบีมซีทีกับการเกิดมะเร็ง โดยใช้ฐานข้อมูล

ระหว่างปี พ.ศ. 2540–2567 และข้อมูลอ้างอิงที่เกี่ยวข้อง มีรายละเอียดการกำหนดคำสำคัญ (Keywords) ในการสืบค้นดังนี้ กรณีเอกสารภาษาอังกฤษใช้คำ Dental, Cone Beam Computed Tomography และ Cancer โดยกำหนดแหล่งสืบค้นข้อมูลบทความจากฐานข้อมูลอิเล็กทรอนิกส์ของงานวิจัยภาษาอังกฤษในต่างประเทศ ได้แก่ เว็บไซต์ Pubmed และ Google Scholar รวมทั้งคำแนะนำและข้อกำหนดจากหน่วยงานมาตรฐานที่เกี่ยวข้อง

ผล

รังสีก่อไอออน

รังสีก่อไอออน (Ionizing radiation) คือ รังสีหรืออนุภาคใด ๆ ที่สามารถก่อให้เกิดการแตกตัวเป็นไอออนได้ทั้งโดยทางตรงหรือทางอ้อมในตัวกลางที่ผ่านไป เช่น รังสีแอลฟา รังสีบีตา รังสีแกมมา รังสีเอกซ์ อนุภาคนิวตรอนอิเล็กตรอนที่มีความเร็วสูง โปรตอนที่มีความเร็วสูง รังสีหรืออนุภาคเหล่านี้อาจทำให้เกิดความเปลี่ยนแปลงต่อเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตได้ โดยการทำลายพันธะโควาเลนต์ ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อโครงสร้างของดีเอ็นเอ โดยทำให้เกิดการสลายของดีเอ็นเอโดยเฉพาะอย่างยิ่งการคลายเกลียวของดีเอ็นเอ และมีผลกระทบอีกทาง คือ การสร้างอนุมูลอิสระของออกซิเจน (Reactive Oxygen Species: ROS) ที่ทำให้เกิดการออกซิไดซ์ของโปรตีนและไขมัน รวมถึงการทำลายดีเอ็นเอ การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ทั้งหมดร่วมกันทำให้เกิดการตายของเซลล์หรือความล้มเหลวในการแบ่งตัวของเซลล์ รังสีก่อไอออนสามารถแบ่งประเภทออกเป็น นิวตรอน (Neutrons) รังสีแกมมา (Gamma rays) อนุภาคอัลฟา (Alpha particles) อนุภาคบีตา (Beta particles) และรังสีเอกซ์ (X-rays) เซลล์ที่อยู่ในสภาพสงบนิ่งและแบ่งตัวช้า เช่น เซลล์ที่ประกอบขึ้นเป็นระบบประสาท จะมีความไวต่อรังสีต่ำกว่า ในขณะที่เซลล์ที่มีอัตราการแบ่งตัวสูง เช่น ไขกระดูก ผิวหนัง และเซลล์เยื่อบุของระบบทางเดินอาหาร จะมีความไวต่อรังสีมากกว่า^(14,15) หน่วยการวัดรังสีตามระบบสากล⁽¹⁶⁾ ที่นำมาใช้โดยคณะกรรมการการระหว่างประเทศด้านป้องกันรังสี (International Commission on Radiological

Protection: ICRP) คือ เกรย์ (Gray: Gy) ซึ่งเป็นหน่วยวัดปริมาณรังสีที่ถูกดูดกลืนที่เนื้อเยื่อ 1 กิโลกรัมที่ดูดซับได้ และปริมาณรังสีสมมูล (Equivalent Dose) มีหน่วยเป็น ซีเวิร์ต (Sievert: Sv)

ความเสี่ยงจากการได้รับรังสีต่อการเกิดโรคมะเร็ง

เป็นที่ทราบกันดีว่ารังสีเอกซ์เป็นสาเหตุของโรคมะเร็ง หลักฐานที่บ่งชี้ว่ารังสีเหล่านี้สามารถก่อให้เกิดโรคมะเร็งได้มาจากแหล่งข้อมูลหลากหลาย รวมถึงการศึกษาเกี่ยวกับผู้รอดชีวิตจากระเบิดปรมาณูในประเทศญี่ปุ่น ผู้ที่ได้รับสัมผัสรังสีจากอุบัติเหตุนิวเคลียร์เชอร์โนบิล⁽¹⁷⁾ ผู้ที่ได้รับการรักษาโรคด้วยรังสีปริมาณสูงทั้งโรคมะเร็งและโรคอื่น ๆ⁽¹⁸⁾ และคนงานที่สัมผัสกับรังสีในปริมาณสูงในที่ทำงาน เช่น คนงานในเหมืองแร่ยูเรเนียม การศึกษาส่วนใหญ่เกี่ยวกับรังสีและความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งมุ่งเน้นไปที่ผู้ที่สัมผัสรังสีในปริมาณสูงในสถานการณ์เหล่านี้ ในส่วนของการวัดความเสี่ยงที่เพิ่มขึ้นของมะเร็งจากการได้รับรังสีในระดับต่ำทำได้น้อยกว่า การศึกษาส่วนใหญ่ยังไม่สามารถตรวจพบความเสี่ยงที่เพิ่มขึ้นของโรคมะเร็งในผู้ที่สัมผัสรังสีเอกซ์หรือกัมมันตรังสีในระดับต่ำได้ ตัวอย่างเช่น ผู้คนที่อาศัยอยู่ในพื้นที่สูง ซึ่งได้รับรังสีตามธรรมชาติจากรังสีคอสมิกมากกว่าผู้ที่อาศัยอยู่ที่ระดับน้ำทะเล ไม่ได้มีอัตราการเกิดโรคมะเร็งที่สูงกว่าชัดเจน อย่างไรก็ตาม นักวิทยาศาสตร์และหน่วยงานกำกับดูแลส่วนใหญ่เห็นพ้องกันว่า การสัมผัสรังสีเอกซ์ในปริมาณเล็กน้อยก็สามารถเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งได้ แม้ว่าความเสี่ยงนั้นจะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยมากในภาพรวม ยิ่งปริมาณรังสีที่ได้รับต่ำความเสี่ยงที่เพิ่มขึ้นก็ยิ่งน้อยลง แต่ทว่าไม่มีระดับการสัมผัสรังสีที่ถือว่าปลอดภัยอย่างสมบูรณ์^(17,18)

การศึกษาความเสี่ยงจากการได้รับรังสีจากการตรวจทางภาพถ่ายรังสีทางการแพทย์ อ้างอิงจากความเสี่ยงจากการได้รับรังสีในปริมาณที่ใกล้เคียงกันในการศึกษาผู้รอดชีวิตจากระเบิดปรมาณู จากการศึกษาองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (US FDA) ประเมินการว่าได้รับรังสี 10 มิลลิซีเวิร์ต (mSv) จะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตจากโรคมะเร็ง

ประมาณ 1 ใน 2,000^(18,19) ขณะที่การศึกษาความเสี่ยงต่อโรคมะเร็งจากการตรวจทางภาพถ่ายรังสีนั้นทำได้ยาก เพราะการหาความเสี่ยงที่เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย เช่น 1 ใน 2,000 จำเป็นต้องศึกษาจากผู้คนหลายหมื่นหรือหลายแสนคน และจำเป็นต้องรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับการสัมผัสสารอื่นๆ ที่อาจส่งผลต่อความเสี่ยงต่อโรคมะเร็งด้วย เพื่อให้มั่นใจว่าความเสี่ยงที่เพิ่มขึ้นมาจากการสัมผัสรังสีจริง ๆ ไม่ใช่จากปัจจัยอื่น และเนื่องจากมะเร็งที่เกิดจากรังสีอาจใช้เวลาหลายปีในการพัฒนาของรอยโรค การศึกษาจะต้องติดตามบุคคลเป็นเวลาหลายสิบปี ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์อาจใช้การศึกษาประเภทอื่นที่สามารถทำได้เร็วและใช้ทรัพยากรน้อยลง ตัวอย่างเช่น นักวิจัยอาจใช้การศึกษาแบบสอบถามเพื่อค้นหาสาเหตุที่เป็นไปได้ของการเกิดโรคมะเร็ง โดยเปรียบเทียบการสัมผัสรังสีในกลุ่มผู้ที่เป็นโรคมะเร็งกับผู้ที่ไม่เป็น หรือเปรียบเทียบผู้ที่เคยสัมผัสรังสีกับผู้ที่ไม่เคยสัมผัส อย่างไรก็ตามการศึกษาเช่นนี้ทำได้ยากสำหรับการสัมผัสรังสีจากการตรวจทางภาพถ่ายรังสีทางการแพทย์ เนื่องจากไม่สามารถจดจำข้อมูลเกี่ยวกับเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นเป็นเวลานาน เช่น การตรวจในวัยเด็ก นอกจากนี้ผู้ที่เป็นโรคมะเร็งอาจมีแนวโน้มที่จะรายงานการสัมผัสที่พวกเขาคิดว่าอาจส่งผลต่อความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งมากกว่าผู้ที่ไม่เป็นมะเร็ง ซึ่งอาจส่งผลต่อผลการศึกษาก็จริง⁽¹⁹⁻²¹⁾

โมเดลทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการประมาณความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งจากการได้รับรังสีก่อไอออน คือ โมเดลเชิงเส้นแบบไม่มีค่าเกณฑ์ (Linear No Threshold: LNT) โดยโมเดลนี้ตั้งสมมติฐานว่าการได้รับรังสีในปริมาณใดก็ตาม ไม่ว่าจะน้อยเพียงใดก็ตาม ยังคงมีความเสี่ยงในการก่อให้เกิดโรคมะเร็งหรือความเสียหายทางพันธุกรรม⁽²²⁾ คุณลักษณะสำคัญของโมเดลเชิงเส้นแบบไม่มีค่าเกณฑ์ ได้แก่ ความสัมพันธ์เชิงเส้น หมายถึงความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณรังสีที่ได้รับเป็นเส้นตรง ได้แก่ หากเพิ่มปริมาณรังสีเป็นสองเท่า ความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งจะเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าด้วย และส่วนของการไม่มีค่าเกณฑ์ (No Threshold) หมายถึงไม่มีระดับการได้รับรังสีที่ปลอดภัย การได้รับรังสีเพียงเล็กน้อยก็มีโอกาสที่จะ

เพิ่มความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งได้ แม้ว่าที่ระดับต่ำมาก ความเสี่ยงจะน้อยมากก็ตาม โมเดลนี้มักถูกใช้โดยหน่วยงานกำกับดูแลในการกำหนดมาตรฐานและแนวทางการปลอดภัยจากรังสี เพราะเชื่อว่าการได้รับรังสีสะสมในปริมาณน้อยๆ ในระยะเวลานานสามารถเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งได้ แม้ว่าโมเดลเชิงเส้นแบบไม่มีค่าเกณฑ์จะเป็นโมเดลที่นิยม แต่ก็มีข้อแย้งเกี่ยวกับการใช้โมเดลนี้ โดยความเสี่ยงอาจถูกประเมินเกินจริงในกรณีที่ได้รับรังสีในระดับต่ำมาก ๆ⁽²²⁻²⁴⁾

มีเทคนิคต่างๆ ที่ใช้ในการประเมินปริมาณการรับรังสีเทคนิคหนึ่ง คือ การใช้เครื่องวัดรังสี (Dosimeter) ใส่เข้าไปในหุ่นจำลอง เช่น เครื่องวัดรังสีแบบใช้ความร้อน (Thermoluminescent dosimeter)^(25,26) และเครื่องวัดรังสีที่กระตุ้นด้วยแสง (Optically stimulated luminescent dosimeter)^(25,27) นอกจากนี้ยังมีการใช้ฟิล์มรังสีโครมิก (Radiochromic film)⁽²⁸⁾ และเครื่องวัดรังสีแบบใช้ทรานซิสเตอร์สนามผลโลหะออกไซด์ (Metal-oxide semiconductor field-effect transistor dosimeter)⁽²⁹⁾ อย่างไรก็ตามวิธีเหล่านี้ยังมีหลายขั้นตอนในการเก็บข้อมูลและมีกระบวนการที่ยุ่งยาก^(30,31) อีกวิธีการหนึ่ง คือ วิธีมอนติคาร์โล (Monte Carlo Method) ซึ่งเป็นการจำลองด้วยคอมพิวเตอร์เพื่อหาปริมาณสภาพการได้รับรังสีสำหรับเทคนิคการถ่ายภาพรังสีหลายรูปแบบ^(32,33) โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้วิธีมอนติคาร์โล (PC-based Monte Carlo-Program for Calculation of Patient Doses in Medical X-ray Examinations: PCXMC) เป็นแอปพลิเคชันการจำลองมอนติคาร์โลที่พัฒนาขึ้นสำหรับคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคลโดยหน่วยงานความปลอดภัยด้านรังสีและนิวเคลียร์ในประเทศฟินแลนด์⁽³⁴⁾ หรือมีการติดตั้งโปรแกรมเสริม PCXMC Rotation ช่วยให้สามารถคำนวณปริมาณรังสีได้ในกรณีที่ระบบเอกซเรย์มีจุดหมุนและรังสีถูกเล็งไปยังผู้ป่วยจากทิศทางต่างๆ เพื่อให้แกนกลางของลำรังสีผ่านจุดอ้างอิงของโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้วิธีมอนติคาร์โล PCXMC⁽³⁵⁾ การศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับผลกระทบทางรังสีวินิจฉัยกับการเกิดโรคมะเร็ง และการกลายพันธุ์ทางพันธุกรรมมักใช้วิธีการดังกล่าวในการศึกษา โดยแสดงค่าเป็นความน่าจะเป็น

ของผลกระทบต่อความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งกับ สัตว์ส่วนโดยตรงกับปริมาณรังสีที่ได้รับ ซึ่งสามารถคำนวณ ปริมาณรังสีที่ผู้ป่วยได้รับในการตรวจโคนบีมซีที่ได้

ปริมาณรังสีกับการถ่ายภาพด้วยโคนบีมซี

ในแง่ของการเปรียบเทียบปริมาณรังสีโดยสรุป เมื่อเปรียบเทียบระหว่างปริมาณรังสีที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายภาพด้วยโคนบีมซีกับเครื่องเอกซเรย์ คอมพิวเตอร์ทางการแพทย์ (MSCT) ในการใช้งาน ทางทันตกรรมการถ่ายภาพด้วยโคนบีมซีที่ส่งผลให้ได้รับ ปริมาณรังสีที่ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องเอกซเรย์ คอมพิวเตอร์ทางการแพทย์ ปริมาณรังสีที่ต่ำกว่าของ โคนบีมซีที่สามารถอธิบายได้จากหลายปัจจัย ได้แก่ การออกแบบเฉพาะของเครื่องโคนบีมซีที่ใช้ลำแสง เอกซเรย์ทรงกรวยและใช้เครื่องตรวจจับแบบแบน ทำให้การถ่ายภาพมีความแม่นยำและโฟกัสมากขึ้น⁽³⁶⁻³⁸⁾ แต่หากเปรียบเทียบกับภาพรังสีสองมิติ เช่น พาโนรามิก หรือภาพรังสีกะโหลก มีการศึกษาถึงปริมาณรังสีที่ผู้ป่วย ได้รับจากการถ่ายภาพด้วยโคนบีมซีที่สูงกว่าการถ่ายภาพ 2 มิติ 15–140 เท่า⁽³⁹⁾ ขณะที่ Roberts J และคณะ ระบุว่า โคนบีมซีให้ปริมาณรังสีที่สูงกว่าการถ่ายภาพรังสี พาโนรามิกปกติประมาณ 5–16 เท่า⁽⁴⁰⁾ มีงานวิจัยที่ เปรียบเทียบปริมาณรังสีของโคนบีมซีกับการถ่ายภาพ รังสีอื่น ๆ ทางทันตกรรม สรุปว่าการถ่ายภาพแบบดั้งเดิม ยังคงให้ปริมาณรังสีต่ำสุดแก่ผู้ป่วย⁽⁴¹⁻⁴⁴⁾ นอกจากนี้ Al Najjar A และคณะ ได้รายงานว่าการตั้งค่าปริมาณ รังสีในโคนบีมซีสำหรับเด็กและผู้ใหญ่แสดงให้เห็นว่า ปริมาณรังสีเทียบเท่า (Equivalent dose) ที่อวัยวะศีรษะ และคอในเด็กสูงกว่าผู้ใหญ่อย่างมีนัยสำคัญ⁽²⁵⁾ ดังนั้น การประเมินปริมาณรังสีจึงเป็นสิ่งสำคัญในการวางแผน การรักษาทางทันตกรรม

ขอบเขตภาพเป็นอีกปัจจัยหนึ่งในการจัดประเภท เครื่องโคนบีมซี โดยขอบเขตภาพ หมายถึงบริเวณ กายวิภาคที่ถูกถ่ายภาพหรือบริเวณของผู้ป่วยที่จะได้รับ การฉายรังสีขึ้นอยู่กับชนิดของเครื่อง เครื่องตรวจจับ และ รูปทรงของลำแสงเอกซเรย์ ขอบเขตภาพ สามารถแบ่ง

เป็นขนาดเล็กหรือจำกัด ขนาดกลาง และขนาดใหญ่ได้ เครื่องที่สแกนพื้นที่เล็กหรือจำกัดจะครอบคลุมประมาณ 5 ซีฟัน หรือเทียบเท่ากับเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร และโครงสร้างกายวิภาคโดยรอบส่งผลให้มีปริมาณข้อมูล ขนาดภาพเล็กกว่า การสแกนขอบเขตภาพขนาดเล็กมักใช้ สำหรับการรักษาคอลงรากฟัน เนื่องจากสามารถให้ความ ละเอียดเชิงพื้นที่สูงและสามารถมองเห็นการเปลี่ยนแปลง ของพื้นที่เอ็นปริทันต์หรือกระดูกลามินาดูรา รอยแตก ของรากฟัน รอยโรคปลายราก นอกจากนี้ยังเพียงพอกับ การตรวจฟันคุดและแสดงความสัมพันธ์ของฟันคุดกับ โครงสร้างกายวิภาคโดยรอบ เช่น เส้นประสาท เทคนิคหนึ่ง ของเครื่องขอบเขตภาพขนาดเล็กในปัจจุบัน คือ ความ สามารถในการสร้างภาพขนาดใหญ่กว่าขนาดสนามภาพ ของเครื่องได้ ผ่านกระบวนการเชื่อมต่อภาพ (Stitching process) ซึ่งในกระบวนการนี้การสแกนหลายครั้ง จากขอบเขตภาพขนาดเล็กที่อยู่ใกล้กันจะถูกรวมเข้า ด้วยกัน แต่ข้อเสียหลักของเทคนิคนี้ คือ ผู้ป่วยต้องได้รับ รังสีจากการสแกนโคนบีมซีที่หลายครั้งและในตำแหน่งที่ ซ้อนเหลื่อมกัน⁽⁴⁵⁾

สนามภาพขนาดกลาง หมายถึง การสแกนที่ ถ่ายภาพของฟันหนึ่งขากรรไกรหรือทั้งสองขากรรไกร มีประโยชน์ในการตรวจหารอยโรคหรือสถานะของข้อต่อ ขากรรไกร (Temporomandibular Joints: TMJ) นอกจากนี้ขอบเขตภาพขนาดกลางยังเหมาะสำหรับการ วางแผนการฝังรากฟันเทียมที่มีความซับซ้อนหรือหลาย ตำแหน่งได้ ส่วนขอบเขตภาพขนาดใหญ่เน้นแนะนำ ให้ใช้ในบางกรณีเท่านั้น เช่น ความผิดปกติหรือความ ไม่สมมาตรของโครงกะโหลก หรือเมื่อมีการวางแผน จัดฟันร่วมกับการผ่าตัดขากรรไกร บริเวณสนามภาพมี ความสูงตั้งแต่ 11–24 เซนติเมตร มักครอบคลุมตั้งแต่ ได้คางถึงเบ้าตาหรือครอบคลุมทั้งกะโหลกศีรษะ ข้อเสีย หลักของขอบเขตภาพขนาดใหญ่ คือ การได้รับรังสี ในปริมาณที่มากขึ้นตามไปด้วย หลักการสำคัญในการ เลือกขอบเขตภาพ คือ แพทย์ควรเลือกขอบเขตภาพที่ แตกต่างกันตามข้อบ่งชี้ทางการตรวจของผู้ป่วยแต่ละราย ที่มีความแตกต่างกัน และเลือกขอบเขตภาพที่เล็กที่สุดเท่า ที่จะเป็นไปได้เพื่อหลีกเลี่ยงการได้รับรังสีที่ไม่จำเป็น^(45,46)

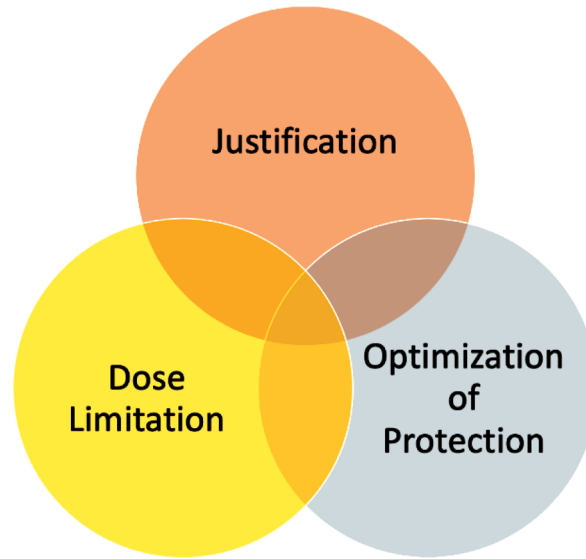
ความสัมพันธ์ของรังสีทางทันตกรรมกับการเกิดมะเร็ง และหลักการป้องกันรังสี

มีผลการวิจัยชี้ให้เห็นว่าการเอกซเรย์ทางทันตกรรมสองมิติได้รับปริมาณรังสีน้อยกว่าการถ่ายภาพสามมิติ มีรายงานวิจัยอธิบายถึงความสัมพันธ์การได้รับรังสีบ่อยครั้งในวัยเด็ก อาจเกี่ยวข้องกับความเสี่ยงที่เพิ่มขึ้นของการเกิดเนื้องอกสมอง (Meningioma)⁽²¹⁾ Longstreth WT Jr และคณะ พบความสัมพันธ์ในกลุ่มผู้ที่มีการถ่ายภาพแบบเต็มปากตั้งแต่ 6 ครั้งขึ้นไป⁽⁴⁷⁾ Preston-Martin S และคณะ รายงานความเสี่ยงที่เพิ่มขึ้นในผู้หญิงที่ได้รับการถ่ายภาพเต็มปากก่อนอายุ 20 ปี⁽⁴⁸⁾ ยังมีความเสี่ยงเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งการถ่ายภาพแบบกัด (Bitewing) และพาโนรามิก⁽²¹⁾ มีการศึกษาโดยอ้างอิงถึงคำรัด (Risk of Exposure Induced Cancer Death: REID) หมายถึง ความเสี่ยงจากการเสียชีวิตที่เกิดจากการสัมผัสรังสี ซึ่งมักมุ่งเน้นไปที่ความเสี่ยงที่เพิ่มขึ้นต่อการเกิดมะเร็งและปัญหาสุขภาพอื่นๆ ตลอดช่วงชีวิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งการสัมผัสรังสีที่มีการใช้ในภาพถ่ายทางการแพทย์ เช่น เอกซเรย์หรือซีทีสแกน ซึ่งอาจเพิ่มความเสี่ยงของโรคมะเร็งได้ แม้ว่าความเสี่ยงการถ่ายภาพรังสีทางทันตกรรมจะต่ำกว่า แต่ก็สามารถสะสมรังสีไว้ได้จากการสัมผัสซ้ำๆ สำหรับคำรัดในกลุ่มเด็กมีค่าประมาณสองเท่าของผู้ใหญ่⁽⁴⁹⁾ ซึ่งเป็นผลมาจากสัดส่วนของเซลล์ที่แบ่งตัวมากขึ้นในเด็กในช่วงการเจริญเติบโต ทำให้เด็กมีความอ่อนแอต่อการสัมผัสรังสีกว่าผู้ใหญ่ และเนื่องจากเด็กมีขนาดร่างกายที่เล็กกว่า อวัยวะที่อยู่ใกล้เคียงจึงได้รับปริมาณรังสีที่สูงกว่าผู้ใหญ่ ในผลการศึกษาของ Jha N และคณะ⁽⁵⁰⁾ ชี้ให้เห็นว่าการใช้โคนบีบซีทีอาจทำให้มีความเสี่ยงเพิ่มสูงต่อมะเร็งต่อมไทรอยด์ มะเร็งช่องปาก และมะเร็งกล่องเสียงทั้งในผู้ใหญ่และเด็ก ในแง่อายุและเพศ ผู้หญิงและเด็กมีความเสี่ยงต่อมะเร็งสูงกว่าผู้ชายและผู้ใหญ่ โอกาสการเกิดมะเร็งต่อมไทรอยด์พบมากในเพศหญิง อาจเพราะการได้รับการสัมผัสรังสีสะสมและปัจจัยอื่นๆ เช่น ตำแหน่งของลำแสงเอกซเรย์และขอบเขตภาพอาจเกี่ยวข้องกับความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งด้วย มีการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณรังสีที่ถูกดูดซับในอวัยวะโดยการวัดปริมาณรังสีที่ผิวหนัง และสรุปว่าควรตั้งขอบเขตภาพให้มีความสูงที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้

เพื่อหลีกเลี่ยงการสัมผัสโดยตรงกับต่อมไทรอยด์ ซึ่งเป็นอวัยวะสำคัญที่มีผลต่อความเสี่ยงมะเร็งจากการสัมผัสรังสี^(27,51) ในระหว่างการสแกนใบหน้าและขากรรไกรต่อมน้ำลายถูกสัมผัสกับรังสีโดยตรง และพบว่าปริมาณรังสีที่ได้รับแตกต่างกันตามตำแหน่งแนวกึ่งกลางภาพ หากตั้งกึ่งกลางภาพที่ระดับฟัน ต่อมน้ำลายหน้ากกหูจะได้รับปริมาณรังสีสูงที่สุด⁽⁵²⁾ ซึ่งพบว่าในผู้ป่วยเด็กต่อมน้ำลายและเยื่อช่องปากได้รับปริมาณรังสีสูงกว่าในผู้ใหญ่เช่นเดียวกับการศึกษาอื่น ๆ⁽⁵³⁾

การป้องกันอันตรายจากการใช้รังสีตามคำแนะนำของคณะกรรมการระหว่างประเทศด้านป้องกันรังสี⁽²⁴⁾ ได้กำหนดหลักการ 3 ประการของการสัมผัสรังสี (ICRP Publication 103 ย่อหน้า 203) ได้แก่ การสัมผัสรังสีต้องมีเหตุผล (Justification) ต้องใช้มาตรการป้องกันเพื่อลดการสัมผัสที่ไม่จำเป็น เช่น หลักการน้อยที่สุดที่เป็นไปได้ (Optimization of Protection) และจำกัดปริมาณการรับรังสีในผู้ป่วยแต่ละรายแตกต่างกัน (Dose Limitation)⁽²⁴⁾ ดังแสดงในภาพที่ 1 ในการส่งตรวจทางรังสีควรทำภายใต้แนวทางขององค์กรด้านรังสีช่องปาก ใบหน้าขากรรไกรแห่งสหภาพยุโรป (European Academy of Dento-Maxillofacial Radiology: EADMR) สำหรับการใช้โคนบีบซีที ระบุว่าควรใช้เฉพาะเมื่อสามารถให้ข้อมูลการวินิจฉัยซึ่งไม่สามารถได้จากเทคนิคการถ่ายภาพรังสีสองมิติ เช่น ฟลิ้มกะโหลกหรือพาโนรามิก และควรใช้ปริมาณรังสีต่ำที่สุดที่จำเป็นเพื่อให้ได้ข้อมูลการวินิจฉัยที่ต้องการ โดยเลือกสนามภาพและการตั้งค่าที่เหมาะสมกับสถานการณ์อย่างเฉพาะเจาะจง มิใช่ค่าเดียวกันในทุกสถานการณ์ นอกจากนี้ยังพิจารณาปัจจัยต่างๆ ของผู้ป่วย เช่น อายุ ประวัติการตรวจทางรังสีก่อนหน้านี้ เครื่องมือตรวจทดแทนอื่นๆ ที่ไม่มีรังสีเอกซ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยเด็กที่มีความไวต่อรังสีสูง และควรมีมาตรการใช้อุปกรณ์ป้องกันรังสี เช่น เสื้อตะกั่วเกราะป้องกันต่อมไทรอยด์ และผู้ปฏิบัติงานรังสีควรต้องได้รับการฝึกอบรมในการใช้งานเครื่อง การตั้งค่าและตีความภาพเบื้องต้นอย่างเหมาะสม แนวทางเหล่านี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อให้การใช้รังสีวินิจฉัยทางทันตกรรมมีความปลอดภัยและมีประสิทธิภาพ โดยต้องคำนึงถึงการป้องกันรังสีควบคู่ไปกับข้อมูลทางการวินิจฉัย⁽⁵⁵⁾

หลักการ 3 ประการของการสัมผัสรังสีจาก ICRP Publication 103 ย่อหน้า 203



ภาพที่ 1 การป้องกันอันตรายจากการใช้รังสี ตามคำแนะนำของคณะกรรมการระหว่างประเทศด้านป้องกันรังสี กำหนดหลักการ 3 ประการของการสัมผัสรังสี จาก ICRP Publication 103 ย่อหน้า 203 ได้แก่ การสัมผัสรังสีต้องมีเหตุผล (Justification) ต้องใช้มาตรการป้องกันเพื่อลดการสัมผัสที่ไม่จำเป็น เช่น หลักการน้อยที่สุดที่เป็นไปได้ (Optimization of Protection) และมีการจำกัดปริมาณการรับรังสีในผู้ป่วยแต่ละรายที่ไม่เท่ากัน (Dose Limitation)

เทคโนโลยีในปัจจุบันเครื่องถ่ายภาพรังสีอาจมีการถ่ายภาพรังสีในโหมดพัลส์ (Pulse mode) หมายถึง เทคนิคที่ลำแสงเอกซเรย์ถูกปล่อยออกมาเป็นช่วงสั้นๆ แทนที่จะเป็นการปล่อยอย่างต่อเนื่อง วิธีนี้มีข้อดีหลายประการ รวมถึงการลดปริมาณรังสีที่ส่งถึงผู้ป่วยอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ยังคงให้ภาพที่มีคุณภาพเพียงพอ นอกจากนี้ โหมดพัลส์ยังช่วยลดข้อผิดพลาดจากการเคลื่อนไหวเนื่องจากการสัมผัสเกิดขึ้นเพียงในช่วงเวลาสั้นๆ ซึ่งทำให้เหมาะสมสำหรับการถ่ายภาพอวัยวะที่เคลื่อนไหวได้ เช่น ขากรรไกรล่าง เวลาในการถ่ายภาพที่เร็วขึ้นยังช่วยเพิ่มความสะดวกสบายให้กับผู้ป่วย และลดโอกาสเกิดภาพไม่ชัดจากการเคลื่อนไหวในระหว่างการสแกน ผู้ปฏิบัติงานยังสามารถปรับระยะเวลาและความถี่ของโหมดพัลส์ได้ ส่งผลให้ลดการสัมผัสรังสี โดยเฉพาะในผู้ป่วยเด็ก หรือกรณีที่ต้องการสแกนหลายครั้งในการรักษาต้านมะเร็งหรือการฝังรังสีหรือการฝังรากฟันเทียม⁽⁵⁶⁻⁵⁸⁾ อีกวิธีหนึ่งในการลดปริมาณรังสีทางทันตกรรมรากเทียมแนะนำให้ใช้บางพารามิเตอร์ลดลง ได้แก่ เวลาในการ

สัมผัสโดยใช้เวลาที่ลดลง⁽⁵⁹⁻⁶¹⁾ แต่เนื่องจากเวลาในการสัมผัสจะถูกกำหนดโดยพารามิเตอร์ทางเทคนิคที่หลากหลาย เช่น ความเร็วในการหมุน เส้นทางการหมุน และอัตราเฟรม ดังนั้นเวลาในการสัมผัสในบางกรณีเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงในพารามิเตอร์รวมเหล่านี้มากกว่าการเปลี่ยนแปลงโดยตรงในการตั้งค่าเวลาการสัมผัส⁽⁶⁰⁾ อย่างไรก็ตามเวลาในการสัมผัสยังคงเป็นพารามิเตอร์ที่สำคัญ ไม่เพียงแต่เพราะมีผลต่อปริมาณรังสีและคุณภาพของภาพ แต่เวลาที่นานขึ้นมีผลต่อข้อผิดพลาดจากการเคลื่อนไหว⁽⁶²⁾ ซึ่งรายงานต่างๆ ในปัจจุบันสนับสนุนการใช้โปรโตคอลลดปริมาณรังสีในทุกขั้นตอนเมื่อใช้โคนบีบซีซี ในงานทันตกรรมรากเทียม ได้แก่ การวางแผน การใส่ฟัน และการตรวจติดตามการละลายกระดูกรอบรากฟัน ผลลัพธ์ชี้ให้เห็นว่าการลดพารามิเตอร์ต่างๆ ยกเว้นแรงดันไฟฟ้า (kV) และการเพิ่มขนาดว็อกเซล (Voxel) สำหรับการฝังรากเทียม⁽⁵⁹⁾ ดังนั้นการตั้งค่ารังสีต่างๆ ควรนำมาใช้ในงานหลากหลายมากขึ้น เช่น การวัดความสูงของกระดูก

นอกจากนี้ประเด็นของจริยธรรมก็มีส่วนสำคัญ การขอความยินยอมก่อนการให้บริการเมื่อต้องถ่ายภาพด้วยโคน빔ซีที โดยทันตแพทย์ควรให้ข้อมูลที่ครบถ้วนเกี่ยวกับประโยชน์ ความจำเป็น วัตถุประสงค์ ขั้นตอน รวมถึงความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้น และทางเลือกด้วยการตรวจวิธีอื่นๆ เพื่อให้ผู้ป่วยเข้าใจในการตัดสินใจเลือกของตนเอง การมีส่วนร่วมของผู้ป่วยในบทสนทนาแบบเปิด ช่วยเสริมสร้างความไว้วางใจและมอบอำนาจให้พวกเขาตัดสินใจด้วยตนเองภายใต้ข้อมูลที่รอบด้าน ควรทำการบินที่กระบวนกรขอความยินยอม และการตอบคำถามหรือข้อกังวลใดๆ ช่วยให้ทันตแพทย์รักษามาตรฐานทางจริยธรรมและเพิ่มความปลอดภัยให้กับผู้ป่วย ซึ่งจะนำไปสู่ประสบการณ์ด้านการดูแลสุขภาพที่ดีและโปร่งใสมากขึ้น⁽⁶³⁾ เนื่องจากความเสี่ยงในการสัมผัสรังสีอาจเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง ดังนั้นในทางกฎหมายประเด็นที่มักถูกหยิบยกขึ้น ได้แก่ การขอความยินยอม ซึ่งอาจเกิดปัญหาได้หากผู้ป่วยอ้างว่าไม่ได้รับข้อมูลที่เพียงพอเกี่ยวกับความเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับการสัมผัสรังสี นอกจากนี้ยังมีความเสี่ยงด้านความประมาท หากผู้ปฏิบัติงานรังสีไม่ปฏิบัติตามโปรโตคอลความปลอดภัยด้านรังสีหรือใช้โคน빔ซีทีในกรณีที่ไม่จำเป็น ซึ่งอาจนำไปสู่การสัมผัสที่ไม่จำเป็นอีกด้วยตามตามคำแนะนำของคณะกรรมการระหว่างประเทศด้านป้องกันรังสี⁽²⁴⁾ อย่างไรก็ตาม ความเสี่ยงจากการถ่ายภาพรังสีเพียงครั้งเดียวต่อการเกิดโรคมะเร็งถือว่าต่ำมาก

วิจารณ์

การถ่ายภาพรังสีด้วยเครื่องโคน빔ซีที เป็นเครื่องมือสำคัญที่ช่วยให้แพทย์สามารถวินิจฉัยโรค และตรวจพบความผิดปกติของอวัยวะต่างๆ ได้อย่างชัดเจน แม้ว่าการถ่ายภาพรังสีจะมีประโยชน์ต่อการวินิจฉัยโรค แต่อาจก่อให้เกิดอันตรายได้เช่นกัน จึงจำเป็นต้องมีการควบคุม กำกับ และดูแลให้เป็นไปตามหลักการป้องกันอันตรายจากรังสีตามมาตรฐานองค์การระดับชาติ และระดับสากล โดยมุ่งเน้นให้การใช้รังสีเกิดประโยชน์สูงสุด และลดความเสี่ยงให้น้อยที่สุด ผู้ปฏิบัติงานด้านรังสีจำเป็นต้องมีความรู้เฉพาะทางด้านรังสี และตระหนักถึงความสำคัญของการป้องกันอันตรายจากรังสีต่อผู้ป่วย

การนำระบบคุณภาพมาใช้ในการควบคุมการปฏิบัติงาน การดูแลรักษาเครื่องมือ การพัฒนาคุณภาพงานบริการ และการควบคุมปริมาณรังสีที่ผู้ป่วยได้รับไม่ให้มากเกินไป ความจำเป็น ล้วนเป็นสิ่งที่สำคัญที่ช่วยลดความเสี่ยงต่อผู้รับบริการและผู้ปฏิบัติงาน โดยภารกิจในการประเมินและดูแลระบบเหล่านี้มีวัตถุประสงค์เพื่อให้มั่นใจว่าห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัยมีมาตรฐาน มีคุณภาพในการถ่ายภาพและปลอดภัยต่อทุกฝ่าย ซึ่งทั้งหมดนี้ภายใต้พระราชบัญญัติพลังงานนิวเคลียร์เพื่อสันติ (ฉบับที่ 2) พุทธศักราช 2562 มาตราที่ 26 และ 28 กำหนดให้การดูแล ได้แก่ การแจ้งครอบครองหรือใช้งานอยู่ภายใต้พื้นที่การกำกับดูแลของสำนักงานรังสีและเครื่องมือแพทยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์⁽⁶⁴⁾ ดังนั้นหลักการควบคุมโดยหน่วยงานของรัฐ จึงเป็นบรรทัดฐานเบื้องต้นในการควบคุมความปลอดภัยจากการใช้รังสี โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้รังสีโคน빔 ซึ่งมีอยู่อย่างแพร่หลายทั้งในระดับโรงพยาบาลหรือกระทั่งคลินิกใกล้บ้าน แพทย์และผู้เกี่ยวข้องกับการใช้รังสี จึงควรรับการตรวจรับรองโดยหน่วยงานของรัฐอย่างสม่ำเสมอตามกรอบเวลา และมีการแสดงใบรับรองการตรวจสอบจากหน่วยงานรัฐให้ผู้รับบริการสังเกตเห็นอย่างชัดเจน

สรุป

ในยุคทันตกรรมดิจิทัลการใช้เครื่องถ่ายภาพรังสีโคน빔ซีทีเป็นที่นิยมอย่างแพร่หลาย แต่ภายใต้ความจริงที่ว่ารังสีเอกซ์เป็นสาเหตุการเกิดโรคมะเร็งทันตแพทย์และผู้ปฏิบัติงานทางรังสีควรคำนึงถึงการเลือกส่งถ่ายภาพภายใต้ข้อบ่งชี้ การป้องกันรังสีไม่ให้เกิดเกินความจำเป็น แต่ยังเพียงพอต่อการวินิจฉัยและสมเหตุสมผล รวมไปถึงการควบคุมปริมาณรังสี โดยเลือกค่าพารามิเตอร์ตามแต่ละสถานการณ์ ไม่ควรใช้ค่าเดียวในทุกสถานการณ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเด็กและสตรีที่มีโอกาสสะสมรังสีมากกว่า โดยยึดหลัก 3 ประการของการสัมผัสรังสีจากคณะกรรมการระหว่างประเทศด้านการป้องกันรังสี ท้ายที่สุดแพทย์ควรเน้นย้ำให้ผู้ป่วยเข้าใจว่า การรับรังสีโคน빔ซีทีเพียงครั้งเดียวมีความเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็งที่ต่ำมาก

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณาจารย์แผนกรังสีวินิจฉัยช่องปาก
ไบหน้าขากรรไกร และศัลยศาสตร์ช่องปาก และ
แม็กซิลโลเฟเชียล มหาวิทยาลัยกรุงเทพมหานคร ที่สนับสนุน
ด้านการศึกษาและโอกาสในการเขียนบทความนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Scarfe WC, Farman AG. What is cone-beam CT and how does it work? *Dent Clin North Am* 2008; 52(4): 707-30.
2. Silva MA, Wolf U, Heinicke F, Bumann A, Visser H, Hirsch E. Cone-beam computed tomography for routine orthodontic treatment planning: a radiation dose evaluation. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2008; 133(5): 640.e1-5.
3. Scarfe WC, Farman AG. Cone beam computed tomography: a paradigm shift for clinical dentistry. *Aust Dent Pract* 2008; 19: 102-6.
4. Miracle AC, Mukherji SK. Conebeam CT of the head and neck, part 1: physical principles. *AJNR Am J Neuroradiol* 2009; 30(6): 1088-95.
5. Kamburoglu K, Murat S, Kilic C. Cone beam computed tomography in dentistry: a review. *Clinics* 2011; 66(6): 1073-81.
6. De Vos W, Casselman J, Swennen GRJ. Cone-beam computerized tomography (CBCT) imaging of the oral and maxillofacial region: A systematic review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2009; 38(6): 609-25.
7. Misch CE. Contemporary implant dentistry. 3rd ed. Mosby: St. Louis; 2011.
8. Kapila S, Conley RS, Harrell WE Jr. The current status of cone beam computed tomography imaging in orthodontics. *Dentomaxillofac Radiol* 2011; 40(1): 24-34.
9. Patel S, Horner K, Wilson R. The use of cone beam computed tomography in endodontics. *Int Endod J* 2009; 42(9): 755-73.
10. Loubele M, Maes F, Jacobs R, Schutyser F, Suetens P. Comparative localized bone quality assessment based on cone-beam computed tomography. *Clin Oral Implants Res* 2009; 20(4): 520-5.
11. Vandenberghe B, Jacobs R, Bosmans H. Modern dental imaging: A review of the current technology and clinical applications in dental practice. *Eur Radiol* 2010; 20(11): 2637-55.
12. Tyndall DA, Rathore S. Cone-beam CT diagnostic applications: Caries, periodontal bone assessment, and endodontic applications. *Dent Clin North Am* 2008; 52(4): 825-41.
13. Pauwels R, Beinsberger J, Collaert B, Theodorakou C, Rogers J, Walker A, et al. Effective dose range for dental cone beam computed tomography scanners. *Eur J Radiol* 2012; 81(2): 267-71.
14. Dunne-Daly CF. Principles of radiotherapy. *Br J Hosp Med (Lond)* 1999; 74: C166-9.
15. Borrego-Soto G, Ortiz-López R, Rojas-Martínez A. Ionizing radiation-induced DNA injury and damage detection in patients with breast cancer. *Genet Mol Biol* 2015; 38(4): 420-32.
16. International Commission on Radiological Protection (ICRP). ICRP Publication 152. *Annals of the ICRP* 2022; 51(3): 1-3.
17. Cardis E, Howe G, Ron E, Bebesko V, Bogdanova T, Bouville A, et al. Cancer consequences of the Chernobyl accident: 20 years on. *J Radiol Prot* 2006; 26: 127-40.
18. Food and Drug Administration. What are the radiation risks from CT? [online]. 2017; [cited 2022 Nov 4]: [4 screens]. Available from: URL: <https://www.fda.gov/radiation-emitting-products/medical-x-ray-imaging/what-are-radiation-risks-ct>.
19. International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans volume 75,

- part 1: X- and gamma -radiation, and neutrons. [online]. 2000; [cited 2022 Nov 4]. Available from: <https://publications.iarc.fr/93>.
20. Linet MS, Slovis TL, Miller DL, Kleinerman R, Lee C, Rajaraman P, et al. Cancer risks associated with external radiation from diagnostic imaging procedures. *CA Cancer J Clin* 2012; 62: 75-100.
 21. Claus EB, Calvocoressi L, Bondy ML, Schildkraut JM, Wiemels JL, Wrensch M. Dental x-rays and risk of meningioma. *Cancer* 2012; 118(18): 4530-7.
 22. Hall EJ, Giaccia AJ. Radiobiology for the radiologist. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2012.
 23. U.S. Environmental Protection Agency. Radiation: health effects. [online]. 2023; [cited 2024 Nov 27]. Available from: URL: <https://www.epa.gov/radiation/radiation-health-effects>.
 24. International Commission on Radiological Protection (ICRP). The 2007 recommendations of the international commission on radiological protection. ICRP publication 103. *Ann ICRP* 2007; 37(2-4): 1-332.
 25. Al Najjar A, Colosi D, Dauer LT, Prins R, Patchell G, Branets I, et al. Comparison of adult and child radiation equivalent doses from 2 dental cone-beam computed tomography units. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 2013; 143(6): 784-92.
 26. Ludlow JB, Ivanovic M. Comparative dosimetry of dental CBCT devices and 64-slice CT for oral and maxillofacial radiology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 106(1): 106-14.
 27. Pauwels R, Beinsberger J, Collaert B, Theodorakou C, Rogers J, Walker A, et al. Effective dose range for dental cone beam computed tomography scanners. *Eur J Radiol* 2012; 81(2): 267-71.
 28. Ludlow JB, Walker C. Assessment of phantom dosimetry and image quality of i-CAT FLX cone-beam computed tomography. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 2013; 144(6): 802-17.
 29. Al-Okshi A, Nilsson M, Petersson A, Wiese M, Lindh C. Using GafChromic film to estimate the effective dose from dental cone beam CT and panoramic radiography. *Dentomaxillofac Radiol* 2013; 42(7): 20120343. (8 pages).
 30. Koivisto J, Kiljunen T, Tapiovaara M, Wolff J, Kortensniemi M. Assessment of radiation exposure in dental cone-beam computerized tomography with the use of metal-oxide semiconductor field-effect transistor (MOSFET) dosimeters and Monte Carlo simulations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2012; 114(3): 393-400.
 31. Lee C, Lee SS, Kim JE, Huh KH, Yi WJ, Heo MS, et al. Comparison of dosimetry methods for panoramic radiography: thermoluminescent dosimeter measurement versus personal computer-based Monte Carlo method calculation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2016; 121(3): 322-9.
 32. Servomaa A, Tapiovaara M. Organ dose calculation in medical x-ray examinations by the program PCXMC. *Radiat Prot Dosim* 1998; 80(1-3): 213-9.
 33. Khelassi-Toutaoui N, Berkani Y, Tsapaki V, Toutaoui AE, Merad A, Frahi-Amroun A, et al. Experimental evaluation of PCXMC and prepare codes used in conventional radiology. *Radiat Prot Dosim* 2008; 131(3): 374-8.
 34. Tapiovaara M, Lakkisto M, Servomaa A. A PC-based Monte Carlo program for calculating patient doses in medical x-ray examinations. In: Report STUK-A139. Helsinki, Finland: Finnish Centre for Radiation and Nuclear Safety; 1997. p. 5-25.

35. Tapiovaara M. PCXMC 2.0 supplementary programs user's guide. Helsinki, Finland: STUK; 2012.
36. Ludlow JB, Davies-Ludlow LE, Brooks SL. Dosimetry of two extraoral direct digital imaging devices: NewTom cone beam CT and Orthophos Plus DS panoramic unit. *Dentomaxillofac Radiol* 2003; 32: 229-34.
37. Arai Y, Tammisalo E, Iwai K, Hashimoto K, Shinoda K. Development of a compact computed tomographic apparatus for dental use. *Dentomaxillofac Radiol* 1999; 28: 245-8.
38. Scarfe WC, Farman AG. What is cone-beam CT and how does it work? *Dent Clin North Am* 2008; 52: 707-30.
39. Kadesjö N, Lynds R, Nilsson M, Shi XQ. Radiation dose from X-ray examinations of impacted canines: cone beam CT vs two-dimensional imaging. *Dentomaxillofac Radiol* 2018; 47(3): 20170305. (9 pages).
40. Roberts J, Drage N, Davies J, Thomas D. Effective dose from cone beam CT examinations in dentistry. *Br J Radiol* 2009; 82(973): 35-40.
41. Lorenzoni DC, Bolognese AM, Garib DG, Guedes FR, Sant'anna EF. Cone-beam computed tomography and radiographs in dentistry: aspects related to radiation dose. *Int J Dent* 2012; 2012: 813768. (10 pages).
42. Ludlow J, Davies-Ludlow L, Brooks S. Dosimetry of two extraoral direct digital imaging devices: NewTom cone beam CT and Orthophos plus DS panoramic unit. *Dentomaxillofac Radiol* 2003; 32(4): 229-34.
43. Garcia Silva MA, Wolf U, Heinicke F, Gründler K, Visser H, Hirsch E. Effective dosages for recording Veraviewepocs dental panoramic images: analog film, digital, and panoramic scout for CBCT. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 106(4): 571-77.
44. Chinem LA, Vilella Bde S, Maurício CL, Canevaro LV, Deluiz LF, Vilella Ode V. Digital orthodontic radiographic set versus cone-beam computed tomography: an evaluation of the effective dose. *Dent Press J Orthod* 2016; 21(4): 66-72.
45. Sedentext. Brussels: Sedentext 2020-2021. [online]. 2021; [cited 2024 Nov 27]. Available from: URL: <https://sedentext.eu/content/basic-principles-use-dental-cone-beam-ct.html>.
46. Farman AG, Feuerstein P, Levato CM. Using CBCT in the general practice. *Compend Contin Educ Dent* 2011; 32(2): 14-6.
47. Longstreth WT Jr, Phillips LE, Drangsholt M, Koepsell TD, Custer BS, Gehrels JA, et al. Dental x-rays and the risk of intracranial Meningioma: a population-based case-control study. *Cancer* 2004; 100(5): 1026-34.
48. Preston-Martin S, Paganini-Hill A, Henderson BE, Pike MC, Wood C. Case control study of intracranial meningiomas in women in Los Angeles County, California. *J Natl Cancer Inst* 1980; 65(1): 67-73.
49. Zamani H, Falahati F, Omid R, Abedi-Firouzjah R, Zare M, Momeni F. Estimating and comparing the radiation cancer risk from cone-beam computed tomography and panoramic radiography in pediatric and adult patients. *Int J Radiat Res* 2020; 18(4): 885-93.
50. Jha N, Kim YJ, Lee Y, Lee JY, Lee WJ, Sung SJ. Projected lifetime cancer risk from cone-beam computed tomography for orthodontic treatment. *Korean J Orthod* 2021; 51(3): 189-98.
51. Pauwels R, Cockmartin L, Ivanauskaitė D, Urboniene A, Gavala S, Donta C, et al. Estimating cancer risk from dental cone-beam CT exposures based on skin dosimetry. *Phys Med Biol* 2014; 59: 3877-91.
52. Yeh JK, Chen CH. Estimated radiation risk of cancer from dental cone-beam computed tomography imaging in orthodontics patients. *BMC Oral Health* 2018; 18: 131. (8 pages).
53. Stratis A, Zhang G, Jacobs R, Bogaerts R, Bosmans H. The growing concern of radiation dose in paediatric dental and maxillofacial

- CBCT: an easy guide for daily practice. *Eur Radiol* 2019; 29: 7009–18.
54. Loubele M, Bogaerts R, Van Dijck E, Pauwels R, Vanheusden S, Suetens P, et al. Comparison between effective radiation dose of CBCT and MSCT scanners for dentomaxillofacial applications. *Eur J Radiol* 2009; 71: 461–8.
 55. European Academy of Dentomaxillofacial Radiology. Guidelines for the use of Cone Beam Computed Tomography in Dentistry. [online]. 2019; [cited 2024 Nov 27]. Available from: URL: <https://eadmfr.eu/eadmfr-cbct-guidelines>.
 56. Pauwels R, Theodorakou C, Walker A, Bosmans H, Jacobs R, Horner K, et al. Dose distribution for dental cone beam CT and its implication for defining a dose index. *Dentomaxillofac Radiol* 2012; 41(7): 583–93.
 57. Ludlow JB, Davies-Ludlow LE, White SC. Patient risk related to common dental radiographic examinations: the impact of 2007 International Commission on Radiological Protection recommendations regarding dose calculation. *J Am Dent Assoc* 2008; 139(9): 1237–43.
 58. Kamburoglu K, Yüksel S. A comparative study of the accuracy and reliability of multidetector CT and cone beam CT in the assessment of dental implant site dimensions. *Dentomaxillofac Radiol* 2011; 40(7): 466–7.
 59. Kaaber L, Matzen LH, Schropp L, Spin-Neto R. Low-dose CBCT protocols in implant dentistry: a systematic review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2024; 138(3): 427–39.
 60. de Castro HS, Kehrwald R, Matheus RA, Gomes AF, Queiroz PM. Influence of low-dose protocols of CBCT on dental implant planning. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2021; 36: 307–12.
 61. Al-Ekrish AA. Effect of exposure time on the accuracy and reliability of cone beam computed tomography in the assessment of dental implant site dimensions in dry skulls. *Saudi Dent J* 2012; 24: 127–34.
 62. Scarfe WC, Li Z, Aboelmaaty W, Scott SA, Farman AG. Maxillofacial cone beam computed tomography: essence, elements and steps to interpretation. *Aust Dent J* 2012; 57(suppl 1): 46–60.
 63. Nair PN, Nair RS. Informed Consent in Dentistry: A Review. *J Clin Diagn Res* 2019; 13(9): ZE01–3.
 64. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. แนวทางการดำเนินการขออนุญาตห้องปฏิบัติการรังสีวินิจฉัยทางการแพทย์. [ออนไลน์]. 2565; [สืบค้น 27 พ.ย. 2567]: [92 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: URL: <https://webapp1.dmsc.moph.go.th/petitionxray/web3/download/XrayTotal.pdf>.

Cone Beam Computed Tomography: Benefits and Cancer Risks in Digital Dentistry

Atapol Yongvikul^{1,2}, Wirapha Senarak³, and Sunya Ruangsitt¹

¹ Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Faculty of Dentistry, Bangkok Thonbui University, Bangkok 10170, Thailand

² Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Masterpiece Plastic Hospital, Bangkok 10300, Thailand

³ Department of Ophthalmology, Sisaket General Hospital, Ministry of Public Health, Muang District, Sisaket 33000, Thailand

ABSTRACT In the digital dentistry era, three-dimensional imaging for oral examination with Cone Beam Computed Tomography (CBCT) has become widely adopted and is increasingly more affordable. It has become one of the standard methods used for diagnostic, treatment, and follow-up purposes in dentistry. However, if the use is not properly controlled and the potential risks of excessive or unnecessary exposure are not understood, adverse effects on patients, particularly increasing the risk of cancer, may occur. This literature aims to compile essential information, beginning with basic knowledge about radiation and its effects on the body, methods of measuring radiation, together with principles of preventing unnecessary radiation exposure while maintaining sufficient diagnostic purposes. The review adhered to the 3 fundamental principles of radiation protection established by the International Commission on Radiological Protection. Finally, it emphasizes the importance of explaining and acknowledging the minimal but present risk of radiation-induced cancer from diagnostic procedures, and informed consent before patients undergo radiation exposure.

Keywords: Cone Beam computer tomography, Diagnostic radiology, Digital dentistry, Head and neck cancer

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	Phichet Banyati
	Ballang Uppapong	Watcharapong Kumla
Technical Advisor	Pimjai Naigowit	Busarawan Sriwanthana
	Panadda Silva	Prapai Wongsinkongman
	Sumol Pavitranon	
Executive Editor	Supaporn Phumiamorn	
Editor	Duanthanorm Promkhatkaew	
Assistant Editor	Siripakorn Sangkitporn	Nuanjun Wichukchinda
	Kriangsak Ruchusatsawat	Siriphan Saeng-Aroon
Editorial Board	Pilaipan Puthavathana	Mahidol University
	Prasert Auewarakul	Mahidol University
	Danai Tiwawech	Naresuan University
	Suwanna Charunut	Huachiew Chalermprakiet University
	Padet Siriyasatien	Chulalongkorn University
	Pornpimol Kongtip	Mahidol University
	Srisurang Tantimavanich	Mahidol University
	Sunee Sirivichayakul	Chulalongkorn University
	Chanitra Thuwajit	Mahidol University
	Pintip Pongpech	Independent Scholar
	Salakchit Chutipongvivate	Independent Scholar
	Usavadee Thavara	Independent Scholar
	Suthon Vongsheree	Independent Scholar
	Wichuda Chittangkura	Independent Scholar
	Supanee Duangteraprecha	Independent Scholar
	Nuanchawee Wetprasit	Independent Scholar
	Wantana Paveenkittiporn	Independent Scholar
	Uruyakorn Chansang	Independent Scholar
Administration	Numfon Noiprasert	Department of Medical Sciences
	Aphimon Jiraphongsathorn	Department of Medical Sciences
	Navy Srivarom	Department of Medical Sciences
	Pawinee Sukcharoen	Department of Medical Sciences
	Apisara Khomduean	Department of Medical Sciences
	Chamaiporn Chumjurn	Department of Medical Sciences
Office	Medical Sciences Technical Office, Department of Medical Sciences 88/7 Soi Tiwanond 14, Tiwanond Rd., Nonthaburi 11000, Thailand. Tel. 0-2951-0000 ext. 99662 Fax: 0-2951-1297 E-mail : bull.dmsc@dmsc.mail.go.th	
Printed by	Thanaaroonkarnpim Co., Ltd. 457/6-7 Phra Sumen Road, Bangkok 10200 Tel. 0-2282-6033-4	



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences



 <https://bit.ly/BullDmsc>